



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN FITOSANIDAD

ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

VARIACIÓN MORFOMÉTRICA Y GENÉTICA DE *Diaphorina citri* (HEMIPTERA: LIVIIDAE) EN RUTÁCEAS DE VERACRUZ, MÉXICO

Valeria Isabel Cuellar Sánchez

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE :

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

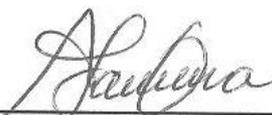
2014

La presente tesis titulada: VARIACIÓN MORFOMÉTRICA Y GENÉTICA DE *Diaphorina citri* (HEMIPERA: Liviidae) EN RUTÁCEAS DE VERACRUZ, MÉXICO realizada por la alumna: Valeria Isabel Cuellar Sánchez bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA



DRA. LAURA DELIA ORTEGA ARENAS

ASESOR



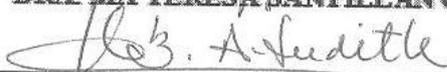
DR. JOEL LARA REYNA

ASESORA



DRA. MA TERESA SANTILLÁN GALICIA

ASESORA



M.C. ALFONSINA JUDITH HERNÁNDEZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Junio de 2014

Esta tesis titulada **“VARIACIÓN MORFOMÉTRICA Y GENÉTICA DE *Diaphorina citri* (HEMIPERA: LIVIIDAE) EN RUTÁCEAS DE VERACRUZ, MÉXICO”** se realizó bajo la dirección de la **Dra. Laura Delia Ortega Arenas**, Profesora Investigadora del Colegio de Postgraduados, como parte del Megaproyecto **“MANEJO DE LA ENFERMEDAD HUANGLONGBING (HLB) MEDIANTE EL CONTROL DE POBLACIONES DEL VECTOR *Diaphorina citri* (HEMIPTERA: LIVIIDAE), EL PSÍLIDO ASIÁTICO DE LOS CÍTRICOS”** bajo la responsabilidad del **Dr. Isabel López Arroyo** y con el apoyo financiero **FONSEC-SAGARPA-CONACYT** con clave **2009-108591**.

**VARIACIÓN MORFOMÉTRICA Y GENÉTICA DE *Diaphorina citri*
(HEMIPERA: LIVIIDAE) EN RUTÁCEAS DE VERACRUZ, MÉXICO**

**Valeria Isabel Cuellar Sánchez, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2014**

RESUMEN

Diaphorina citri es el vector más importante del Huanglongbing, la enfermedad más destructiva de los cítricos en el mundo. El objetivo de este estudio fue detectar la presencia de variantes morfológicas y genéticas, a través del análisis de secuencias de nucleótidos mediante RAPDs y el gen mitocondrial mtCOI para determinar si existe correspondencia entre variantes de individuos de *D. citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), colectados en rutáceas de Veracruz, México. Se encontraron variaciones morfológicas en el ancho, largo y venación de las alas y de los procesos genales de los especímenes estudiados. Los análisis genéticos por medio de RAPDs y secuencias obtenidas con el gen mtCOI confirman la existencia de cuatro haplotipos (H1-H4) de *D. citri* asociados a cítricos en la región productora de Cazonas, Veracruz. El H1 fue el más frecuente y se encontró en todos los hospederos estudiados, mientras que los restantes haplotipos (H2, H3 y H4) sólo se detectaron en un hospedero. Existe relación entre los cambios morfológicos y los haplotipos encontrados, aunque no están ligadas de todo al hospedero.

Palabras Clave: Psílido asiático de los cítricos, morfometría, RAPDs, COI, PCR.

**MORPHOMETRY AND GENETIC VARIATION OF *Diaphorina citri*
(HEMIPTERA: LIVIIDAE) ON RUTACEAS FROM VERACRUZ, MEXICO**

**Valeria Isabel Cuellar Sánchez, M.Sc.
Colegio de Postgraduados, 2014**

ABSTRACT

Diaphorina citri is the most important pest of citrus, which transmits the disease Huanglongbing, the most devastating disease worldwide. The aim of our study was to assess the potential existence between morphometric and genetic differences among *D. citri* individuals collected from different plant hosts. Genetic variation among individuals was detected by RAPDs and sequence analysis of a fragment of the mitochondrial gen Cytochrome Oxidase subunit I (COI). Morphometric variations were found in the wide, length and wing venation as well as genal processes among individuals studied. Genetic analyses revealed the existence of four haplotypes (H1-H4). Haplotype H1 was the most frequent and found in individuals collected from all plant hosts, haplotypes H2-H4 were only found in one plant host. A relationship was found between morphometric and genetic variation, but without a clear interaction with the plant host.

Key words: Asiatic citrus psyllid, morphometrics, RAPDs, COI, PCR.

AGRADECIMIENTOS

Al **Colegio de Postgraduados** por brindarme la oportunidad de continuar con mi formación personal

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**, por el subsidio brindado durante la realización de mis estudios

A la **Dra. Laura Delia Ortega Arenas** por la dirección en la realización de este trabajo

A los integrantes de mi consejo particular **Dra. Laura Delia Ortega Arenas, Dra. Ma. Teresa Santillán Galicia, M. en C. Alfonsina Judith Hernández** y al **Dr. Joel Lara Reyna**, por su valiosa participación en la asesoría de este trabajo de investigación.

Al **M. en C. Jorge Manuel Valdez Carrasco** por su participación como sinodal y por su valiosa ayuda en la toma fotográfica de los ejemplares, además de sus siempre amables palabras.

Al **Dr. Ariel W. Guzmán Franco** por el apoyo brindado para realizar la red de haplotipos

Al **M. en C. Eber Sánchez Velázquez** por su valiosa colaboración en el análisis de secuencias y el depósito de las mismas a GenBank, también por su valiosa amistad y sus consejos.

A mi compañero de laboratorio **M. en C. Edgar Mendoza**, no sólo por el apoyo y la amistad brindada, también por la paciencia y consejos compartidos.

Al **Sr. Magdaleno Caballero**, por hacer muchas veces más ameno el ambiente

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a las personas más importantes de mi vida, que siempre me han apoyado en las decisiones que he tomado y las que espero se sientan siempre orgullosas de mí, porque yo me siento orgullosa de cada uno de ustedes.

A mis padres **Georgina y Mauro**, mis dos héroes implacables.

Por confiar siempre en mí
Por su amor, sus consejos, su apoyo incondicional
Por ser un maravilloso ejemplo de vida
Los amo con todo mi corazón

A mi hermanito del alma, **Jorge Milton**

Por siempre estar al pendiente de mí
Por tu inmenso cariño de hermano mayor
Te quiero con el alma

Al amor de mi vida, **Roberto**, mi príncipe

Por darme la oportunidad de crecer, en todos los sentidos junto a ti
Por tu inmenso amor y apoyo en todo lo que hago
Por estar siempre a mi lado, no importa que
Por nuestra pequeña gran promesa
Y por lo que falta. Te amo con todo mi ser.

A mí adorada familia **Sánchez-Nava: Adolfo, Rocío y Daniela**, aunque estemos lejos, mis pensamientos están con ustedes, les agradezco infinitamente su amor, cariño y consejos.

A mi tía **Hilda y Sharon**, por dame asilo en su casa durante estos dos años, por darme su apoyo, paciencia y cariño.

A mi mejor amiga **Navid Pacheco**, porque aunque estemos lejos, nuestro corazones están unidos.

A los que ya no están, pero que llevo siempre en mis pensamientos

Porque la música forma parte esencial de mi vida, tengo que agradecer a mis artistas favoritos, que me cantaron al oído cuando estaba feliz, nerviosa, cansada, ansiosa, o estresada durante el proceso de este trabajo:

Arkona, Black Sabbath, DSO, Edguy, Finntroll, Heidevolk, Haggard,
Iron Maiden, Korpiklaani, Metallica, Nightwish, P!nk, Rob Zombie,
Sopor Aeternus, Steel Panther, Therion, Turisas, TYR & Voltaire.

A todos aquellos con **seis grados** de separación de mi.

**Make it simple, but significant
-Don Draper-**

**We're all just stories in the
end, so make it a good one, eh?
-The Doctor-**

**When you're a kid, they tell you it's all
grow up, get a job, get married, get a house, have a kid and that's it.
But the truth is, the world is so much stranger than that.
It's so much darker.
And so much madder.
And so much better.
-Elton Pope-**

CONTENIDO	Pág.
INDICE DE CUADROS	vii
INDICE DE FIGURAS	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 General.....	3
2.2 Específicos.....	3
3. REVISIÓN DE LITERATURA	4
3.1 Impacto económico del HLB- <i>Diaphorina citri</i> en México.....	4
3.2 <i>Diaphorina citri</i> como especie invasora.....	5
3.3 Biotipos y haplotipos de <i>Diaphorina citri</i>	7
3.4 Técnicas para la identificación de polifenismos y polimorfismos genéticos en insectos.....	9
3.4.1 Morfometría.....	9
3.4.2 Diversidad genética.....	11
3.4.2.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	11
3.4.2.2 Amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD).....	12
3.4.2.3 Gen citocromo oxidasa (COI) como marcador molecular.....	13
4. MATERIALES Y MÉTODOS	15
4.1 Material biológico.....	15
4.2 Caracterización morfométrica.....	15
4.3 Caracterización genética.....	16
4.3.1 Extracción de ADN.....	16
4.3.2 Patrones de amplificación por RAPDs.....	16
4.3.3 Análisis de resultados.....	17
4.3.4 Amplificación del gen COI.....	18
5. RESULTADOS	19
5.1 Caracterización morfométrica.....	19
5.2 Caracterización genética.....	22
6. DISCUSIÓN	28
7. CONCLUSIONES	30
8. AGRADECIMIENTOS	30
9. LITERATURA CITADA	31

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Pág.
1	Muestras utilizadas para la caracterización morfométrica, amplificación de RAPDs y mtCOI de adultos de <i>Diaphorina citri</i> recolectados en diferentes hospederos en Cazonos, Veracruz.	15
2	Medidas promedio de cinco caracteres morfológicos en machos y hembras de <i>Diaphorina citri</i> recolectados en diferentes hospederos en Cazonos, Veracruz, México.	19
3	Individuos de <i>D. citri</i> , caracterizados en el estudio con rasgos fenotípicos que difieren del patrón típico.	20
4	Variabilidad estadística por carácter morfológico de machos y hembras de <i>Diaphorina citri</i> de diferentes hospederos en Cazonos, Veracruz, México	22
5	Muestras amplificadas por PCR que se enviaron a secuenciación	25
6	Muestras utilizadas para el análisis filogenético con número de acceso a GenBank.	25

INDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
1	Variantes morfométricas de las alas anteriores encontradas en <i>Diaphorina citri</i> .	20
2	Variantes morfométricas de los procesos genales encontradas en <i>Diaphorina citri</i> .	21
3	Gel de agarosa al 2% que muestra los fragmentos amplificados del iniciador OPA 018.	23
4	Dendograma construido a partir de marcadores RAPDs.	24
5	Reconstrucción con fragmentos del gen mitocondrial COI para poblaciones de <i>D. citri</i> .	26
6	Red de haplotipos con fragmentos del gen mitocondrial COI para poblaciones de <i>D. citri</i> .	27

1. INTRODUCCIÓN

Diaphorina citri Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), también conocida como Psílido Asiático de los Cítricos (PAC), es considerada la plaga más importante de los cítricos en el mundo, debido a que transmite la bacteria (*Candidatus Liberibacter* var. *asiaticus* y *americanus*) causante del Huanglongbing (HLB) o dragón amarillo de los cítricos, la enfermedad más destructiva de los cítricos a nivel mundial; responsable del declinamiento y muerte de millones de árboles (Roistscher, 1996; Halbert & Manjunath, 2004; Bové, 2006).

Es lógico suponer que el PAC al ser una plaga invasora, de origen asiático y de reciente introducción a nuestro país, haya estado sujeta a procesos evolutivos de diferenciación genética que hayan permitido su adaptación y establecimiento y puedan resultar en especiación (Sakai *et al.*, 2001; Maron *et al.*, 2004; Facon *et al.*, 2006; Prentis *et al.*, 2008).

El PAC es una plaga exótica, de origen asiático y de reciente introducción a nuestro país. No obstante, *D. citri* se encuentra presente en Brasil desde el siglo pasado, aunque la enfermedad estaba restringida solamente al sudeste de Asia, India y África (Mead, 1977); por lo que se presupone que haya estado sujeta a procesos evolutivos de diferenciación genética desde su llegada al continente americano, lo que le ha permitido su adaptación, establecimiento y quizá diferenciación (Sakai *et al.*, 2001; Maron *et al.*, 2004; Facon *et al.*, 2006; Prentis *et al.*, 2008). En el continente Americano (principalmente E. U. A, Brasil y Argentina) se han reportado poblaciones de *D. citri* con variantes en coloración abdominal, la cual correlaciona con la tasa reproductiva y la atracción de hembras hacia los machos (Wenninger *et al.*, 2009). En México también se reportó recientemente la presencia de individuos, dentro de una misma población, que diferían en talla corporal, longitud y amplitud de procesos genales y, longitud y amplitud de alas anteriores (García-Pérez *et al.*, 2013), aparentemente asociados a la planta hospedera; sin embargo, en ninguno de los casos se demostró la existencia de un determinismo genético.

Las observaciones realizadas hasta ahora han sentado un fuerte precedente de la formación de posibles biotipos o razas, sobre sus hospederos, por lo que la realización de estudios moleculares en el caso de *D. citri*, proporcionarían información relevante sobre si los cambios morfológicos reportados, son indicio de la formación de

subespecies o razas, o de relaciones específicas que se están estableciendo entre el insecto y su hospedero.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo de investigación fue el documentar la presencia de variantes morfométricas, y tratar de ligarlas a diferencias genéticas, mediante el uso de RAPDs y mtCOI para determinar si existe correspondencia entre variantes en individuos de *D. citri* colectados en rutáceas de Cazonas, Veracruz, México.

2. OBJETIVOS

2.1 General

- ❖ Determinar la existencia de variantes morfométricas y genéticas entre poblaciones de *Diaphorina citri* colectadas en diferentes hospederos en Veracruz, México.

2.2 Específicos

- ❖ Confirmar la identidad de los individuos de *D. citri* recolectados en diferentes hospederas rutáceas en Veracruz, México.
- ❖ Identificar caracteres morfométricos variantes en poblaciones de *Diaphorina citri* colectados en rutáceas de Veracruz.
- ❖ Identificar variación genética entre las poblaciones de diferentes hospederos de *D. citri* de Cazones, Veracruz.
- ❖ Correlacionar variaciones morfométricas con variantes genéticas en individuos de *D. citri* recolectados en diferentes hospederos de Cazones, Veracruz.

3. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Impacto económico del HLB- *Diaphorina citri* en México

El HLB, enfermedad asociada a la bacteria *Candidatus Liberibacter spp.*, y transmitida en el continente Americano por el PAC es reconocida a nivel mundial como la enfermedad más devastadora de los cítricos. El vector fue encontrado en México desde el año 2002, para el año 2008 el insecto invadió por completo la citricultura nacional. El patógeno *Ca. Liberibacter asiaticus* fue detectado por primera vez durante el 2009 en Yucatán, México. En nuestro país esta enfermedad ha avanzado rápidamente, de 2010 a 2013 el HLB se extendió a 232 municipios en 14 de los 23 estados citrícolas del país (Baja California Sur, Campeche, Colima, Chiapas, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Puebla, Quintana Roo, Sinaloa, Tabasco y Yucatán) y anteriormente ya se habían realizado detecciones de psílicos infectivos en Sonora, Veracruz, San Luis Potosí, Oaxaca, Nuevo León, Morelos y Coahuila (este último sin superficie citrícola) (SENASICA, 2014). Por la naturaleza agresiva del patógeno, la mayoría de los árboles infectados mueren en un plazo de 3 a 10 años (Salcedo *et al.*, 2010).

De acuerdo a las estimaciones oficiales, las pérdidas a nivel nacional pueden exceder el 50% de la producción proyectada, lo que representa un fuerte impacto negativo no sólo para las unidades productivas, sino para los trabajadores que dependen de esta industria como fuente de sustento económico (Salcedo *et al.*, 2010; SENASICA, 2012).

La presencia del vector y la bacteria como una combinación destructiva, pone en grave riesgo la cadena citrícola mexicana, porque de ella dependen 69 mil productores y 154 mil empleos directos (Salcedo *et al.*, 2010). También están en riesgo 549 mil hectáreas sembradas de cítricos, alrededor de 60 viveros certificados y en trámite de certificación, 138 empacadoras, 110 enceradoras, 22 plantas jugueras, y 5 gajeras. El cultivo de cítricos absorbe el 40% de la superficie nacional sembrada de frutales y se presenta de manera representativa en 23 estados de la República Mexicana, aunque en seis de ellos se concentra el 75 % de la superficie cultivada, siendo Veracruz el mayor productor al aportar más del 40% (SIAP, 2011; Salcedo *et al.*, 2010).

De acuerdo con Salcedo *et al.*, (2010) el escenario epidémico del HLB en México puede variar en función de varios factores, destacando el clima y la estructura de

hospederos cítricos en relación también de la susceptibilidad al patógeno y de la superficie sembrada. Con base en dicho estudio, Veracruz, Colima y Michoacán se consideran las entidades de alto riesgo y, por lo mismo, de significativo impacto comercial; mientras que la Península de Yucatán y la vertiente del Pacífico como regiones de moderado riesgo. Sin embargo, los eventos de 2011 mostraron que la costa del Pacífico se ha vuelto de alto riesgo debido a la alta susceptibilidad del limón mexicano al HLB y PAC.

Diaphorina citri tiene un rango de hospederas que incluye a varias plantas de la familia de las rutáceas. Además de alimentarse y desarrollarse en los brotes tiernos de los cítricos, se sostiene de brotes nuevos de la planta ornamental, conocida como limonaria, jazmín o azahar de la india (*Murraya paniculata* (L.) Jack), que se considera la principal hospedera, debido a que es común encontrar limonaria en jardines, avenidas y traspatios de zonas urbanas, el control del psílido se dificulta, ya que se reproduce en éstas para luego atacar huertas cítricas (Halbert & Manjunath, 2004).

Los datos existentes en el Museo Nacional de Historia Británico, indican que el hospedero original de *D. citri* probablemente fue una especie de *Murraya*, pero esta plaga se desarrolló rápida y exitosamente en cítricos (Hollis, 1987). Sin embargo, el PAC ha ampliado su rango de hospederos a través de todo un proceso evolutivo, en dicho proceso se involucran a la temperatura y la precipitación que varían en respuesta a la latitud del lugar, altitud y a la continentalidad.

En contra de las referencias bibliográficas a nivel mundial, que evidencian los daños más importantes sobre naranja, en México el cultivo que evidencia el máximo impacto es el limón mexicano y las regiones agrícolas del Pacífico las más afectadas (Salcedo *et al.* 2010)

3.2 *Diaphorina citri* como especie invasora

El fenómeno de las invasiones biológicas ha aumentado en los últimos 150 años con la globalización (Sakai *et al.*, 2001). El movimiento intencional de especies tiene diferentes motivaciones, tales como la producción de alimento, control biológico, propagación de plantas de ornato, crianza de animales en bioterios o en zoológicos y establecimiento de colecciones de referencia, entre otros. Sin embargo, no todas son consideradas perjudiciales y, pese a que constituyen un elemento importante en las actividades humanas, otras especies introducidas son liberadas o escapan de su

cautiverio al medio natural. Aunque la mayoría de los casos estas especies no sobreviven en él, otras establecen poblaciones autosostenibles en ecosistemas naturales, proliferan e interfieren negativamente con especies nativas, por lo que son denominadas especies invasoras (McNeely *et al.*, 2001; Sakai *et al.*, 2001; Gurevitch & Padilla, 2004; Ross & Shoemaker, 2008).

Sakai *et al.* (2001) mencionan que la genética y los procesos evolutivos pueden determinar si una especie invasora se establece y propaga. De igual manera la hibridación, inter o intraespecíficas o endogamia entre poblaciones previamente aisladas de la misma especie, puede repercutir de manera importante en la evolución de la colonización (Ellstrand & Schierenbeck, 2000; Tsutsui *et al.*, 2000).

Un evento de colonización puede implicar un cuello de botella en la población, porque el número de colonos iniciales suele ser pequeño. La deriva genética durante la colonización puede significar menor variación genética en la población recién establecida. Este efecto será parcialmente fuerte cuando los colonos proceden de la misma población de origen. Por tanto, una población recién establecida es probable que sea genéticamente menos diversa que la población de la cual deriva (Barrett & Kohn, 1991).

Las invasiones constituyen con frecuencia, eventos evolutivos rápidos, dando lugar a poblaciones genéticamente dinámicas en tiempo y espacio (Reznick & Ghalambor, 2001). Las características genéticas de las poblaciones tienen un impacto profundo en su capacidad para expandirse (Tsutsui *et al.*, 2000; Ellstrand & Schierenbeck, 2000; Krieger & Ross, 2002). Tanto la selección natural como la deriva génica podrían alterar las estructuras genéticas de las poblaciones de maneras que modifican su tolerancia o comportamiento. Las poblaciones invasoras también son capaces de inducir cambios evolutivos en especies nativas (Filchak *et al.*, 2000; Carrol *et al.*, 2001). En consecuencia, incorporar la genética evolutiva es importante para revelar las características que determinan el éxito de la invasión (Lee, 2002).

Diaphorina citri tiene su origen en el lejano oriente, por lo que al ser una plaga invasora y de reciente introducción a nuestro país, es posible que el aislamiento geográfico desde su lugar de origen haya derivado en variaciones morfométricas y biológicas que dificulten la definición de una estrategia de manejo. Por tanto, la gestión de riesgos que plantea una especie invasora como el PAC requiere, como mínimo, la capacidad de reconocer las especies. El reconocimiento, detección temprana y control

de especies invasoras por tanto, supone el uso de herramientas de rápido reconocimiento, y técnicamente accesibles y precisas (Darling & Blum, 2007).

3.3 Biotipos y Haplotipos de *Diaphorina citri*

De acuerdo con Drés & Mallet (2002) el término biotipo se refiere a una población con alguna diferenciación genética o fenotípica con respecto a otra población, la cual está en el mismo rango polimórfico de lo que taxonómicamente se define como especie. Esto implica la diferenciación de genes de uno o dos marcadores moleculares y no es tan evidente si se compara con la diferenciación genética en las razas hospederas, las cuales se diferencian en una gran cantidad de genes nucleares y mitocondriales. Los autores aclaran que la asociación con el hospedero no es tan específica ya que la población, que se encuentra en proceso de diferenciación genética, puede tener más de un hospedero y a su vez, los biotipos no presentan un aislamiento reproductivo tan marcado como las razas asociadas a hospederos (Salinas, 2010). Hay cierta controversia en la literatura acerca de qué es un biotipo ya que no se sabe en qué es diferente o si las diferencias implican un cambio cuantitativo o mayor en los genes. Biotipo puede referirse a individuos genéticamente diferentes y que pueden consistir en una habilidad diferencial para crecer o desarrollarse en una segunda variedad (Bernays & Chapman, 1994).

Diehl & Bush (1984) definieron categorías en las que un biotipo puede ser clasificado: *fenocopias o ecomorfos no genéticos*, y se refiere a cuando el mismo genotipo produce fenotipos diferentes bajo diferentes condiciones ambientales; *polimorfismos genéticos*, que son fenotipos discontinuos entre individuos con entrecruzamiento libre y que son el resultado de la variación alélica de una frecuencia más alta que no puede ser mantenida por una mutación recurrente; *razas geográficas*, se refieren a organismos similares en morfología, ecología o comportamiento las cuales comparten el mismo hábitat pero se encuentran en diferentes localidades; *razas hospederas*, se refieren a aquella población de especies que, reproductivamente, están parcialmente aisladas de otras poblaciones como consecuencia de la adaptación a un hospedero específico.

Dentro de los biotipos se pueden encontrar diferencias a nivel molecular que generan haplotipos (Lewter *et al.* 2006; Nagoshi *et al.* 2007). Un haplotipo es definido como una única forma genética que difiere de cualquier otra forma por variaciones en

las posiciones individuales (al menos en un nucleótido) en una secuencia de ADN (Templeton, 2006).

Aunque se puedan encontrar diferencias a nivel fisiológico o reproductivo dentro de los biotipos, las similitudes en características a nivel morfológico hacen imposible su separación. Sin embargo, difieren en varias características a nivel molecular que permiten su diferenciación rápida y efectiva. Dentro de estas características, se pueden incluir las variaciones en aloenzimas electroforéticas con las esterasas, polimorfismos de ADN mitocondrial, RFLPs, AFLPs, así como las diferencias en las secuencias de ADN repetitivo (Salinas, 2010).

La presencia de un haplotipo en una o varias localidades determinadas indica que una población migró de un lugar a otro. Los estudios realizados para encontrar y analizar los patrones de distribución de los haplotipos han sido realizados mediante secuencias de genes mitocondriales, como el Citocromo Oxidasa mitocondrial subunidad I (mtCOI) y nucleares (microsatélites).

En lo referente a *D. citri*, en el Continente Americano (principalmente E.U.A, Brasil y Argentina) se han detectado poblaciones variantes en color abdominal (gris-marrón, azul-verdoso y naranja-amarillento), relacionados con la tasa reproductiva y la atracción de hembras hacia los machos (Wenninger *et al.*, 2009). En México, también se detectó la presencia de individuos, dentro de una misma población, que diferían en talla corporal, longitud y amplitud de conos genales y longitud y amplitud de alas anteriores (García-Pérez *et al.* 2013), aparentemente asociados a la planta hospedero; sin embargo, en ninguno de los casos se demostró la existencia de un determinismo genético.

Para demostrar la existencia de variaciones genéticas e intraespecíficas en poblaciones de *D. citri* de Florida, Texas y Brasil, Boykin *et al.* (2007) realizaron un estudio por medio de microsatélites polimórficos; sin embargo, y aun cuando se analizó la diversidad alélica de 288 individuos, no encontraron diferencias. Contrario a lo anterior, de León *et al.* (2011) reportaron la presencia de 22 haplotipos de *D. citri*, ocho en Sudamérica y 15 en Norte América y Hawái, sugiriendo que la introducción del PAC en América ocurrió por dos vías, una por el sur y la otra por el norte del continente. Más tarde, Boykin *et al.* (2012) realizaron un estudio con mtCOI de 212 individuos provenientes de 52 colecciones de 15 países, donde demostraron la existencia de ocho haplotipos, y el más frecuente fue el haplotipo Dcit-1 SWA. De igual forma López *et al.* (2012), también con mtCOI, reportaron la existencia de tres haplotipos en México, uno de los cuales es registro único para la zona de Yucatán. En un estudio más reciente,

Lashkari *et al.* (2013a) detectaron mediante marcadores moleculares, mtCOI, y microsatélites, diferencias polimórficas de *D. citri* entre poblaciones Iraníes y Pakistaníes.

3.4 Técnicas para identificación de polifenismos y polimorfismos genéticos en insectos

3.4.1 Morfometría

Las características morfológicas y ecológicas que definen a un individuo pueden ser correlacionadas dado el resultado de las presiones selectivas y adaptaciones fenotipo, genotipo y ambiente. La morfología determina diversas características ecológicas, tal como la alimentación o el rendimiento del aparato locomotor (Losos, 1990; Wainwright, 1994; Smith & Van Buskirk, 1995). Mientras, que los factores ecológicos pueden inducir cambios fenotípicos (Travis, 1994) y conducir divergencia y evolución adaptativa de los rasgos morfológicos (Schluter & McPhail, 1992; Snorrason *et al.*, 1994; Westneat, 1995). Esta relación ecomorfológica a menudo puede inferirse a través de la forma y el tamaño de los organismos, utilizando herramientas morfométricas (Rickfels & Miles, 1994). Uno de los más utilizados en el tamaño del cuerpo, ya que es uno de los caracteres fenotípicos que tienen implicaciones ecológicas, biogeográficas, fisiológica, uso del recurso, relaciones presa-depredador y comportamiento (Atkinson, 1994).

En ocasiones, la variación de tamaño entre los individuos de una especie o entre especies relacionadas, modula la competencia intra e interespecífica y una repartición del recurso más eficiente (Sheldon, 1968).

La aplicabilidad de herramientas morfométricas en el estudio de insectos, se ha basado en la evaluación métrica de las partes del exoesqueleto, las cuales presentan cambios de forma (Tierno de Figueroa & Sánchez-Ortega, 2005). La morfometría de las alas puede ayudar a identificar poblaciones interespecíficas, como en el caso del análisis de variación geográfica de tres poblaciones de *Drosophila lummei* y *D. serrata*. Dantur-Juri *et al.* (2011) evaluaron el efecto de las características de las eco regiones y de las distancias geográficas sobre los rasgos o caracteres morfológicos de las hembras de *Anopheles pseudopunctipennis* de 15 localidades de Argentina y Bolivia, demostrando

que existe un mayor efecto de las ecoregiones comparado con las distancias geográficas. Sin embargo, concluyen que se requieren de estudios moleculares para determinar si las distancias geográficas influyen sobre la diferenciación de poblaciones del mosquito de Argentina y Bolivia, en el extremo sur de América del Sur.

Dubey *et al.* (2008) utilizaron la morfología de la mosca blanca *Singhius ehretiae* (Hemiptera: Aleyrodidae) para redescubrir el género basados en dimorfismos y variaciones intraespecíficas. También se han realizado estudios con organismos pertenecientes a la Superfamilia Psylloidea, para separar adultos morfológicamente cercanos de *Calophya*, un género de psílidos formadores de agallas, asociados plantas del género *Schinus* (Burckhardt & Basset, 2000). Vargas-Madríz *et al.*, (2013) evaluaron el efecto de dos variedades de jitomate en la morfometría de *Bactericera cockerelli* en condiciones de invernadero, obteniendo variación significativa entre instares sobre diferentes variedades.

Ammar *et al.*, (2013) se enfocaron en la morfometría de los estiletes de ninfas y adultos de *D. citri* sobre naranja Valencia y su relación con la transmisión temprana de la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus*, encontrando que la bacteria no puede ser transferida en estadíos tempranos, ya que el estilete del insecto no tiene la capacidad para cargar la bacteria. De igual forma Lashkari *et al.*, (2013b) al estudiar las variaciones en la forma de las alas anteriores de diversas poblaciones de Irán y Pakistán, encontraron variaciones significativas que correlacionaron a mecanismos genéticos y factores ambientales. Concluyen que la morfología alar puede ser una herramienta útil para conocer la estructura de la población y definir métodos efectivos de control de *D. citri*.

3.4.2 Diversidad genética

En general, la sistematización de grupos taxonómicos ha llevado a realizar estudios basados en características morfológicas, las cuales no siempre son fáciles de observar, y algunas veces pueden variar. Por lo cual, recientemente para el estudio de especies, se recurre al análisis molecular, el cuál provee una base sólida en hipótesis de tipo filogenéticas, con el propósito de identificar, determinar variaciones intra e interespecíficas del ADN de una especie, hacer análisis filogenético, estudios de ecología y manejo de plagas (de Rojas *et al.* 2011; Feldman & Ntenda, 2011). La filogenética posee un amplio enfoque para delimitar especies morfológicamente

similares, además de utilizarse en la identificación geográfica del origen de las especies invasoras, como es el caso de *D. citri* (Avisé *et al.*, 1987; Roderick & Navajas 2003; Brown, 2004; Roderick 2004; de León *et al.*, 2006; Triapitsyn *et al.*, 2008).

Las técnicas moleculares basadas en PCR presentan varias ventajas, incluyendo la posibilidad de trabajar con insectos extremadamente pequeños, además de que no se ven afectadas por la edad o el estadio de los insectos en algunos casos pueden ser utilizadas en insectos secos o almacenados en alcohol por algún tiempo, como en el caso de las muestras de museo o colecciones (Álvarez & Hoy, 2005).

Entre las técnicas moleculares más comunes para la determinación específica se encuentran el análisis de RFLP (restriction fragment length polymorphism), el análisis de microsatélites, el SSCP (single-strand conformation polymorphism), los RAPD (random amplified polymorphic DNA) y las huellas digitales de AFLP (amplified fragment length polymorphism) (Hendrick, 1992; Hughes & Queller, 1993; Black, 1995; Mueller *et al.*, 1996).

3.4.2.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR es una reacción enzimática en cadena que conlleva a la amplificación de secuencias de ADN específico de un ADN molde determinado, además de necesitar dos oligonucleótidos o primers de aproximadamente 20 nucleótidos de longitud, cuya secuencia debe ser complementaria del ADN molde. La amplificación se realiza en presencia de dNTPs como sustrato y la reacción es catalizada por la *Taq* polimerasa. La secuencia entre las dos regiones complementarias a los primers es sintetizada al repetir los ciclos, los cuales consisten en una serie de temperaturas, donde el ADN es desnaturizado, los primers se alinean y se lleva a cabo la polimerización de la secuencia específica. La nueva secuencia sintetizada se convierte en nuevo ADN molde para el siguiente ciclo, es así que teóricamente, por cada ciclo ocurrido, la concentración de ADN amplificado se duplica, y pasados 30 ciclos, el rendimiento de la amplificación de una secuencia específica es de 1×10^9 copias. La PCR alcanza estos resultados debido a que la reacción en cadena requiere el alineamiento específico de los dos primers a la secuencia complementaria (Rodríguez, 2006; Burrell, 1993; Bailey & Jeger, 1992).

3.4.2.2 Amplificación al azar de ADN polimórfico (Random Amplification of Polymorphic DNA).

La técnica del RAPD-PCR consiste en la amplificación enzimática de fragmentos de ADN, mediante la realización de una reacción PCR con oligonucleótidos de secuencia arbitraria, que hibridan en loci repartidos aleatoriamente en todo el genoma, revelando polimorfismos, útiles como marcadores genéticos y taxonómicos. La técnica permite una alta discriminación taxonómica y requiere una cantidad mínima de ADN (Guirao *et al.*, 1994).

Los organismos vivos pueden revelar regiones con secuencias de nucleótidos (polimorfismos) que los diferencian de otros individuos, de manera similar a las huellas dactilares (Trigiano & Caetano-Anollés, 1998). Cada segmento amplificado deriva de una región que contiene dos segmentos cortos de ADN con alguna homología con el iniciador. Estos segmentos deben estar presentes en cadenas complementarias de ADN y ubicados lo suficientemente cerca para que ocurra la amplificación (Rafalski & Tingey, 1993). Los fragmentos polimórficos son heredados de forma Mendeliana y pueden ser obtenidos de cualquier especie y no se requiere información previa de las secuencias genéticas, el protocolo es relativamente rápido y fácil de realizar y usa fluorescencia en lugar de radioactividad. Debido a que es una técnica basada en la multiplicación de fragmentos, solamente se necesitan nanogramos de ADN y es factible la automatización (Williams *et al.*, 1992).

Los RAPD son marcadores usualmente dominantes con polimorfismos entre los individuos definidos por la presencia o ausencia de una banda en particular (Mondragón-Jacobo, 2002). Cada iniciador en promedio dirigirá la amplificación de varios loci discretos en el genoma, permitiendo seleccionar secuencias polimórficas de nucleótidos entre individuos. El número y tamaño de los fragmentos dependerá de la secuencia de nucleótidos del iniciador y la fuente de ADN, resultando en una huella de ese genoma o de la fracción aleatoria del ADN amplificado. El número de bandas puede ser muy alto, dada la cantidad de iniciadores disponibles, cerca de 1200, o puede ser que no amplifiquen ninguna banda (Tingey & del Tufo, 1993).

La naturaleza dominante de los marcadores de ADN puede ser una desventaja debido a que la identificación de heterocigotos no es posible. La desventaja principal es la reproductibilidad de los resultados, debido a la competencia entre fragmentos de ADN, el tipo de polimerasa, el tipo de máquina para PCR y las condiciones de

electroforesis. Estos inconvenientes son factibles de minimizarse optimizando los métodos de extracción de ADN, manteniendo condiciones estándares de laboratorio y usando reactivos de calidad controlada (Williams *et al.*, 1993; Mondragón-Jacobo, 2002).

El uso de RAPDs ha sido útil para diferenciar y realizar estudios genéticos comparativos en poblaciones de *Trialeurodes vaporariorum* y *Bemisia tabaci* (Guirao *et al.*, 1994).

3.4.2.3 Gen citocromo oxidasa I (COI) como marcador molecular

Dentro de las subunidades del ADN mitocondrial, el gen COI, posee varias características que lo convierten en uno de los mejores marcadores moleculares disponibles para estudios relacionados con la evolución (Avisé *et al.*, 1987). Dentro de éstas se encuentra su tamaño y estructura, las cuales son características conservadas en la mayoría de los organismos (Saraste, 1990); la longitud del gen que se presenta como la mayor dentro de tres subunidades del citocromo oxidasa, que permite amplificar y secuenciar muchos más caracteres o nucleótidos; la presencia de extremos altamente conservados que permite el uso de cebadores universales para generar comparaciones y conclusiones robustas en diferentes tipos de análisis (Folmer *et al.*, 1994; Zhang & Hewitt, 1997). Además, el gen mtCOI posee un rango amplio de señales filogenéticas, particularmente en la tercera posición de los tripletes, lo que genera que la tasa de evolución molecular sea casi tres veces mayor comparada con otros genes tales como 12S o 16S. Por lo que permite la discriminación no solo de especies cercanamente relacionada, sino además de grupos filogeográficos dentro de una misma especie (Knowlton & Weight, 1998). Este gen, al poseer una tasa de mutación más rápida, comparada con otros genes mitocondriales tales como el ND4 (Freeland, 2005), permite el análisis de polimorfismos nucleotídicos dentro de una misma especie a diferencia del ND4 que es utilizado para analizar diferencias nucleotídicas a nivel de género o familia.

Diversos trabajos se han llevado a cabo con artrópodos, un ejemplo es el desarrollado por Arrivillaga *et al.* (2003) que al trabajar con poblaciones crípticas de dípteros de la familia Psychodidae (*Lutzomyia longipalpis*) observaron cuatro clados que confirman la existencia de cuatro especies en distintos rangos geográficos.

Hebert *et al.* (2003) establecen que el gen mtCOI puede servir como base de un sistema de bioidentificación global para animales, ya que han demostrado que perfiles

de COI, derivados de la baja densidad de muestreo de categorías taxonómicas superiores, asignan taxones que corresponden al filo u orden apropiado. También han constatado que las asignaciones a nivel de especie pueden obtenerse mediante la creación de perfiles COI completos. Por ejemplo, un perfil COI modelo, basado en el análisis de un solo individuo, empató 100% con cada una de las 200 especies emparentadas de lepidópteros estudiadas. Proponen que una identificación por medio de COI puede proporcionar una solución confiable, rentable y accesible a la identificación de especies.

De igual forma Liu *et al.* (2006), mediante el uso de los marcadores moleculares ISSR, ITS2 y mtCOI, demostraron que diferentes brotes de *Bactericera cockerelli* Sulc (Hemiptera: Psyllidae) eran resultado de un rango simple de expansión o la evolución de un nuevo biotipo de psílido. Señalaron que las secuencias encontradas mostraban pequeñas diferencias entre poblaciones, indicativo de que se trataba de una sola especie, apoyando la hipótesis de que los psílicos de la localidad estudiada podían estar divergiendo en biotipos separados.

Específicamente para estudiar la variación genética entre poblaciones, dentro de poblaciones y entre especies de *D. citri* en países como EUA, Brasil, Irán y Pakistán se han empleado microsatélites polimórficos, y el citocromo oxidasa mitocondrial 1 (mtCOI) (Boykin *et al.* 2012, López-Piñón *et al.* 2012), por lo que el uso de dichas técnicas moleculares se mantiene como referente para la identificación de haplotipos o biotipos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Material biológico

Un total de 188 individuos de *D. citri* de la región citrícola de Cazes, Veracruz, procedentes de diferentes hospederos, fueron considerados para este estudio. El grupo comprendió tanto hembras como machos (Cuadro 1) que fueron separados de la muestra total por presentar aparentes diferencias fenotípicas en talla, color, patrones de maculación o tamaño de procesos genales.

Los especímenes recolectados, por fecha y hospedero, con su respectiva etiqueta, se conservaron en alcohol al 70% para su procesamiento. A cada individuo se le asignó el código alfanumérico existente en la colección, para relacionar su información con cada prueba a lo largo del estudio.

Cuadro 1. Muestras utilizadas para la caracterización morfométrica, amplificación de RAPDs y mtCOI de adultos de *Diaphorina citri* recolectados en diferentes hospederos en Cazes, Veracruz.

Hospedero	Nombre común	Morfometría		RAPDs		mtCOI	
		♂	♀	♂	♀	♂	♀
<i>C. limetta</i> Risso	Lima	10	12	3	7	2	3
<i>Citrus volkameriana</i>	Limón	6	6	2	3	0	2
<i>Murraya paniculata</i> (L.) Jack	Murraya	18	26	8	14	0	3
<i>C. sinensis</i> L. cv. 'Marrs'	Marrs	26	28	14	14	3	5
<i>C. sinensis</i> 'Selección 8'	Selección 8	8	10	3	6	1	2
<i>C. sinensis</i> cv. 'Valencia'	Valencia	14	18	5	11	1	1
<i>C. paradisi</i> Macfad cv. 'Río Red'	Pomelo	2	4	1	3	1	1
		84	104	36	58	8	17
Total		188		94		25	

4.2 Caracterización morfométrica

Los 188 individuos seleccionados se procesaron para determinar, con base en cinco caracteres morfológicos, la presencia de variación morfométrica (Hollis, 1987). Cada individuo se disectó bajo el microscopio para separar el ala anterior derecha. El espécimen y ala fueron dispuestos en alcohol al 70%. Se realizaron montajes en portaobjetos, usando gel y glicerina, para evitar deshidratación, y realizar la toma fotográfica por espécimen de cada estructura. La medición de las estructuras se realizó con el programa Image Tool 3.0 (Wilcox *et al.*, 2002). Se realizaron las siguientes

mediciones: longitud del cuerpo (LC), longitud de las alas (LA), amplitud del ala (AA), longitud de los procesos genales (LPG) y amplitud de los procesos genales (APG); los criterios de medición se hicieron con base en lo reportado por García-Pérez *et al.*, (2013)

Los datos morfométricos se sometieron a un análisis multivariado varianza (MANOVA) con una comparación de medias con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) en el programa SAS 9 para Windows. Para definir cuáles de los cinco caracteres estudiados aportaban mayor variabilidad, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) usando la matriz de correlaciones mediante la asistencia del programa Minitab versión 15 (Minitab Inc., 2007) (Fig. 3).

4.3 Caracterización genética

4.3.1 Extracción de ADN

El ADN fue extraído individualmente de especímenes adultos de *D. citri* preservados en etanol al 70%. Previo a la extracción de ADN, los especímenes fueron lavados con 20 μ l de agua durante 10 segundos, realizando dicho procedimiento por triplicado, con la finalidad de eliminar el alcohol. Posteriormente el insecto se maceró en un tubo de 1.5 mL, con ayuda de un micropistilo (Diagger Company Inc.), en 200 μ L de buffer de extracción previamente calentado a 60° en baño maría (2% CTAB, 1.4 M NaCl, 0.1 M de Tris-HCL pH 8.0 y 0.5% β -mercaptoetanol) de acuerdo al protocolo desarrollado por Gibbs & Mackenzie (1997), con modificaciones menores. La pastilla final de DNA se disolvió en 20 μ L de agua destilada estéril. La concentración de ADN extraídos de cada una de las muestras se determinó en un espectómetro NanoDrop™ 2000c (UV-Vis Spectrophotometer, Thermo Scientific).

4.3.2 Patrones de amplificación por RAPDs

Para establecer la existencia de diversidad en las poblaciones en estudio, se evaluaron previamente 10 iniciadores universales del Kit OPA (Operon Technologies, California, USA), de los cuales se seleccionaron los iniciadores OPA 09 (5' – GGGTAACGCC- 3'), OPA 11 (5' –CAATCGCCGT- 3') y OPA 018 (5' –

AGGTGACCGT- 3') por presentar patrones de amplificación adecuados para cubrir los objetivos del estudio.

De acuerdo a la buena calidad de ADN se seleccionaron 94 organismos (58 hembras y 36 machos) de diferentes hospederos, para amplificar fragmentos polimórficos de ADN al azar (Cuadro 1).

La reacción RAPD-PCR se realizó en un volumen final de 20 μ L, la cual contenía 2.5 μ L de buffer 10X (200 mM tris HCl [pH 8.4], 500 mM KCl); 0.5 U de *Taq* Polimerasa, 2 mM de MgCl₂ (Invitrogen ®), 0.2 mM de oligonucleótido, 1.5 μ L de dNTPs y 1.5 μ L de ADN. Las reacciones de PCR con un volumen final de 20 μ L, se calentaron a 94°C por cinco minutos; 40 ciclos de desnaturalización a 94°C por un minuto, alineamiento a 36°C por un minuto, extensión a 72°C por dos minutos; extensión final de 15 minutos a 72°C en un termociclador C1000™ (BIO-RAD®). El producto de PCR se observó por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% (Ultra pure™, Gibco®) teñido con bromuro de etidio (10 mg/uL), en buffer TAE 1X a 80V por 1.15 h. Los productos se visualizaron en un transiluminador (Gel Doc XR, BIO-RAD®) con luz UV.

Para cada marcador RAPD se creó una matriz binaria, donde las filas correspondieron a un marcador definido por los primers que lo amplificaron y por su peso molecular, mientras que las columnas correspondieron a los genotipos. Para cada posición *ij* se asignó el valor de “1” cuando estuvo presente el marcador *i* en el genotipo *j*, y “0” cuando estuvo ausente.

4.3.3 Análisis de Resultados

Para cada marcador RAPD se creó una matriz binaria, donde las filas correspondieron a un marcador definido por los oligonucleótidos que lo amplificaron y por su peso molecular, mientras que las columnas correspondieron a los genotipos. Para cada posición *ij* se asignó el valor de “1” cuando estuvo presente el marcador *i* en el genotipo *j*, y “0” cuando estuvo ausente. La matriz binaria se utilizó para un análisis de conglomerados, usando el programa FreeTree ver. 0.9.1.50 (Pavlicek *et al.*, 1999) y se visualizaron con el programa TreeViewX ver. 0.5.0 (Page, 2004).

4.3.4 Amplificación del Gen COI

El ADN de 25 individuos de *D. citri* de diversos hospederos que presentaron diferencias en cuanto a patrones de bandas en el análisis de RAPDs fue utilizado para amplificar el fragmento *mtCOI*. Dicha región se amplificó utilizando un fragmento del gen mitocondrial de la Citocromo oxidasa subunidad I (*mtCOI*), mediante los oligonucleótidos específicos para *D. citri*: DCITRI COI-L (forward: 5'-AGGA GGTGGAGACCCAATCT-3') y DCITRI COI-R (reverse: 5'-TCAATTGGGGGA GAGTTTTG-3') reportados por Hunter *et al.*, (2009) y Boykin *et al.*, (2012). Estos fragmentos amplifican ~821 pb de la región *mtCOI*. La reacción de PCR se realizó en un volumen total de 20 μ L, la cual contenía 2 μ L de buffer 10X (Tris-Cl, KCl, [NH₄]2SO₄, 15 mM MgCl₂; pH 8.0), 0.3 mM de oligonucleótidos, 0.2 mM de dNTP's (Promega®), 0.5 U de *Taq* Polimerasa, 1.25 mM de MgCl₂ (Thermo Scientific®) y 50ng/uL de ADN. La amplificación se realizó en un termociclador MyCycler™ (BIO-RAD®). Se realizó el siguiente programa de amplificación: 94°C durante dos minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineamiento a 53°C por 30 segundos, extensión a 72°C por un minuto, y una extensión final de 72°C por 10 minutos. Los productos generados se visualizaron en un gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X, en una cámara de electroforesis a 80v por 30 minutos. Los productos de PCR se visualizaron en transiluminador (BIO-RAD®), adicionando bromuro de etidio (100 ng/uL). Los productos de amplificación se enviaron para su secuenciación (Macroigen®, Corea del Sur), (Cuadro 1).

Las secuencias obtenidas para los fragmentos amplificados se editaron basándose en el electroferograma, y analizaron mediante un alineamiento por homología utilizando el programa *Clustal W* implementado en la versión 6.0 del programa Mega (Tamura *et al.*, 2013). La robustez de los dendogramas generados se analizó con el método Bootstrap con 1000 repeticiones (Felsenstein, 1985). Se incluyó la secuencia completa de ADNmt del psílido formador de agallas, *Pachypsylla venusta* (GenBank NC-006157), como grupo externo (Boykin *et al.*, 2012; Lashkari *et al.*, 2013a)

5. RESULTADOS

De acuerdo a las claves utilizadas, todos los especímenes estudiados en los diferentes hospederos de la región de Cazones, Veracruz, correspondieron a *D. citri*, en los que se corroboraron las características distintivas de esta especie (Burckhardt, 2007).

5.1 Caracterización Morfométrica

Los individuos que contenían aparentes diferencias morfológicas provenían de los hospederos de *M. paniculata*, *C. sinensis* cv. ‘Marrs’ y en menor cantidad de pomelo *C. paradisi*. El análisis de varianza indicó diferencias significativas respecto a las variables observadas ($F=16.99$ $GL= 5$ $p \leq 0.05$). En general las hembras fueron más grandes que los machos y en ambos sexos se observaron diferencias significativas en cada una de las variables observadas con respecto al hospedero ($p \leq 0.05$) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Medidas promedio de cinco caracteres morfológicos (mm) (\pm error estándar) en machos y hembras de *Diaphorina citri* recolectados en diferentes hospederos rutáceas en Cazones, Veracruz, México.

Hospedero	Machos				
	LC ^a	LPG	APG	LA	AA
Lima	1.85 \pm 0.01ab ^b	0.28 \pm 0.001ab	0.22 \pm 0.001ab	2.12 \pm 0.004ab	0.76 \pm 0.001b
Limón	1.94 \pm 0.01bc	0.25 \pm 0.001b	0.21 \pm 0.001ab	2.51 \pm 0.004a	0.80 \pm 0.001ab
Marrs	1.86 \pm 0.01b	0.27 \pm 0.001ab	0.20 \pm 0.001c	2.10 \pm 0.004ab	0.78 \pm 0.001ab
Murraya	1.93 \pm 0.01abc	0.23 \pm 0.001b	0.22 \pm 0.001ab	2.11 \pm 0.004ab	0.79 \pm 0.001ab
Pomelo	1.87 \pm 0.01ab	0.28 \pm 0.001ab	0.22 \pm 0.001abc	2.02 \pm 0.004b	0.81 \pm 0.001a
Sel. 8	1.96 \pm 0.01a	0.31 \pm 0.001a	0.23 \pm 0.001a	2.12 \pm 0.004ab	0.79 \pm 0.001ab
Valencia	1.93 \pm 0.01ab	0.27 \pm 0.001ab	0.22 \pm 0.004ab	2.12 \pm 0.004ab	0.78 \pm 0.001ab
Hembras					
Lima	1.82 \pm 0.03c	0.28 \pm 0.001ab	0.21 \pm 0.001ab	2.23 \pm 0.002ab	0.83 \pm 0.001ab
Limón	2.10 \pm 0.03a	0.29 \pm 0.001ab	0.22 \pm 0.004b	2.26 \pm 0.001a	0.83 \pm 0.001ab
Marrs	1.87 \pm 0.03ab	0.28 \pm 0.001ab	0.23 \pm 0.004ab	2.20 \pm 0.001ab	0.83 \pm 0.001ab
Murraya	1.88 \pm 0.03ab	0.27 \pm 0.001b	0.23 \pm 0.004ab	2.18 \pm 0.001b	0.82 \pm 0.001b
Pomelo	1.85 \pm 0.03b	0.31 \pm 0.001a	0.24 \pm 0.004a	2.25 \pm 0.002ab	0.83 \pm 0.001ab
Sel. 8	1.94 \pm 0.03ab	0.29 \pm 0.001ab	0.22 \pm 0.004ab	2.22 \pm 0.001ab	0.83 \pm 0.001ab
Valencia	2.02 \pm 0.03a	0.30 \pm 0.001a	0.23 \pm 0.004ab	2.26 \pm 0.001a	0.84 \pm 0.001a

^a Caracteres morfológicos: LC= Longitud de cuerpo, LPG= Longitud de los procesos genales, APG= Ancho de procesos genales, LA= Longitud de alas, AA= Ancho de alas.

^b Medias con la misma literal dentro de cada variable son estadísticamente iguales (Tukey, $p \leq 0.05$).

De la muestra total de individuos (188), se separaron 25 de ellos con rasgos fenotípicos marcados que diferían del patrón típico; el 8.0% se distinguió por presentar

una talla corporal (LC) mayor que el promedio general, 20.0% presentaron medidas extremas en el ancho y largo de procesos genales (PGA y PGL) (Figura 2), el 12.0% del total mostró un ancho de alas (AA) mayor (0.92mm) y menor (0.6mm) que los demás organismos, así como el 24.0% resultó significativamente diferente en cuanto al largo de alas (LA) se refiere. Como característica adicional, se observó que el 16% de los psílidos presentó diferencias en los patrones de venación o mayor número de celdas en regiones intervenales (Cuadro 3 y Figura 1).

Cuadro 3. Individuos de *D. citri*, caracterizados en el estudio, con rasgos fenotípicos que difieren del patrón típico.

Hospedero	LC		APG		LPG		AA		LA		Venación		Total
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	
<i>C. sinensis</i> 'Marrs'	0	1	1	1	1	0	0	0	2	1	1	1	9
<i>C. sinensis</i> 'Valencia'	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	3
<i>C. paradisi</i>	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	3
<i>C. limetta</i>	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	4
<i>C. volkameriana</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	2
<i>M. paniculata</i>	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	1	0	4
<i>Total</i>	0	2	2	3	3	2	1	2	4	2	3	1	25
<i>%</i>	8.0		20.0		20.0		12.0		24.0		16.0		100



Figura 1. Variantes morfométricas de las alas anteriores encontradas en *Diaphorina citri*. A) Venación típica del ala anterior. B) Macho recolectado en pomelo; vena transversal adicional (CP30CAPO-10C) C) Macho recolectado en Murraya; vena adicional (CP30CAMU-137C) D) Macho recolectado en Naranja 'Marrs'; vena M_{3+4} ausente (CP30CANM-15B) Escala: 1mm.

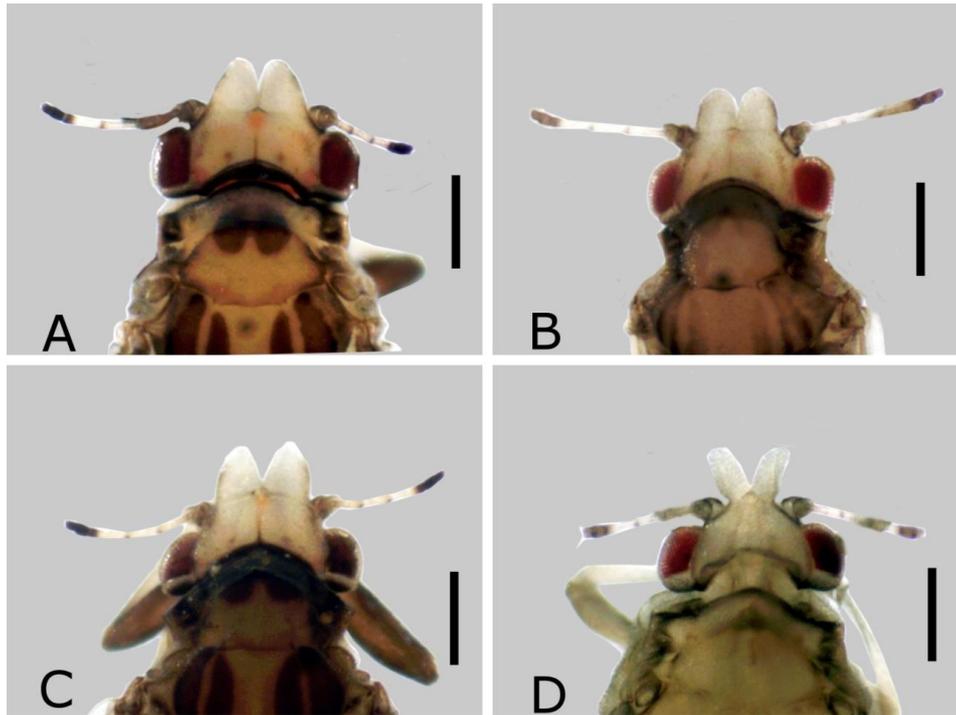


Figura 2. Variantes morfométricas de los procesos genales encontradas en *Diaphorina citri*. A) Macho recolectado en Lima; procesos genales cónicos con ápices redondeados (CP30CALI-83B). B) Hembra recolectada en naranja 'Marrs'; procesos genales cónicos, cuadrados (CP30CAS8-70A) C). Hembra recolectada en lima; procesos genales largos y separados (CP30CALI-75B). D) Macho recolectado en naranja 'Marrs'; procesos genales fuertemente separados, alargados y aplanados (CP30CANM-90D). Escala 250 μ m.

El análisis de componentes principales (ACP) indicó que el largo y ancho de las alas (LA y AA, respectivamente) aportaron mayor variabilidad. En el primer componente (CP1) las variables determinantes fueron la amplitud de las alas tanto para las hembras como para machos, lo cual puede interpretarse como un índice de amplitud alar; para el componente dos (CP2) fueron la longitud de las alas en ambos casos; finalmente el tercer componente principal fue tanto para hembras y machos, la amplitud de los procesos genales. Conjuntamente los componentes explican el 70.4% del total de la variabilidad en las hembras y 64.1% en los machos, resultado que indica que las hembras presentan mayor variabilidad que los machos (Cuadro 4).

Cuadro 4. Variabilidad estadística por carácter morfológico de machos y hembras de *Diaphorina citri* de diferentes hospederos en Cazones, Veracruz, México

Machos					
Variable	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5
LC ^a	0.434	0.201	0.775	0.286	0.298
PGL	0.278	0.571	-0.447	0.598	-0.202
PGA	0.152	0.680	-0.001	-0.717	0.011
LA	0.573	-0.272	-0.442	-0.127	0.621
AA	0.619	-0.311	0.067	-0.175	-0.696
Valor propio	1.7319	1.4706	0.8966	0.5439	0.3570
Proporción	0.346	0.294	0.179	0.109	0.071
Acumulada	0.346	0.641	0.820	0.929	1.000
Hembras					
Variable	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5
LC	-0.429	0.174	-0.767	0.443	-0.035
PGL	-0.441	-0.439	-0.277	-0.726	0.098
PGA	-0.305	-0.743	0.300	0.510	-0.072
LA	-0.513	0.336	0.333	-0.113	-0.705
AA	-0.516	0.334	0.367	0.063	0.698
Valor propio	2.4741	1.0445	0.7055	0.4963	0.2797
Proporción	0.495	0.209	0.141	0.099	0.056
Acumulada	0.495	0.704	0.845	0.944	1.000

^aCaracteres morfológicos: LC= Longitud del cuerpo, PGL= Proceso genal largo, PGA= Proceso genal ancho, LA= Longitud de alas, AA= Ancho de alas.

5.2 Caracterización genética

El planteamiento original de este trabajo se razonó en función de que diferencias genéticas entre los individuos colectados traen como consecuencia variaciones en los patrones fenotípicos. Por este motivo se determinó la variación genética entre diferentes individuos, considerando tanto hembras como machos.

Si bien las amplificaciones a partir del ADN de los 94 individuos de *D. citri* evaluados mostraron patrones de amplificación diferenciales entre la población, no se esperaba tan alta variación considerando que los individuos provenían de la misma población geográfica. Por ejemplo, en el patrón de amplificación obtenido utilizando el iniciador 018 (Figura 3, carril 7), el individuo CP30CAMU-15B mostró un perfil de amplificación completamente diferente al resto de la población evaluada. Esto mismo se confirmó en el dendograma generado a partir de los datos de los patrones de amplificación (Figura 4), donde este mismo individuo no se agrupa con el resto de la población.

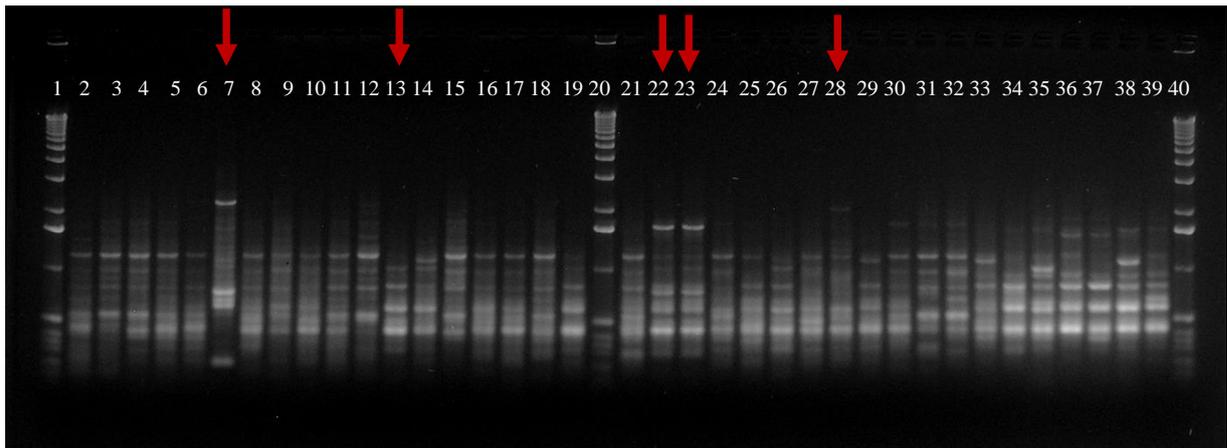


Figura 3. Gel de agarosa al 2% que muestra los fragmentos amplificados del iniciador OPA 018.

El dendograma agrupó a todos los individuos en tres grandes grupos (Figura 4); sin embargo, al haber un ramal representado por un solo individuo (Grupo III, CP30CAMU-15B), sólo se consideró la formación de dos grandes grupos, el I formado por dos grandes subgrupos (IA y IB) (Figura 4). Con base en éstos resultados se infiere el hallazgo de tres grupos distantes genéticamente, y un solo individuo que presenta grandes diferencias frente a toda la población. No obstante lo anterior, considerando el hospedero de donde fueron capturados, no se observa tendencia alguna de individuos relacionados genéticamente que estén a su vez relacionados con algún hospedero en particular, ya que representantes aislados en todos los hospederos, se presentaron en todos los grupos. Si bien hay un pequeño subgrupo (IA1), conformado por individuos que mayormente fueron aislados de naranja ‘Marrs’, en el resto de los grupos no se observa esa tendencia.

De los organismos que se separaron en ramas independientes en el dendograma, se seleccionaron 25 muestras (Cuadro 5) que se amplificaron por PCR con los oligonucleótidos para *D. citri*: DCITRI COI-L (forward: 5'-AGGAGGTGG AGACCCAATCT-3') y DCITRI COI-R (reverse: 5'-TCAATTGGGGGAGAGTTTTG-3') reportados por Hunter *et al.*, (2009).

Se obtuvieron un total de nueve secuencias con las características necesarias para el análisis filogenético (Cuadro 6). Las secuencias parciales del mtCOI tuvieron una longitud de 650 a 820 pb.

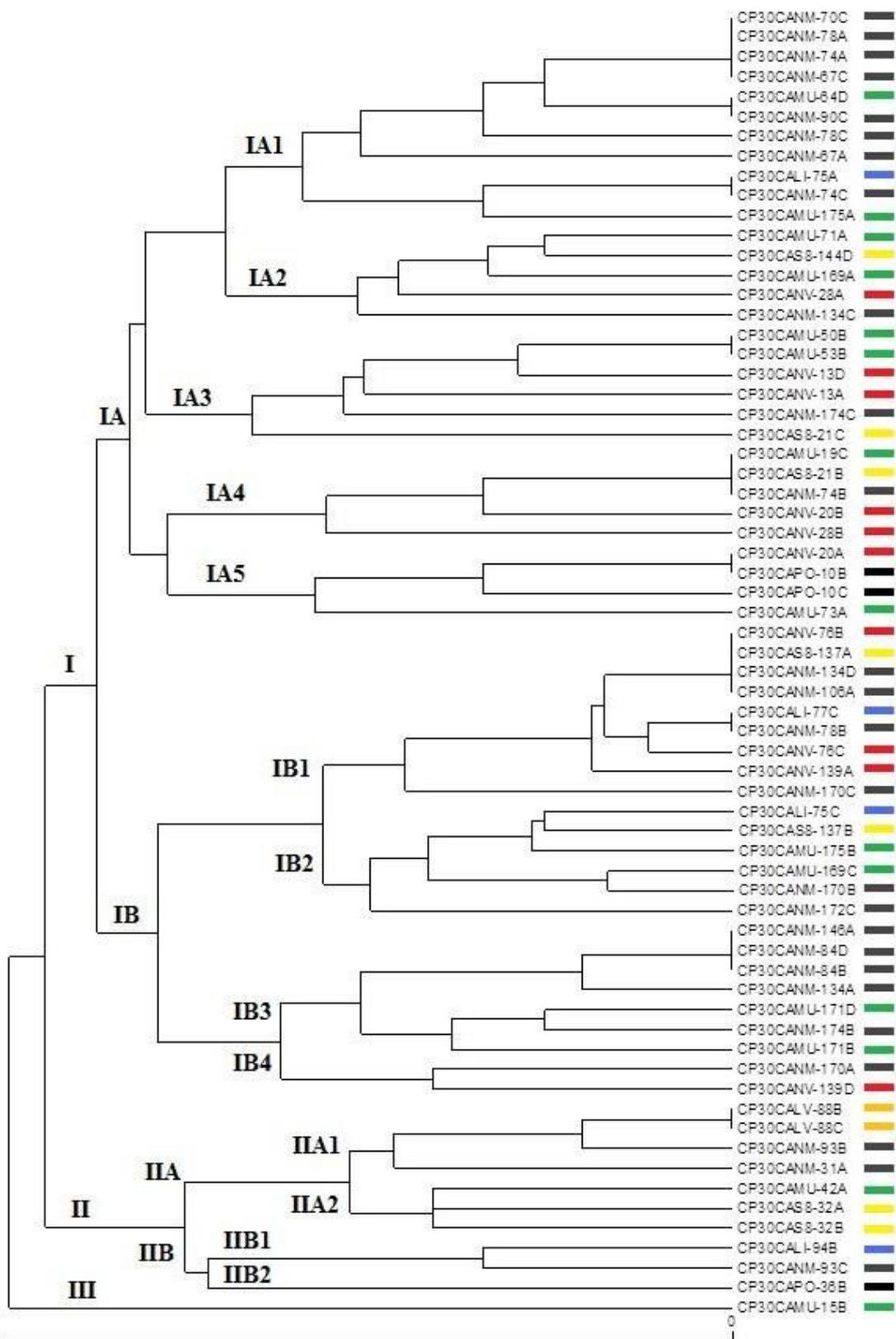


Figura 4. Dendrograma construido a partir de marcadores RAPDs. Con el criterio de UPGMA y 1000 repeticiones con Boothstrap. Cada color representa un hospedero.

Cuadro 5. Muestras amplificadas por PCR que se enviaron a secuenciación.

Clave	Sexo	Hospedero	Clave	Sexo	Hospedero
CP30CAPO-10C	♂	Pomelo	CP30CALI-83A	♀	Lima
CP30CANM-15B*	♀	Naranja marrs	CP30CALI-83C*	♂	Lima
CP30CANV-20B*	♀	Naranja valencia	CP30CALI-87A	♀	Lima
CP30CAPO-36B	♀	Pomelo	CP30CALI-87C	♂	Lima
CP30CAMU-42A*	♀	Murraya	CP30CALV-88B	♀	Limón
CP30CAMU-58A*	♀	Murraya	CP30CANM-93B	♀	Naranja Marrs
CP30CANM-74A*	♀	Naranja Marrs	CP30CANM-93C	♂	Naranja Marrs
CP30CANV-76C*	♂	Naranja valencia	CP30CAS8-137A	♀	Naranja sel.8
CP30CALI-77B*	♀	Lima	CP30CAS8-137B	♀	Naranja sel. 8
CP30CANM-78B	♀	Naranja Marrs	CP30CAS8-137C*	♂	Naranja sel. 8
CP30CANM-78C	♂	Naranja Marrs	CP30CANM-146C	♂	Naranja Marrs
CP30CAMU-79A	♀	Murraya	CP30CANM-170A	♀	Naranja Marrs
CP30CALV-82A	♀	Limón			

*muestras que presentaron secuencias con las características necesarias para análisis filogenético.

Cuadro 6. Muestras utilizadas para el análisis filogenético con número de acceso a GenBank.

Clave	Núm. Acceso Gen Bank	Sexo	Hospedero
CP30CANM-15B	KJ453889	♀	Naranja 'Marrs'
CP30CANV-20B	KJ453890	♀	Naranja 'Valencia'
CP30CAMU-42A	KJ458391	♀	Murraya
CP30CAMU-58A	KJ453897	♀	Murraya
CP30CANM-74A	KJ453896	♀	Naranja 'Marrs'
CP30CANV-76C	KJ453892	♂	Naranja 'Valencia'
CP30CALI-77B	KJ453893	♀	Lima
CP30CALI-83C	KJ453894	♂	Lima
CP30CAS8-137C	KJ453895	♂	Naranja selección 8'

El dendograma obtenido mediante el método de máxima verosimilitud (EMV) se muestra en la Figura 5. Con base en la distancia genética de las secuencias, se infiere que las poblaciones separan en cuatro haplotipos distintivos (H1, H2, H3 y H4). Posteriormente, se generó una red de haplotipos con el programa TCS (Clement *et al.*, 2000) donde nuevamente se distinguen cuatro haplotipos (Figura 6), el haplotipo 1 (H1) que corresponde a las muestras CP30CANV-76C, CP30CAS8-137C, CP30CANV-20B, CP30CANM-74A, CP30CAMU-58A y CP30CALI83C; el haplotipo 2 (H2) que pertenece a la muestra CP30CALI-77B, el haplotipo 3 (H3) corresponde a

CP30CANM-15B y finalmente, el haplotipo 4 (H4) que corresponde a la muestra CP30CAMU-42A.

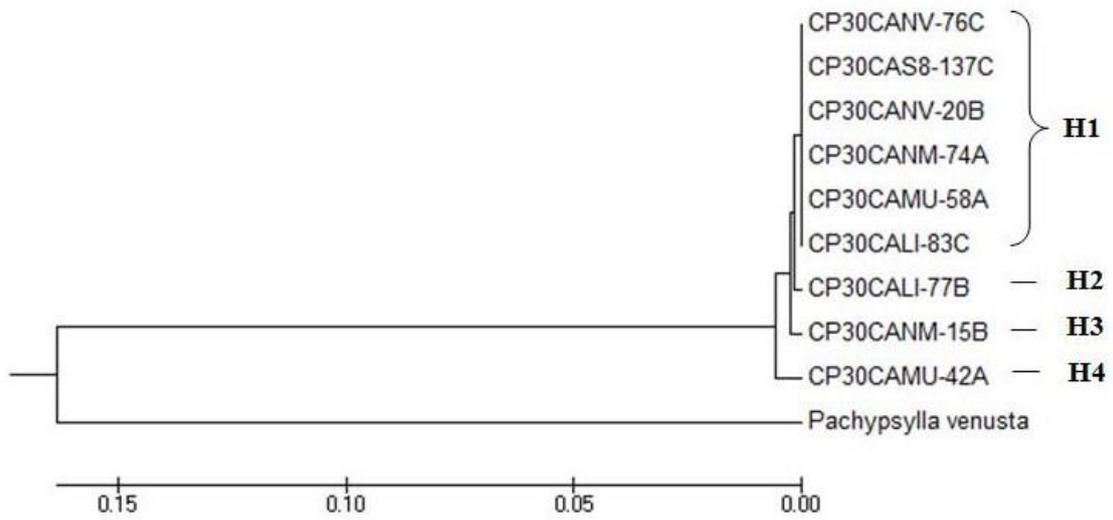


Figura 5. Reconstrucción filogenética con fragmentos del gen mitocondrial COI para poblaciones de *D. citri* generado por el método de Máxima verosimilitud.

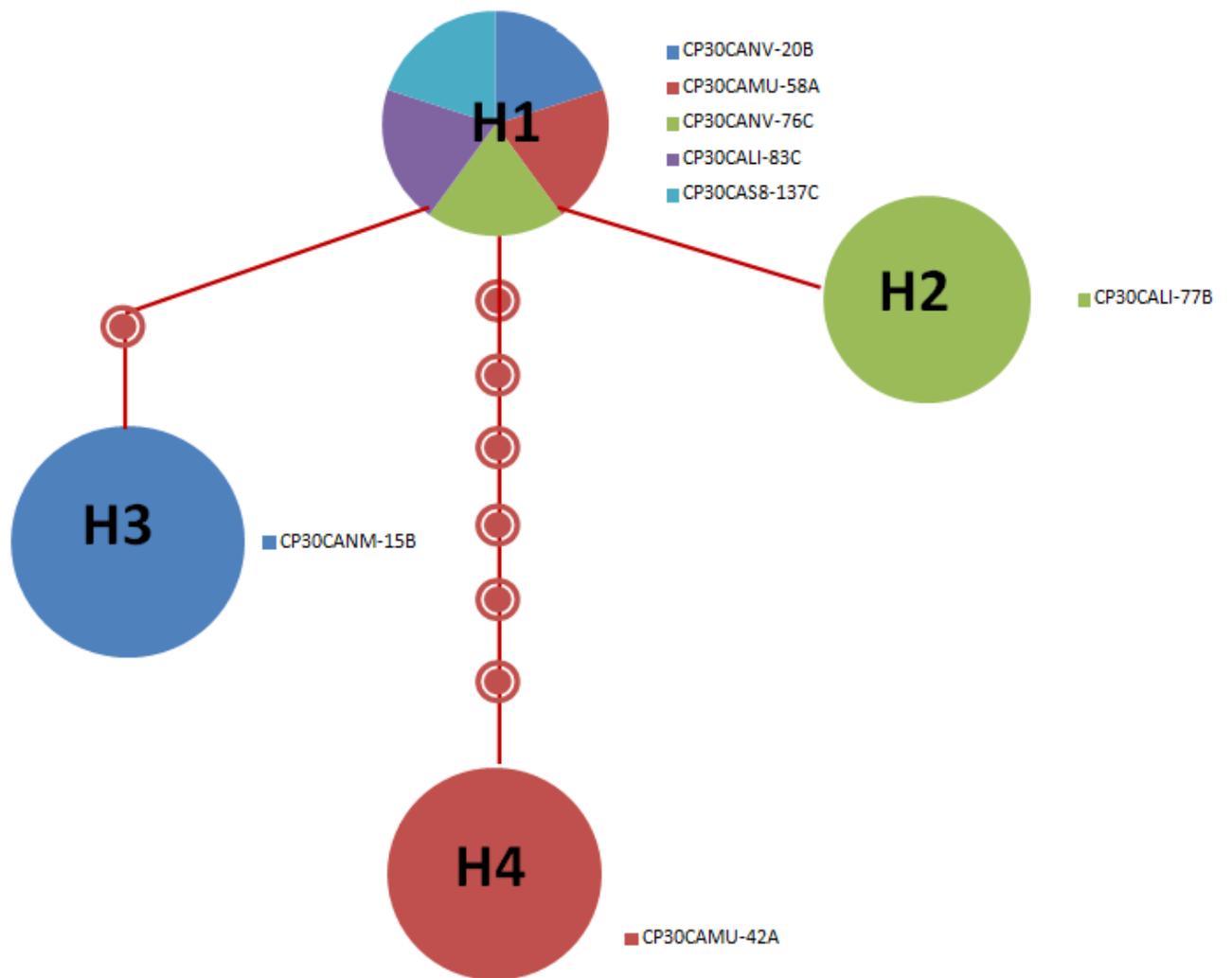


Figura 6. Red de haplotipos con fragmentos del gen mitocondrial COI para poblaciones de *D. citri*, generada por el TCS, donde el Haplotipo 1 (H1) es el más común.

6. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos establecen claramente la presencia de variaciones morfológicas de *D. citri*, confirmada por diferencias genéticas. Los análisis estadísticos demostraron que tanto la longitud, como el ancho de las alas y de los procesos genales fueron los caracteres con mayor variación. Según Ellestrand & Schierenbeck (2000) este aspecto está íntimamente relacionado con el proceso de adaptación, colonización, y quizás evolución que experimentan las especies exóticas e invasoras en un nuevo hábitat. Además de registrarse cambios en la longitud y ancho de las alas fue evidente en algunos individuos, principalmente machos (Figura 1), la modificación de la forma del ala y número de celdas en regiones intervenales, aspecto que ya había sido observado por Birdsall *et al.* (2000) en *Drosophila melanogaster* lo cual asociaron con cambios de temperatura y patrones genéticos definidos. En apoyo a esta hipótesis, De Celis & Diaz-Benjumea (2003) plantean que la generación de diferentes patrones alares requiere cambios en la regulación génica debido a que las venas de las alas de los insectos son cruciales para generar eficientes patrones de vuelo. Respecto a las variaciones en la talla de los procesos genales, Kristoffersen (2006) demostró, a través de técnicas electrofisiológicas, en *Trioza apicalis*, que dichas estructuras desempeñan una función importante en la selección y encuentro de la planta hospedera.

Las hembras resultaron más grandes que los machos y en ambos sexos los cambios morfométricos se dieron en el ancho y longitud de alas, largo y ancho de procesos genales y venación alar, esto coincide con lo reportado por García-Pérez *et al.* (2013). No hay correspondencia aparente con el hospedero. Diversos autores señalan que algunas especies de Psylloidea presentan polimorfismos estacionales, determinados genéticamente y asociados a diferencias en las tasas de desarrollo y reproducción (Araya *et al.* 1996, Wenninger *et al.* 2009), resistencia al parasitismo (Ankersmit *et al.* 1981), y tasa de ataque de enemigos naturales (Losey *et al.* 1997, Libbrecht *et al.* 2007) que implican diferencias relacionadas al tamaño, forma y venación del ala anterior, la presencia o intensidad de los patrones de maculación del ala anterior y la coloración corporal (Hodkinson, 2009; Wenninger *et al.* 2009).

La presencia de haplotipos refuerza las diferencias genéticas y que son el reflejo de la diversificación que posiblemente esté ocurriendo actualmente en campo. Si bien el número de muestras analizado es reducido frente a otros trabajos realizados con el gen mtCOI, y microsatélites (Boykin *et al.* 2007, 2012; Lashkari *et al.* 2013b), esto no

invalida el hecho de las diferencias genéticas existen. Por tanto, los resultados obtenidos aquí permiten inferir que hay relación entre los cambios morfométricos y los haplotipos encontrados, como se puede ejemplificar con el organismo CP30CANM-15B, cuya venación alar difirió de la típica de la especie (vena M_{3+4} ausente), genéticamente se separa de los otros organismos como un haplotipo diferente (H2) y presenta patrones diferenciales en los RAPDs. Es importante resaltar que en este estudio, la región mtCOI de *D. citri* permitió identificar cuatro haplotipos, uno más de lo reportado por Boykin *et al.* (2012).

La información, por tanto, demuestra que hay variación en la carga genética dentro de las poblaciones de *D. citri* establecidas en los diferentes hospederos en Veracruz, México, que puede ser expresada en diferentes características biológicas, incluyendo morfología, fisiología, comportamiento, frecuencia genética, ciclo biológico, interacción con plantas hospederas, efectividad positiva o negativa de sus parasitoides o en su habilidad para transmitir la bacteria; procesos evolutivos que de acuerdo a varios autores (Kim & McPherson 1993; Hoy & Nguyen, 2001; Hollis, 2004 y Boykin *et al.* 2007) pueden conducir a la formación de biotipos o ecotipos o diferencias taxonómicas en poblaciones locales, como ha sido demostrado con poblaciones del psílido de la papa *Bactericera cockerelli* nativas y recientemente introducidas en Norte América (Liu & Trumble, 2007).

Los resultados de este estudio, no permiten inferir que el hospedero tenga una relación directa con la formación de haplotipos, sin embargo, la preferencia de hospedero y su habilidad para colonizarlos determinan el éxito de adaptación en un nuevo hábitat (Moran, 1968; Hollis, 1987; Tsai & Liu, 2000).

Dado que en México se mantiene un flujo continuo de turistas y productos y subproductos cítricos, es de esperarse que continúen las introducciones de nuevas poblaciones que promuevan un incremento en la variación genética misma que puede expresarse en una mayor distribución o habilidad del psílido para colonizar nuevos hospederos o para transmitir la bacteria (Boykin *et al.*, 2012; Lashkari *et al.*, 2013a).

7. CONCLUSIONES

Se concluye que *D. citri* es una especie con variaciones morfométricas y genéticas y que el largo y ancho de las alas y de los procesos genales fueron los caracteres con mayor variación. Los análisis genéticos por medio de RAPDs y con las secuencias obtenidas con el gen mtCOI confirman la existencia de variantes en las poblaciones de *D. citri* estudiadas, agrupándolas en cuatro haplotipos asociados a cítricos en la región productora de Cazones, Veracruz. Existe cierta relación entre los cambios morfométricos y los haplotipos encontrados, aunque no están ligadas del todo al hospedero.

Por lo anterior es recomendable ampliar el estudio considerando un mayor número de individuos, entidades, hospederos, fechas de colecta, condiciones ambientales y de manejo, con el fin de identificar el mayor número de haplotipos y estudiar la relación que guardan con respecto a características biológicas, ecológicas, reproductivas y hospederos

Al contrario de García-Pérez *et al.* (2013), las hembras fueron más variables que los machos, esto puede deberse al tamaño de muestra presentado en este trabajo, por lo que se recomienda ampliar el número de ejemplares, delimitar el número de hospederos; sobre todo aquellos en los que se reporta más variación, como *C. limetta*, *C. sinensis* ‘Selección 8’, *C. sinensis* cv. ‘Marrs’ y *M. paniculata* (García-Pérez *et al.*, 2013; Tsai & Liu, 2002; Hodkinson, 2009) y poner especial atención en la relación de cambios en los patrones de venación alar con cambios en los sitios conservados del gen mtCOI.

8. AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por el apoyo financiero para la realización de este estudio como parte del proyecto FONSEC-SAGARPA-CONACYT 2009-10859: “Manejo de la Enfermedad Huanglongbing (HLB) mediante el control de las poblaciones del vector *Diaphorina citri*.”

9. LITERATURA CITADA

- Álvarez J. M., F. Menalled & M. A. Hoy. 2005. Las herramientas moleculares en el control biológico. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*. 74:4-11.
- Ammar E. D., A. J. Walter & D. G. Hall. 2013. New excised-leaf assay method to test inoculativity of Asian citrus psyllid (Hemiptera: Psyllidae) with *Candidatus Liberibacter asiaticus* associated with citrus Huanglongbing disease. *Journal of Economic Entomology*. 106(1): 25-35.
- Ankersmit G.W., T. M. Acreman & H. Dijkman. 1981. Parasitism of color forms in *Sitobion avenae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 29:362–363.
- Birdsall K., E. Zimmerman, K. Teeter & G. Gibson. 2000. Generic variation for the positioning of wing veins in *Drosophila melanogaster*. *Evolution and Development*. 2(1):16-24.
- Araya J. E., S. E. Cambron & R. H. Ratcliffe. 1996. Development and reproduction of two color forms of English grain aphid (Homoptera: Aphididae). *Environmental Entomology*. 25:366-369.
- Arrivillaga J., J. P. Mutebi, H. Piñango, D. Norris, B. Alexander, M. D. Feliciangeli & G. C. Lanzaro. 2003. The taxonomic status of genetically divergent populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae) based on the distribution of mitochondrial and isozyme variation. *Journal of Medical Entomology*. 40(5):615-627.
- Atkinson D. 1994. Temperature and organism size a biological law of ectotherms?. *Advances in Ecological Research*. 156:390-415
- Avisé J. C., J. Arnold, R. M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J. E. Neigel, C. A. Reeb & N. C. Saunders. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between populations genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematic*. 18:489-522.
- Bailey J. A. & M. J. Jeger. 1992. *Colletotrichum*. Biology, Pathology and Control. Redwood press. London. England. 388 p.
- Barrett S. C. H. & J. R. Kohn. 1991. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. In: *Genetics and Conservation of rare plants*. Ed. D. A. Falk, K. E. Holsinger. pp. 3-30. New York: Oxford Univ. Press. 238 pp.

- Bernays E. A., & R. F. Chapman. 1994. Host Plant Selection by Phytophagous Insects. Chapman and Hall, New York.
- Black W. C. 1995. Statistical analysis of arbitrarily primed PCR patterns in molecular taxonomic studies. *In: Methods in molecular biology, species diagnosis protocols: PCR and other nucleic acid methods.* Clapp C. L. Humana Press. 39-55pp.
- Bové J. M. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *J. Plant Pathology.* 88:7–37.
- Boykin L. M., Bagnall R. A., Frohlich D. R., Hall D. G., Hunter W. A., Katsar C. S., McKenzie C. L., Rosell R. C. & Shatters Jr. R. G. 2007. Twelve polymorphic microsatellite loci from the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama, the vector for citrus greening disease, huanglongbing. *Molecular Ecology Notes.* 7:1202-1204.
- Boykin L. M., P. De Barro, D. G. Hall, W. B. Hunter, C. L. McKenzie, C. A. Powell & R. G. Shatters Jr. 2012. Overview of worldwide diversity of *Diaphorina citri* Kuwayama mitochondrial cytochrome oxidase 1 haplotypes: two Old World lineages and New World invasion. *Bulletin of Entomological Research.* 102:573-582.
- Brown J. K. 2004. Tracing the origin of cryptic insect pests and vectors, and their natural enemies. *In: Ehler, L.E. Sforza, R. Mateille, T. (Eds.). Genetics, Evolution, and Biological Control.* Wallingford, UK. 113-132 pp.
- Burckhardt D. 2007. Order Sternorrhyncha, superfamily Psylloidea. *Arthropod fauna of the UAE.* 1: 159-169.
- Burckhardt D. & Y. Basset. 2000. The jumping plant-lice (Hemiptera:Psylloidea) associated with *Schinus* (Anacardiaceae): systematic, biogeography and host plant relationships. *Journal of Natural History.* 34:57-155.
- Burrell M. 1993. *Enzymes of molecular biology.* Human Press Inc. Totowa. New Jersey. USA. 372 p.
- Carroll S. P., H. Dingle, T. R. Famula & C. W. Fox. 2001. Genetic architecture of adaptative differentiation in evolving host races of the soapberry bug, *Jadera haemaroloma*. *Genetica.* 112:257-272.
- Chetry M., Gupta R. & Tara J. S. 2012. Bionomics of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) on *Citrus sinensis* in Jammu Region of J & K State. *Munis Entomology and Zoology Journal.* 7(1): 304-308

- Clement D., D. Posada & K. A. Crandall. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*. 9(10):1657-1660
- Dantur-Juri M. J., J. Liria, J. C. Navarro, R. Rodríguez & G. N. Fritz. 2011. Morphometric variability of *Anopheles pseudopunctipennis* (Diptera: Culicidae) from different ecoregions of Argentina and Bolivia. *Florida Entomologist*. 94(3):428-438.
- Darling J. A. & M. J. Blum. 2007. DNA-based methods for monitoring invasive species: a review and prospectus. *Biological Invasions*. 9:751-765.
- de Celis J. F. & F. J. Diaz-Benjumea. 2003. Developmental basis for vein pattern variations in insect wings. *Journal of Development Biology*. 47: 653-663.
- de León, J. H, W. A. Jones, M. Sétamou & D. J. W. Morgan. 2006. Genetic and hybridization evidence conWrms that a geographic population of *Gonatocerus morrilli* (Hymenoptera: Mymaridae) from California is a new species: Egg parasitoids of the glassy-winged sharpshooter *Homalodisca coagulata* (Homoptera: Cicadellidae). *Biological Control* 38:282-293.
- de León J. H., M. Sétamou, G. A. Gastaminza, J. Buenahora, S. Cáceres, P. T. Yamamoto, J. P. Bouvet & G. A. Logarzo. 2011. Two separate introductions of Asian citrus psyllid populations found in the American continents. *Annals of the Entomological Society of America*. 104(6):1392-1398
- de Rojas M., Riazco C., Callejón R., Guevara D. & Cutillas C. 2011. Morph biometrical and molecular study of two populations of *Demodex folliculorum* from humans. *Parasitology Research*. 110:227-233.
- Debat V., M. Bégin, H. Legout & J. R. David. 2003. Allometric and nonallometric components of *Drosophila* wing shape respond differently to developmental temperature. *Evolution*. 57: 2773–2784.
- Diehl S. & G. Bush. 1984. An evolutionary and Applied Perspective of Insect Biotypes. *Annals of the Entomological Society of America*. 29:471-504.
- Drés M. & J. Mallet. 2002. Host races in plant-feeding insects and their importance sympatric speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society Science*. 357:471-492.
- Dubey A. K., Ko C. C., B. V. David. 2008. The genus *Singhius* Takashi (Hemiptera: Aleyrodidae): with notes on pupal dimorphism and intraspecific variation, and a key to the species. *Zoological Studies*. 47(4):507-518.

- Ellstrand N. C. & K. A. Schierenbeck. 2000. Hybridization as a stimulus for the evolution of invasiveness in plants? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:7043-7050.
- Facon B., B. J. Genton, J. Shykoff, P. Jarne, A. Estoup & P. David. 2006. A general eco-evolutionary framework for understanding bioinvasions. *Trends in Ecology and Evolution.* 21:130-135.
- Feldman S. & Ntenda A. 2011. Phylogenetic analysis of *Myobia musculi* (Schrank, 1781) by using the 18S small ribosomal subunit sequence. *Comparative Medicine.* 61:484-491.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution.* 39:783-791.
- Filchak K. E., J. B. Roethele & J. L. Feder. 2000. Natural selection and sympatric divergence in the apple maggot *Rhagoletis pomonella*. *Nature.* 407:739-742.
- Folmer O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz & R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine biology and Biotechnology.* 3:294-299.
- Freeland J. 2005. *Molecular Ecology*. Ed. John Wiley & Sons. 388 pp.
- García-Pérez F., L. D. Ortega-Arenas, J. I. López-Arroyo, A. González-Hernández, J. R. Lomelí-Flores & J. Romero-Nápoles. 2013. Morphometry of *Diaphorina citri* (Hemiptera:Liviidae) on six Rutaceae from Veracruz, México. *Florida Entomologist.* 96(2):529-537.
- Gibbs A. & A. Mackenzie. 1997. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. *Journal of Virological Methods.* 63:9-16.
- Guirao P., F. Beitia & J. L. Cenis. 1994. Aplicación de la técnica RAPD-PCR a la taxonomía de moscas blancas (*Homoptera, Aleyrodidae*). *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas,* 20:757-764.
- Gurevitch J. & D. K. Padilla. 2004. Are invasive species a major cause of extinctions?. *Trends in Ecology and Evolution.* 19(9):470-474.
- Halbert S. E. & Manjunath K. L. 2004. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. *Florida Entomologist.* 87:330-353.
- Hebert P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball & J. R. deWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond.* 270:313-321.
- Hendrick P. 1992. Shooting the RAPDs. *Nature.* 355:679-680.

- Hodkinson I. D. 2009. Life cycle variation and adaptation in jumping lice (Insecta: Homoptera): an annotated check list. *Journal of Natural History*. 22:1179-1244
- Hollis D. 1987. A new citrus-feeding psyllid from the Comoro islands, with a review of the *Diaphorina amoena* species group (Homoptera). *Systematic Entomology*. 12:47-61.
- Hollis D. 2004. Australian Psylloidea. Jumping plant lice and lerp insects. Australian Biol. Resource Study. Australian Government, Canberra, Australia. 232 pp.
- Hoy M. A., A. Jeyaprakash & R. Nguyen. 2001. Long PCR is a sensitive method for detecting *Liberobacter asiaticum* in parasitoids undergoing risk assessment in quarantine. *Biological Control*. 22:278-287.
- Hughes C. R. & D. C. Queller. 1993. Detection of highly polymorphic microsatellite loci in a species with little allozyme polymorphism. *Molecular Ecology*. 2:131-137.
- Hunter W. B., S. E. Dowd, C. S. Katsar, R. G. Shatters Jr., C. L. McKenzie & D. G. Hall. 2009. Psyllid Biology: Expressed genes in adult Asian citrus Psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. *The open Entomology Journal*. 3:18-29
- Kim K. C. & B. A. McPheron, Eds. 1993. *Evolution of Insect Pests: the Pattern of Variations*. New York: John Wiley and Sons, Inc.
- Knowlton N. & L. A. Weight. 1998. New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama. *Proceedings of the Royal Society. B*. 265: 2257-2263.
- Krieger M. J. B. & K. G. Ross. 2002. Identification of a major gene regulating complex social behavior. *Science*. 295:328-332.
- Kristoffersen, L. 2006. Getting to know *Trioza apicalis* (Homoptera: Psylloidea) - a Specialist Host-Alternating Insect with a Tiny Olfactory System. Ph D. Dissertation. Lund University. Lund, Sweden. Pp 86.
- Lashkari M., S. Manzari, A. Sahragard, V. Malagnini, L. Boykin & R. Hosseini. 2013a. Global genetic variation in the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) and the endosymbiont Wolbachia: links between Iran and the USA detected. *Pest Management Science*. 8pp.
- Lashkari M., A. Sahragard, S. Manzari, F. Mozaffarian & R. Hosseini. 2013b. A geometric morphometric study of the geographic populations of Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hem.:Liviidae), in Iran and Pakistan. *Journal of the Entomological Society of Iran*. 33(2):59-71.

- Lee C. 2002. Evolutionary genetics of invasive species. *Trends in Ecology and Evolution*. 17(8):386-391.
- Lewter J. A., A. L. Szalanski, R. N. Nagoshi R. L. Meaguer, C. B. Owens & R. G. Luttrell. 2006. Genetic variation within and between strains of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Florida Entomologist*. 89(1): 63-67.
- Libbrecht R., D. M. Gwynn & M. D. E. Fellowes. 2007: *Aphidius ervi* preferentially attacks the green morph of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Journal of Insect Behaviour*. 20: 25–32
- Liu D. & J. T. Trumble. 2007. Comparative fitness of invasive and native populations of the potato psyllid (*Bactericera cockerelli*). *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 123: 35-42.
- Liu D., J. T. Trumble & R. Stouthamer. 2006. Genetic differentiation between eastern populations and recent introductions of potato psyllid (*Bactericera cockerelli*) into western North America. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 118:177-183.
- López-Piñón Juan. 2012. Caracterización genética de poblaciones de *Diaphorina citri* en diferentes estados de la República Mexicana mediante el marcador molecular mitocondrial citocromo-oxidasa subunidad I. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas. 25 p.
- López P. J., A. González H. & J. I. López A. 2012. Variación genética de poblaciones de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) en México, determinada con el marcador COI. Memorias del 3er simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido asiático de los cítricos y el Huanglongbing en México. 16-22.
- Losey J. E., A. R. Ives, J. Harmon, F. Ballantyne & C. Brown. 1997. A polymorphism maintained by opposite patterns of parasitism and predation. *Nature* 388:269–272
- Losos J. B. 1990. Ecomorphology, performance capability, and scaling of West Indian *Anolis* lizards: an evolutionary analysis. *Ecology Monographs*. 60:369-388.
- Maron J. L. M. Vilà, R. Bommarco, S. Elmendorf & P. Beardsley. 2004. Rapid evolution of an invasive plant. *Ecology Monographs*. 74:261-280.
- Mathur R. N. 1975. Psyllidae of the Indian Subcontinent. Indian Council of Agricultural Research, New Delhi. 20 pp

- McNeely J. A., H. A. Mooney, L. E. Neville, P. Schei & J. K. Waage (eds.). 2001. Estrategia mundial sobre especies exóticas invasoras, UICN Gland (Suiza) y Cambridge (Reino Unido), X+50 págs.
- MINITAB 15 Statistical Software. 2007. [Computer software]. State College, PA: Minitab, Inc.
- Mondragón-Jacobo C. 2002. Caracterización molecular mediante RAPDs de una colección de nopal de (*Opuntia* spp. Cactaceae) del centro de México, como base del mejoramiento genético. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*. 9(1):97-114.
- Moran V. C. 1968. The development of the citrus psylla, *Trioza erytreae* (Del Guercio) (Homoptera: Psyllidae), on *Citrus limon* and four indigenous host plants. *Journal of Entomological Society of South Africa*. 31(2): 390-402.
- Mueller U. G.; S. E. Lipari & M. G. Milgroom. 1996. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) fingerprinting of symbiotic fungi cultured by the fungus-growing ant *Cyphomyrmex minutus*. *Molecular Ecology*. 5:119-122.
- Nagoshi R., P. Silvie & R. Meagher. 2007. Comparison of haplotype frequencies differentiate fall armyworm (Lepidoptera:Noctuidae) corn-strain populations from Florida and Brazil. *Journal of Economic Entomology*. 100(3):954-961.
- Page R. D. M. 2004. Tree View X, Version 0.5.0 for Windows.
- Pavlicek A., S. Hrda & J. Flegr. 1999. Free tree- freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of the genus *Frenkelia*. *Folia Biologica*. 45:97-99
- Prentis P. J., J. R. U. Wilson, E. E. Dormontt, D. M. Richardson & A. J. Lowe. 2008. Adaptive evolution in invasive species. *Trends in Plant Science*. 13(6):288-293.
- Rafalski A. J., S. V. Tingey. 1993. Genetic diagnosis in plant breeding; RAPDs, microsatellites and machines. *Trends in Genetics*. 9:275-279.
- Reznick D. N. & C. K. Ghalambor. 2001. The population ecology of contemporary adaptations: what empirical studies reveal about the conditions that promote adaptive evolution. *Genetica*. 112:183-198.
- Roderick G. K. 2004. Tracing the origins of pests and natural enemies: genetic and statistical approaches. Pp. 97-112. *In: Ehler, L.E., Sforza, R., Mateille, T. (eds.). Genetics, Evolution, and Biological Control CABA International, Wallingford, UK.*

- Roderick G. K., & M. Navajas. 2003. Genes in new environments: genetics and evolution in biological control. *Nature Reviews Genetics*. 4:889-899.
- Rodrigues S. 2006. Estudos histopatológicos da mancha manteigosa em cafeeiro (*Coffea arabica* L.) e comportamento de isolados de *Colletotrichum* spp. em plantas obtidas por cultura de embrião. Tesis de Maestría en Agronomía con énfasis en Fitopatología. Universidade Federal de Lavras. Lavras, Brasil. 104 p.
- Roggero A. & P. P. d'Entrèves. 2005. Geometric morphometric analysis of wings variation between two populations of the *Scythris obscurella* species-group: geographic or interspecific differences? (Lepidoptera: Scythrididae). *SHILAP Revista de Lepidopterología*. 33(130): 101-112.
- Roistacher, C. N. 1996. The economics of living with citrus diseases: Huanglongbing (greening) in Thailand. pp. 279-285. *In*: J. V. Da Garcia, P. Moreno and R. K. Yokomi (eds.). Proceedings of the 13th Conference of the International Organization of Citrus Virologists, Univ. of California, Riverside.
- Ross K.G. & D. D. Shoemaker. 2008. Estimation of the number of founders of an invasive pest insect population: the fire ant *Solenopsis invicta* in the USA. *Proceedings of the Royal Society of London. Ser. B*. 275: 2231–2240.
- Salcedo, B. D., R. Hinojosa, G. Mora, I. Covarrubias, F. DePaolis, C. Cíntora & S. Mora. 2010. Evaluación del Impacto Económico de Huanglongbing (HLB) en la Cadena Citrícola Mexicana. México: IICA. Pp 124.
- Salinas H. 2010. Identificación de haplotipos de *Spodoptera fugiperda* en algunas poblaciones de Colombia para el estudio del comportamiento migratorio de la especie. Tesis de doctorado. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Facultad de Ciencias. 93 pp.
- Sakai M., F. W. Allendorf, J. S. Holt, D. M. Lodge, J. Molofsky, K. A. With, S. Baughman, R. J. Cabin, J. E. Cohen, N. C. Ellstrand, D. E. McCauley, P. O'Neil, I. M. Parker, J. N. Thompson & S. G. Weller. 2001. The population biology of invasive species. *Annual Review of Ecology and Evolution Systematics*. 32:305-332.
- Saraste M. 1990. Structural features of cytochrome oxidase. *Quarterly Reviews of Biophysics*. 23:331-366.
- Schluter D. & J. D. McPhail. 1992. Ecological character displacement and speciation in sticklebacks. *American Naturalist*. 140:85-108.

- SENASICA. 2012. Detección de Huanglongbing (*Candidatus Liberibacter asiaticus*) en el Municipio de Tizimin Yucatán, México. Dirección General de Sanidad Vegetal SAGARPA/SENASICA. Organización Norteamericana de Protección a las Plantas (NAPPO). Notificaciones oficiales de Plagas. [En línea] (disponible en www.pestalert.org) [Consulta Octubre 2013].
- SENASICA. 2014. Situación fitosanitaria actual. Huanglongbing de los cítricos. [En línea] (disponible en www.senasica.gob.mx) [Consulta 2014]
- Sheldon A. L. 1968. Size relationships of *Acroneuria californica* (Perlidae, Plecoptera) and its prey. *Hydrobiology*. 34:85-94
- SIAP Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Febrero 2011. Estadísticas del sector Agroalimentario y Pesquero. México: quinto productor de cítricos. Disemina Número 68. México, D. F.
- Smith D. C. & J. Van Buskirk. 1995. Phenotypic design, plasticity, and ecological performance in two tadpole species. *American Naturalist*. 154:211-233.
- Snorrason S. S., S. Skúlason, B. Jonsson, H. J. Malmquist, P. M. Jónasson, O. T. Sandlund & T. Lindem. 1994. Trophic specialization in Arctic charr *Salvelinus alpinus* (Pisces; Salmonidae): morphological divergence and ontogenic niche shifts. *Biological Journal of Linnean Society*. 52:1-18.
- Tamura K., G. Stecher, D. Peterson & S. Kumar. 2013. Mega 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30:2725-2729.
- Templeton A. R. 2006. Populations genetics and microevolutionary theory. Chapter 1: Scope and Basic Premises of Population Genetics. Eds. John Wiley & Sons, Inc. 700 p.
- Tierno de Figueroa J. M. & M. J. López-Rodríguez. 2005. Biometric relationships among female size, fecundity, and flight period in *Isoperla Nevada* Aubert 1952 (Plecoptera:Perlodidae). *Annals of the Entomological Society of France*. 41(1):3-6.
- Tingey V. S., J. I. Del Rufo. 1993. Genetic analysis with random amplified polymorphic DNA markers. *Plant Physiology*. 101:349-352.
- Travis J. 1994. Evaluating the adaptative role of morphological plasticity. In: *Ecological morphology: integral organismal biology*. P. C. Wainwright & S. M. Reilly (eds.). Chicago University Press. 99-122.

- Triapitsyn S. V., G. A. Logarzo, J. H. de León & E. G. Virla. 2008. A new *Gonatocerus* (Hymenoptera: Mymaridae) from Argentina, with taxonomic notes and molecular data on the *G. tuberculifemur* species complex. *Zootaxa* 1949:1-29.
- Trigiano R. N., G. Caetano-Anollés. 1998. Laboratory exercises on DNA amplification fingerprinting for evaluating the molecular diversity of horticultural species. *Horticultural Technology*. 8(3):413-423.
- Tsai J., J. Wang & Y. Liu. 2000. Sampling of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) on orange Jessamine in Southern Florida. *Florida Entomol.* 83(4):446-459.
- Tsai J., J. Wang & Y. Liu. 2002. Seasonal abundance of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) in Southern Florida. *Florida Entomologist*. 85(3):446-451.
- Tsutsui N. D., A. V. Suarez, D. A. Holway & T. J. Case. 2000. Reduced genetic variation and the success of an invasive species. *Proceedings of the Natural Academy of Science. USA.* 97:5948-5953.
- Vargas-Madriz H., N. Bautista-Martínez, J. Vera-Graziano, C. García-Gutiérrez & C. Chavarín-Palacio. 2011. Life and fertility table of *Bactericera cockerelli* (Sulc) on two varieties of tomato in a greenhouse. *Southwestern Entomologist*. 36(4):412-422.
- Westneat M. W. 1995. Feeding, function and phylogeny: analysis of historical biomechanics in labrid fishes using comparative methods. *Systematic Biology*. 44:361-383.
- Wenninger E. J., Stelinski L. L. & Hall D. G. 2009. Relationships between adult abdominal color and reproductive potential in *Diaphorina citri* (Hemiptera:Psyllidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 102(3): 476-483
- Wilcox D., B. Dove, D. Mc David & D. Greer. 2002. UTHSCSA Image Tool for Windows ver 3. 0. The university of Texas Health Science Center in San Antonio, U. S. A.
- Williams G. K. J., J. A. Rafalski & S. V. Tingey. 1992. Genetic analysis using RAPD markers. *Methods in Enzymology*. 218:704-740
- Williams G. K. J., J. A. Rafalski & S. V. Tingey. 1993. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18:6531-6535

Zhang D. & G. M. Hewitt. 1997. Insect mitochondrial control region: a review of its structure, evolution and usefulness in evolutionary studies. *Biochemical Systematics and Ecology Journal*. 25:99-120.