

**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO EN FITOSANIDAD**

**ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA**

**VARIACIÓN GENÉTICA DE  
POBLACIONES DE *Brevipalpus  
phoenicis* (ACARI:  
TENUIPALPIDAE), VECTOR DEL  
*Citrus leprosis virus* TIPO  
CITOPLÁSMICO**

**SÁNCHEZ VELÁZQUEZ EBER JOSUÉ**

**T E S I S**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO**

**2014**

La presente tesis titulada: **Variación genética de poblaciones de *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae), vector del *Citrus leprosis virus* tipo citoplásmico**, realizada por el alumno: **Eber Josué Sánchez Velázquez** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS  
FITOSANIDAD  
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

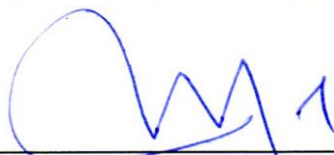
CONSEJO PARTICULAR



CONSEJERO

---

DRA. Ma. Teresa Santillán Galicia



ASESOR

---

DR. Gustavo Mora Aguilera



ASESOR

---

DR. Gabriel Otero Colina



ASESOR

---

M.C. Jorge Manuel Valdez Carrasco

Montecillo, Texcoco, Estado de México, enero de 2014

VARIACIÓN GENÉTICA DE POBLACIONES DE *Brevipalpus phoenicis* (ACARI: TENUIPALPIDAE), VECTOR DEL *Citrus leprosis virus* TIPO CITOPLÁSMICO

Eber Josué Sánchez Velázquez, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2014

*Brevipalpus phoenicis* es considerado un vector importante del *Citrus leprosis virus* C (CiLV-C) agente causal de la leprosis tipo citoplásmico, enfermedad que afecta cítricos de variedades dulces principalmente. En este estudio se obtuvieron muestras de *Brevipalpus phoenicis* en huertos de naranja dulce (*Citrus sinensis*) de ocho y 12 localidades de Brasil y México, respectivamente. La estructura poblacional, la variación genética, así como el análisis filogenético de las muestras recolectadas fueron estudiados a partir de secuencias de nucleótidos del gen citocromo oxidasa subunidad I (COI). Se observó la existencia de dos grupos morfológicos (“B” y “C”) en muestras de ambos países, siendo éste el primer reporte del grupo “C” en el territorio mexicano. La diversidad genética en las poblaciones de Brasil fue mayor con la presencia de 17 haplotipos mientras que las poblaciones mexicanas provenientes de Tabasco, Veracruz y Chiapas sólo presentaron cuatro. La mayor variación (44.92%) se observó entre las localidades de muestreo de cada país, seguida por la variación entre muestras de cada localidad (29.89%). Aunque el nivel de variación entre países fue bajo (25.18%), este fue significativo, sugiriendo que las poblaciones de ambos países están geográficamente estructuradas.

**Palabras clave:** morfoespecies, red de haplotipos, AMOVA.

GENETIC VARIATION OF POPULATIONS OF *Brevipalpus phoenicis* (ACARI:  
TENUIPALPIDAE) VECTOR OF *Citrus leprosis virus* CYTOPLASMIC TYPE

Eber Josué Sánchez Velázquez, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2014

*Brevipalpus phoenicis* is considered an important vector of *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C) causal agent of the cytoplasmic-type leprosis, a disease affecting sweet citrus orchards. Samples of *Brevipalpus phoenicis* were obtained from sweet orange (*Citrus sinensis*) orchards in eight and twelve localities in Brazil and Mexico respectively. Population genetic structure and genetic variation was assessed in the samples collected by analyzing nucleotide sequences of cytochrome oxidase subunit I gene (COI). We found the existence of two morphological groups (“B” and “C”) in samples of both countries; this represents the first report of group “C” for Mexico. The genetic diversity among Brazilian populations was higher with seventeen haplotypes while Mexican populations from Tabasco, Veracruz and Chiapas only presented four. The biggest variation was observed among localities of each country (44.92%), followed by variation among sampling sites of each locality (29.89%). The variation between countries was low (25.18%), however, still significant suggesting a geographically structured populations between Brazil and Mexico.

**Key words:** morphospecies, haplotype network, AMOVA.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado para la realización del postgrado y estancia de investigación.

Al Colegio de Postgraduados y al Instituto de Fitosanidad por los conocimientos y la experiencia obtenida durante estos dos años.

Al Centro APTA Citros Sylvio Moreira-IAC por abrirme las puertas para la realización de mi estancia de investigación.

A la Dra. Ma Teresa Santillán Galicia por haber aceptado ser mi consejera estos dos años, por la confianza, la amistad y el apoyo en esta gran experiencia.

Al Dr. Gustavo Mora Aguilera por impulsarme a ser mejor cada día, por ayudarme a entender que el éxito es el resultado de un esfuerzo constante y arduo trabajo.

Al Dr. Gabriel Otero Colina por compartir un poco de sus amplios conocimientos en Acarología, un placer trabajar con usted.

Al MC. Jorge Manuel Valdez Carrasco por confiar siempre en que estos dos años rendirían grandes frutos.

Al Dr. Héctor González Hernández por la amistad y apoyo brindado aun sin ser miembro de mi Consejo Particular.

Al Dr. Ariel W. Guzmán Franco por la amistad y el apoyo en la realización de los análisis moleculares.

Às Dras Juliana Freitas-Astúa, Valdenice Moreira Novelli e Maria Andréia Nunes pela amizade, confiança e carinho. Obrigado pela oportunidade de ser orientado por vocês.

Al Dr. Antonio Hernández López por su valioso apoyo en los análisis de AMOVA y la red de haplotipos.

A la Dra. Obdulia L. Segura León por el asesoramiento en el análisis de secuencias y el depósito de las mismas en el GenBank.

A los Comités Estatales de Sanidad Vegetal en Chiapas, Tabasco y Veracruz, por el apoyo durante los muestreos.

A Guadalupe Hernández, Jessica Razo, Deisy Morales, Daniel Bravo, Paulina Romero, Alejandro Martínez, Isis Jaímez, Augusto Peña, Álvaro Soto, Valeria Cuellar, Verónica Rivera, Antonio Hernández y Alfredo Casimiro, por todo lo vivido, por escucharme, comprenderme y aconsejarme siempre.

Al Sr. Ignacio Javier Zarco Hernández por la amistad y apoyo en todo el trabajo realizado en el laboratorio de Acarología.

Aos amigos no Brasil: Laura Melissa Gómez, Thamiris Sipriano, Diogenes Rafael de Camargo, Kelly Fernandes de Campos, Meire Sommer, Marcela Bergamini, Gabriella Dias Arena, Michèle Breton, Simone Cristina Picchi, Tiago Oliveira Silva, Sérgio Alves de Carvalho, Arthur Antonio Ghilardi, José Dagoberto De Negri, Marines Bastianel e Karine Brandão Nunes do CCSM-IAC; Eduardo Pacheco, Felipe Fukuda, Higor Peria, Zé Aldo Tamburi, Genio Lucca Filho, Jéssica Timpani da República Paiol; Caio Eduardo da Costa Domingues e Carlos Eduardo Signorini do apartamento. Obrigado pelo carinho e pela amizade, vocês sempre estarão no meu coração.

La presente investigación se llevó a cabo bajo el financiamiento del proyecto: “Implicaciones epidemiológicas del CTV en el sistema vector-planta: bases epidemiológicas y cuantitativas para la aplicación de la campaña en México” del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA).

## DEDICATORIA

A mi familia; mamá, hermanas, hermano, sobrinos y sobrinas... Ustedes siempre han sido y serán mi fortaleza. Los amo.



## CONTENIDO

|                                                                                                       |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>                                                                          | <b>1</b>  |
| <b>2. OBJETIVOS .....</b>                                                                             | <b>6</b>  |
| <b>3. REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>                                                                | <b>7</b>  |
| 3.1 El género <i>Brevipalpus</i> Donnadieu .....                                                      | 7         |
| 3.1.1 Morfoespecies de <i>Brevipalpus phoenicis</i> .....                                             | 11        |
| 3.2 El patosistema leprosis de los cítricos .....                                                     | 12        |
| 3.3 DNA mitocondrial (citocromo oxidasa I como marcador molecular) .....                              | 15        |
| <b>4. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>                                                                   | <b>18</b> |
| 4.1 Recolección de ácaros .....                                                                       | 18        |
| 4.1.1 Muestras de Brasil .....                                                                        | 18        |
| 4.1.2 Muestras de México.....                                                                         | 19        |
| 4.2 Identificación y caracterización morfológica de poblaciones de <i>Brevipalpus phoenicis</i> ..... | 21        |
| 4.3 Extracción de DNA y amplificación.....                                                            | 22        |
| 4.4 Secuenciación del DNA.....                                                                        | 23        |
| 4.5 Análisis de datos .....                                                                           | 23        |

|                                                                                           |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>5. RESULTADOS .....</b>                                                                | <b>25</b> |
| 5.1 Identificación y caracterización morfológica de poblaciones de <i>B. phoenicis</i> .. | 25        |
| 5.2 Caracterización molecular de poblaciones de <i>B. phoenicis</i> .....                 | 35        |
| <br>                                                                                      |           |
| <b>6. DISCUSIÓN .....</b>                                                                 | <b>41</b> |
| <br>                                                                                      |           |
| <b>7. CONCLUSIONES .....</b>                                                              | <b>47</b> |
| <br>                                                                                      |           |
| <b>8. LITERATURA CITADA.....</b>                                                          | <b>48</b> |

## LISTA DE CUADROS

|                                                                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Cuadro 1. Localidades en las cuales se obtuvieron las muestras de <i>Brevipalpus phoenicis</i> . .....                               | 26 |
| Cuadro 2. Análisis de polimorfismos entre las poblaciones de Brasil y México. ...                                                    | 39 |
| Cuadro 3. Análisis AMOVA para las poblaciones de <i>B. phoenicis</i> colectadas en naranja dulce en huertos de Brasil y México. .... | 40 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Ubicación espacial de sitios donde se tomaron muestras de <i>Brevipalpus phoenicis</i> en Brasil.....                | 18 |
| Figura 2. Ubicación espacial de sitios donde se tomaron muestras de <i>Brevipalpus phoenicis</i> en México.....                | 20 |
| Figura 3. Especies de <i>Brevipalpus</i> encontradas en las muestras de naranja dulce .....                                    | 25 |
| Figura 4. Características distintivas dorsales de la morfoespecie de <i>Brevipalpus phoenicis</i> tipo naranja (Grupo B).....  | 30 |
| Figura 5. Características distintivas ventrales de la morfoespecie de <i>Brevipalpus phoenicis</i> tipo naranja (Grupo B)..... | 31 |
| Figura 6. Características distintivas dorsales de la morfoespecie de <i>Brevipalpus phoenicis</i> tipo café (Grupo C).....     | 33 |
| Figura 7. Características distintivas ventrales de la morfoespecie de <i>Brevipalpus phoenicis</i> tipo café (Grupo C).....    | 34 |

Figura 8. Reconstrucción filogenética de una fracción (352 pb) de la región COI de *B. phoenicis* utilizando el método de máxima parsimonia. .... 36

Figura 9. Red de haplotipos de poblaciones de *B. phoenicis* de Brasil y México recolectadas en naranja dulce. .... 38

## 1. INTRODUCCIÓN

Los miembros de la familia Tenuipalpidae son conocidos comúnmente como ácaros planos o falsas arañas rojas; en el mundo existen 891 especies distribuidas en 34 géneros (Mesa *et al.* 2009). El género *Brevipalpus* es el grupo más numeroso con aproximadamente 300 especies a nivel mundial (Welbourn *et al.* 2003). Muchas especies del género no son consideradas de interés ya sea porque sus hospedantes no son plantas económicamente importantes o porque sus poblaciones permanecen por debajo de niveles que causen un daño económico (Jeppson *et al.* 1975). Sin embargo, las especies *B. californicus* (Banks), *B. obovatus* (Donnadieu) y *B. phoenicis* (Geijskes) son consideradas como las de mayor importancia debido a su capacidad para transmitir virus (Bastianel *et al.* 2006; Childers *et al.* 2001; Childers y Derrick 2003).

En el caso de los cítricos, *B. phoenicis* ha sido asociado con la transmisión del virus que causa la enfermedad conocida como leprosis de los cítricos desde 1960, mientras que *B. californicus* y *B. obovatus* se consideraron los vectores del mismo virus en Estados Unidos de Norteamérica y Argentina, respectivamente (Bastianel *et al.* 2006). Actualmente se sabe que *B. phoenicis* es el vector más importante en la transmisión del virus de la leprosis de los cítricos y que todos sus estados de desarrollo (excepto huevo) son capaces de transmitir el virus (Boaretto *et al.* 1993). La presencia de estas tres especies ha sido reportada tanto en México como en Brasil (De Leon 1961; Knorr and Denmark 1970; Baker *et al.* 1975; Baker and Tuttle 1987; Trindade and Chiavegato 1994; Mesa *et al.*

2009; Salinas Vargas *et al.* 2013) y la mayor prevalencia estacional de *B. phoenicis* ha sido demostrada en ciertos estados de ambos países (Oliveira 1986; Chiaradia y Souza 2001; Czermainski *et al.* 2007; Méndez Méndez *et al.* 2012; Salinas Vargas *et al.* 2013).

El género *Brevipalpus* ha sido dividido en nueve grupos basándose en el número de sedas histerosomales, en el número de sedas en el segmento distal del palpo y en el número de solenidios en el tarso II (Baker y Tuttle 1987, Welbourn *et al.* 2003). Las especies *B. californicus*, *B. obovatus* y *B. phoenicis* se han incluido en tres grupos diferentes; sin embargo, debido a su variación morfológica intraespecífica, a la amplia gama de plantas hospedantes, a su distribución cosmopolita y al número de virus específicos de los cuales funcionan como vectores, se tiene cierto temor a que existan especies crípticas en alguno de estos grupos (Welbourn *et al.* 2003). Dos o más especies distintas son definidas como especies crípticas o hermanas cuando erróneamente fueron clasificadas como una sola debido a similitudes morfológicas que hacen difícil su separación (Pfenninger y Schwenk 2007; Beheregaray y Caccone 2007). Debido a la similitud morfológica que presentan *B. californicus*, *B. obovatus* y *B. phoenicis*, es posible que la identificación en muchos casos se haya realizado erróneamente (Welbourn *et al.* 2003; Navia *et al.* 2013).

La identificación morfológica de *B. phoenicis* está basada en los siguientes caracteres: cinco sedas histerosomales (por la ausencia de la seta  $f_2$ ) y dos solenidios (omega) en el tarso II (González 1975). Sin embargo, se ha observado

que existe variación en los patrones de reticulación lateral del propodosoma y la región dorsal del histerosoma, así como en la longitud de las sedas dorsales, lo cual tentativamente se ha asociado con el hospedante (Manson 1967, González 1975). Otros rasgos que recientemente se han observado y que han aportado información taxonómica relevante son la forma de la espermateca, el tipo de seda en la genua del palpo, detalles de la reticulación dorsal y ventral así como la quetotaxia completa de las patas I–IV (Beard *et al.* 2012).

Por la alta frecuencia con la cual se descubren especies crípticas en la naturaleza mediante secuencias de DNA que son confirmadas posteriormente con análisis ecológicos y morfológicos, es recomendable que se incorporen datos moleculares a las investigaciones realizadas por taxónomos (Bickford *et al.* 2006).

El gen citocromo oxidasa subunidad I (COI) se ha empleado ampliamente para la realización de estudios de taxonomía, filogenia e identificación de especies. Algunas de las características que lo hacen una herramienta ideal para este trabajo son que el hecho de ser un gen haploide, de herencia uniparental (materna) y resistente a la degradación (Rueanghiran *et al.* 2011). Navajas *et al.* (1996) realizaron un estudio de comparación entre rasgos morfológicos, hábitos y tipo de reproducción con respecto a las filogenias moleculares en ácaros de la superfamilia Tetranychoida empleando el gen COI y encontraron correspondencia entre las agrupaciones filogenéticas y los caracteres evaluados.



*Brevipalpus phoenicis* es un ácaro con reproducción asexual del tipo telitoca; es decir, las hembras no fecundadas producen descendencia conformada por hembras que son clones genéticos de material haploide con dos cromosomas homólogos, aunque también se ha observado la presencia ocasional de machos (Haramoto 1966; Helle *et al.* 1980; Groot y Breeuwer 2006). Poblaciones procedentes de diferentes hospedantes o incluso del mismo presentan un grado elevado de polimorfismo en su DNA (Rodrigues *et al.* 2003; Rodrigues *et al.* 2004); la variabilidad genética se ha atribuido a la existencia de diferentes genotipos (haplotipos) sobre un mismo o sobre varios hospedantes.

Debido a la importancia que tiene *B. phoenicis* en la transmisión de *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C) (Bastianel *et al.* 2006; Childers y Derrick 2003; Childers *et al.* 2001), el cual ha causado pérdidas económicas importantes en cítricos, principalmente en variedades dulces (Lovisoló 2001), es necesario definir la identidad de las poblaciones presentes en huertos de naranja dulce (*Citrus sinensis*) tanto sanos como infectados con CiLV-C (Rodrigues *et al.* 2003; Navia *et al.* 2013).

Esto es fundamental para México dado a que el virus causante de la leprosis se encuentra restringido a los estados de Chiapas, Tabasco y Veracruz en la región sureste del país (Sánchez Anguiano 2005; SENASICA 2010; Izquierdo *et al.* 2011) a diferencia de Brasil donde la leprosis es endémica y se encuentra presente en todas las regiones productoras de cítricos (Bitancourt 1955; Freitas-Astúa *et al.* 2004; Kitajima *et al.* 2004; Chagas *et al.* 2006; Pascon *et al.* 2006; Bastianel *et al.*

2008; Bastianel *et al.* 2010). Debido a esto, el gobierno mexicano implementa actividades fitosanitarias de vigilancia epidemiológica y de control consistente en la eliminación de plantas con alta intensidad de daño, podas y control químico particularmente en los estados donde la enfermedad ha sido reportada

La optimización de estrategias de vigilancia y de manejo requiere una cabal comprensión de la composición regional y estacional de las especies vectores del género *Brevipalpus*, así como de estudios específicos de *B. phoenicis* putativo principal vector de CiLV-C. Este trabajo se enfocó al análisis de la variación interespecífica de *B. phoenicis* de poblaciones provenientes de los estados de Chiapas, Tabasco y Veracruz en México y los estados de Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, São Paulo y Tocantins en Brasil en huertos con la presencia y ausencia de la enfermedad con el fin de eventualmente estimar los riesgos epidémicos regionales debido a factores inherentes al vector.

## 2. OBJETIVOS

### General

Establecer el nivel de variación genética existente entre poblaciones de *Brevipalpus phoenicis* de plantas de naranja dulce (*Citrus sinensis*) provenientes de regiones citrícolas de Brasil y México en huertos con presencia y ausencia del *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C).

### Particulares

Estudiar la estructura genética de poblaciones de *B. phoenicis* presentes en huertos de naranja dulce (*Citrus sinensis*) infestados con CiLV-C de Chiapas, Tabasco y Veracruz, así como de cinco estados endémicos del virus de Brasil.

Determinar la composición de morfoespecies de *Brevipalpus phoenicis* a partir de poblaciones provenientes de plantas de naranja dulce (*C. sinensis*) de México y Brasil con fines asociativos a la variación genética interespecífica.

### 3. REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3.1 El género *Brevipalpus* Donnadieu

La familia Tenuipalpidae fue descrita por Antonio Berlese en 1913, está compuesta por 891 especies incluidas en 34 géneros descritos en todo el mundo. Son de hábitos fitófagos, se alimentan de los contenidos celulares de las hojas localizándose principalmente en el envés cerca de las nervaduras, aunque ciertas especies se llegan a ubicar en la corteza o en los botones florales (Jeppson *et al.* 1975; Wellbourn *et al.* 2003; Mesa *et al.* 2009).

La mayoría de las especies pertenecientes a esta familia no son de importancia económica, debido a que se hospedan en especies vegetales que no tienen gran valor comercial y a que sus poblaciones no suelen alcanzar niveles económicos (Jeppson *et al.* 1975). A pesar de ser una familia con hábitos fitófagos, sólo pocas especies de ciertos géneros son considerados de importancia económica; dichos géneros son *Aegyptobia*, *Phytoptipalpus*, *Pentamerismus*, *Pseudoleptus*, *Cenopalpus*, *Brevipalpus*, *Tenuipalpus*, *Dolichotetranychus*, *Raoiella*, *Phyllostetranychus*, *Tegopalpus*, *Priscapalus*, *Obdulia*, *Ultratenuipalpus* y *Larvacarus* (Jeppson *et al.* 1975; Baker y Tuttle 1987).

El género *Brevipalpus* fue descrito por Marie Louis Adolphe Donnadieu en 1875 y de él se conocen por lo menos 300 especies distribuidas alrededor del mundo (Mesa *et al.* 2009); además de ocasionar daños directos por la alimentación,

ciertas especies han demostrado tener la capacidad de transmitir partículas virales a sus plantas hospedantes (Chagas *et al.* 2003, Childers y Derrick 2003; Kitajima *et al.* 2003a y b; Kitajima *et al.* 2007; Kubo *et al.* 2011).

Los miembros del género *Brevipalpus* son ácaros de tamaño pequeño (200 – 300  $\mu\text{m}$ ) conocidos comúnmente como ácaros planos o “false spider mites”; de color rojizo y de movimientos lentos (Ochoa y Salas 1989; Welbourn *et al.* 2003). Presentan palpos de cuatro segmentos; de cinco a seis sedas opistosomales dorsolaterales, carecen de sedas opistosomales dorsosublaterales; presentan placas ventral y genital de forma cuadrangular y ovalada, respectivamente. El cuerpo es oval, estrecho en su parte posterior; en especímenes adultos el patrón de reticulación es característico y aunque la forma del cuerpo en machos y hembras puede diferir, el patrón de reticulación permanece similar (Jeppson *et al.* 1975). Basándose en el número de sedas opistosomales, el número de sedas en el segmento distal del palpo y el número de solenidios ( $\omega$ ) en el tarso II, se ha dividido al género en nueve grupos de especies (Baker y Tuttle 1987; Welbourn *et al.* 2003).

Las especies de este género se reproducen por partenogénesis telitoca debido a la presencia de bacterias endosimbiontes del género *Cardinium* que causan la feminización de los individuos. Los machos ocurren en bajas frecuencias y las hembras son haploides ( $n= 2$  cromosomas) (Helle *et al.* 1980; Weeks *et al.* 2001; Groot y Breeuwer 2006).

El ciclo de vida comprende huevo y cuatro estados activos (larva, protoninfa, deutoninfa y adulto); entre cada estado activo existe un estado quiescente (crisálida) el cual es sésil pero fisiológicamente activo. Los huevos miden 0.1 mm de largo y tienen un color rojo brillante, son depositados de forma individual en lugares protegidos y adheridos a la superficie de la planta. La larva es hexápoda, de coloración anaranjada y posee dos pares de ocelos en el margen lateral del cuerpo. Tanto proto como deutoninfa son de un tamaño mayor al de las larvas y presentan cuatro pares de patas, la coloración de estos estados de desarrollo es más opaca que los anteriores. Las hembras miden aproximadamente 0.30 mm de largo por 0.16 mm de ancho, son de color naranja con manchas oscuras en el dorso que pueden variar con la temperatura, la alimentación y la edad de los especímenes. Los machos representan el 1% de la población, su cuerpo es más pequeño y la parte posterior es más afilada. El ciclo de vida comprendiendo de huevo a adulto es de 35.8 días a temperatura de 30° C, y de 62.0 días cuando la temperatura es de 20° C (Chiavegato-Gonzaga 1986; Chiaradia y Souza 2001; Childers *et al.* 2001; Childers *et al.* 2003b; Childers y Rodrigues 2011).

A nivel mundial, veinticuatro especies de Tenuipalpidae han sido observadas en cítricos, diez de las cuales pertenecen al género *Brevipalpus*: *B. amicus* Chaudhri, *B. californicus*, *B. chilensis* Baker, *B. karachiensis* Chaudhri, Akbar y Rassol, *B. lewisi* (McGregor), *B. mcgregori* Baker, *B. obovatus*, *B. phoenicis*, *B. rugulosus* Chaudhri, Akbar y Rasool y *B. tinsukiaensis* Sadena y Gupta. Se había reportado a *B. deleari* (Pritchard y Baker 1949) pero se determinó que es un sinónimo de *B. phoenicis* (Baker y Suigong 1988). Otras especies reportadas son: *Tenuipalpus*

*citri* Smith-Meyer, *Tenuipalpus* sp., *T. mustus* Chaudhri, *T. orilloi* Rimando, *Pentamerismus tauricus* Livshitz y Mitrofanov (Ghai y Shenhmar, 1984), *Tenuipalpus caudatus* (Duges) y *Ultratenuipalpus gonianensis* Sadana y Sidhu (Childers *et al.* 2001; Vacante 2010). En Brasil únicamente se ha reportado a *B. phoenicis* causando daños directos sobre cítricos (Knorr and Denmark 1970) además de ser el responsable en la transmisión de CiLV-C (Bastianel *et al.* 2006; Childers and Derrick 2003; Childers *et al.* 2001). Sin embargo, en México *B. phoenicis* forma parte de una comunidad de ácaros sobre cítricos incluyendo también la presencia de *Brevipalpis californicus* (Banks) y *Brevipalpis obovatus* (Donnadieu) (De Leon 1961; Baker *et al.* 1975; Baker and Tuttle 1987; Rosas-Acevedo y Sampedro-Rosas 2000; Mesa *et al.* 2009; Salinas-Vargas *et al.* 2013)

El ácaro *B. phoenicis* es una especie fitófaga que se encuentra presente principalmente en climas tropicales y subtropicales alimentándose de al menos 400 especies vegetales entre las que se incluyen frutales, ornamentales y maleza (Childers *et al.* 2003a; Miranda *et al.* 2007). La prevalencia estacional de *B. phoenicis* sobre diferentes especies cítricas en diferentes estados ha sido demostrada tanto en Brasil como en México (Oliveira 1986; Chiaradia y Souza 2001; Czermainski *et al.* 2007; Méndez Méndez *et al.* 2012; Salinas Vargas *et al.* 2013).

Los caracteres morfológicos empleados para la identificación de *B. phoenicis* son cinco sedas opistosomales (por la ausencia de la seda  $f_2$ ) y dos solenidios (omega) en el tarso II (González, 1975). Sin embargo, se ha observado que existe variación

en los patrones de reticulación lateral del propodosoma y región dorsal del opistosoma, así como en la longitud de las sedas dorsales, lo cual tentativamente se ha asociado con el hospedante (Manson 1967; González 1975 y Childers *et al.* 2003a). Recientemente se han incluido otros rasgos observados en la morfología interna y externa de especímenes montados, los cuales han aportado información taxonómica relevante, tales como la forma de la espermateca, el tipo de seda en la genua del palpo, la reticulación dorsal y ventral, así como la quetotaxia completa de las patas I – IV (Ochoa *et al.* 2011; Beard *et al.* 2012).

### **3.1.1 Morfoespecies de *Brevipalpus phoenicis***

Beard *et al.* (2012) dividieron a la especie *B. phoenicis* en siete grupos morfológicos, A, B, C, D, E, F y G. La formación de estos grupos está basada en características tales como longitud del idiosoma, longitud de las sedas propodosomales, longitud de las sedas opistosomales, longitud de las sedas ventrales y longitud y ancho del idiosoma; además de eso se incluye la morfología de la espermateca, la reticulación del opistosoma y la forma de la seda palpal.

En Brasil, Ochoa *et al.* (2011) y Mineiro *et al.* (2013 a, b, c) han observado la existencia de dos grupos predominantes a los cuales denominaron como “tipo naranja” (Grupo B) y “tipo café” (Grupo C), debido a la preferencia de cada uno por estos hospedantes. La caracterización de estas poblaciones fue realizada en especímenes colectados en plantas del estado de São Paulo (Mineiro *et al.* 2013a, b y c). En México, Beard *et al.* (2012) reportaron la presencia de la morfoespecie



tipo “naranja” sobre diferentes plantas hospederas, siendo las del género *Citrus* las de mayor importancia.

### **3.2 El patosistema leprosis de los cítricos**

*Brevipalpus californicus*, *B. obovatus* y *B. phoenicis* son consideradas las especies de mayor importancia en la producción citrícola; se ha demostrado que además de los daños directos, tienen la capacidad de transmitir partículas virales (Bastianel *et al.* 2006; Childers y Derrick 2003; Childers *et al.* 2001). Una de las partículas virales transmitidas por estas especies es la de CiLV-C que causa la enfermedad conocida como leprosis de los cítricos. *Brevipalpus phoenicis* es capaz de adquirir el virus en todos sus estados móviles y permanecer virulífero por el resto de su vida aunque no existe la transmisión transovárica (Boaretto *et al.* 1993).

La leprosis de los cítricos es una enfermedad que ocasiona pérdidas económicas importantes, principalmente en variedades dulces del género *Citrus* (Lovisolo 2001). Fue descrita por primera vez en Florida, EUA en 1901; sin embargo, la enfermedad desapareció hacia 1960 y no hubo reportes posteriores. En Sudamérica, fue reportada en Paraguay en 1920, identificada por Spegazzini quien la nombró “lepra explosiva”. En 1932 Zeman reportó la enfermedad en Argentina y en 1933 se le observó en Sorocaba, São Paulo, Brasil, sobre hojas de naranja dulce (*Citrus sinensis* L. Osbeck). Después de varios años la enfermedad se reportó en nuevos países incluidos algunos de Centroamérica y Norteamérica. Actualmente la enfermedad se encuentra reportada en Costa Rica, Panamá,

Guatemala, Bolivia, Colombia y México (Lovisoló 2001; Saavedra *et al.* 2001; Gómez *et al.* 2005; Bastianel *et al.* 2006; Leon *et al.* 2006; Palmieri *et al.* 2007; Izquierdo *et al.* 2011).

En un principio se supuso que la leprosis de los cítricos era causada por hongos e incluso por toxinas segregadas por ácaros; sin embargo, el análisis de tejidos afectados por leprosis en diversos hospedantes bajo microscopía electrónica de transmisión permitió identificar partículas bacilares de 40 nm de ancho y de 100-120 nm de largo, las que fueron identificadas como posibles miembros de la familia Rhabdoviridae, tanto por su morfología como por los síntomas ocasionados (Kitajima *et al.* 1972; Colariccio *et al.* 1995; Rodrigues *et al.* 2003; Locali-Fabris *et al.* 2006).

Existen dos tipos de partículas virales involucradas con los síntomas de la leprosis; el nuclear "CiLV-N", que mide de 100 a 110 nm de largo por 40-50 nm de ancho, y el citoplasmático "CiLV-C", que mide de 120 a 130nm de largo por 50 a 55 nm de ancho. Las partículas del CiLV-N tienen forma de barras cortas y se localizan en el nucleoplasma o citoplasma generalmente conectadas a membranas tales como la envoltura nuclear, además de que puede estar presente un viroplasma nuclear hialino. En el CiLV-C son partículas bacilares cortas envueltas en una membrana que se encuentran presentes en el retículo endoplasmático y puede haber viroplasmas vacuolados dentro del citoplasma (Kitajima *et al.* 2003a; Rodrigues *et al.* 2003; Kitajima *et al.* 2006; Pascon *et al.* 2006; Marques *et al.* 2010).

Se ha demostrado mediante pruebas moleculares que CiLV-C y CiLV-N son genotípicamente distintos; es así que el primero fue propuesto como un nuevo género llamado *Cilevirus*, mientras que el segundo se ha propuesto para ser considerado como un segundo miembro del género no-relacionado *Dichorhabdovirus* (Locali-Fabris *et al.* 2006; Roy *et al.* 2013).

En Brasil se ha reportado la presencia de CiLV-C en todas las regiones productoras de cítricos del país, mientras que CiLV-N sólo se ha observado en algunas localidades de clima frío de los estados de Minas Gerais, Rio Grande do Sul y São Paulo (Bitancourt 1955; Freitas-Astúa *et al.* 2004; Chagas *et al.* 2006; Kitajima *et al.* 2004). En el territorio mexicano CiLV-C fue detectado en 2004 en el estado de Chiapas (Sánchez-Anguiano 2005) y actualmente su dispersión incluye los estados de Tabasco y Veracruz (SENASICA 2010; Izquierdo *et al.* 2011). Los daños por CiLV-C se caracterizan por la presencia de lesiones cloróticas y necróticas muy localizadas en ramas, hojas y frutos, sin llegar a ocasionar una infección sistémica en la planta afectada (Lovisoló 2001).

Recientemente se reportaron síntomas similares a la leprosis sobre especies de cítricos dulces y ácidos en los estados de Querétaro y Jalisco; sin embargo, las muestras resultaron negativas a la detección de CiLV-C mediante el análisis por RT-PCR. La existencia de partículas virales en las muestras sugirió la presencia de leprosis tipo nuclear (CiLV-N), misma que fue confirmada mediante el uso de técnicas moleculares (Roy *et al.* 2013; Alanís-Martínez *et al.* 2013).

### **3.3 DNA mitocondrial (citocromo oxidasa I como marcador molecular)**

Los marcadores moleculares se han aplicado en diversas cuestiones biológicas tales como la genética de poblaciones, la reconstrucción filogenética, pruebas de paternidad e incluso aplicaciones forenses (Schlötterer 2004). Según Navajas y Fenton (2000), los marcadores moleculares más utilizados en estudios con ácaros son el DNA mitocondrial (mtDNA) y el DNA ribosomal (rDNA).

El mtDNA es un marcador molecular ampliamente usado en el estudio de biodiversidad en animales, ya que es de tamaño pequeño, abundante en los tejidos animales, con genes ortólogos, heredado uniparentalmente (vía materna) de manera haploide y carece de recombinación, lo que lo hace un marcador filogenético seguro y fácil de usar (Gissi *et al.* 2008; Castellana *et al.* 2011; Rueanghiran *et al.* 2011).

Las mutaciones en el mtDNA se dan por tres procesos básicamente: sustitución de bases, variación de la longitud y reordenamiento de la secuencia. En artrópodos los marcadores moleculares basados en DNA se han empleado para estimar la diversidad génica y el flujo de genes entre especies, identificar haplotipos y linajes, así como para explicar la historia migratoria e invasiva de las especies (Behura 2006; Dowling *et al.* 2012).

El mtDNA contiene 37 genes, de los cuales 13 producen las enzimas encargadas de la fosforilación oxidativa, dos codifican el RNA ribosómico y 22 el RNA de transferencia (Cruickshank 2002; Othman 2012). Entre los genes mitocondriales que codifican para proteínas, el gen *citocromo oxidasa subunidad I* (COI) se ha reportado como el gen más conservado, lo que le da una ventaja distintiva para los estudios taxonómicos (Kumar *et al.* 2007).

Navajas *et al.* (1996a) realizaron un estudio en 20 especies de la superfamilia Tetranychoida (19 Tetranychidae y un Tenuipalpidae) y demostraron que, al igual que en los insectos, las secuencias obtenidas eran ricas en A+T (75%) especialmente en la tercera posición de los codones (94%). En ese mismo año se realizó un estudio que comparó rasgos morfológicos, hábitos y tipo de reproducción respecto a las filogenias moleculares en ácaros de Tetranychoida usando el gen COI; los resultados mostraron correspondencia entre las agrupaciones filogenéticas y los caracteres evaluados (Navajas *et al.* 1996b).

Alrededor del mundo la diversidad genética, la relación filogenética y la estructura poblacional en ácaros han sido estudiadas empleando fragmentos parciales del gen COI. Toda *et al.* (2000) y Yuan *et al.* (2010) trabajaron con poblaciones del género *Panonychus* en Japón y China, respectivamente. Navajas *et al.* (1996, 2001) han realizado estudios moleculares con ácaros de las familia Tetranychidae y Tenuipalpidae. Sin embargo, Rodrigues *et al.* (2004) fueron los primeros en realizar un estudio molecular con la especie *B. phoenicis*.

Hacer la reconstrucción histórica de un grupo de organismos es el objetivo primordial de los estudios filogenéticos. Existen dos enfoques desde los cuales se puede realizar dicha reconstrucción: el morfológico y el molecular; combinar ambos enfoques en el estudio de los organismos permitirá maximizar la utilidad y el contenido de la información obtenida (Hillis 1987). La similitud morfológica entre especies del género *Brevipalpus* y el ser posible que existan especies crípticas dentro del género ha obligado a los investigadores a realizar estudios que combinen aspectos morfológicos y moleculares en la descripción del mismo.

Navia *et al.* (2013) describieron la diversidad críptica presente en el género empleando caracteres morfológicos y secuencias de mtDNA (COI) obtenidas de estudios realizados a lo largo de los años y de muestras tomadas en diferentes hospedantes y países. Como resultado de este estudio descubrieron la existencia de una nueva especie de *Brevipalpus* y observaron que uno de los grupos morfológicos descritos en la especie *B. phoenicis* (tipo café) está más próximo a la especie *B. obovatus* sobre la cual se hizo la descripción original del género.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Recolección de ácaros

#### 4.1.1 Muestras de Brasil

Durante los meses de septiembre, octubre y noviembre de 2012 se recibieron muestras de tejido vegetal (ramas, hojas y frutos), así como ácaros conservados en alcohol absoluto de cinco estados de Brasil (Figura 1).

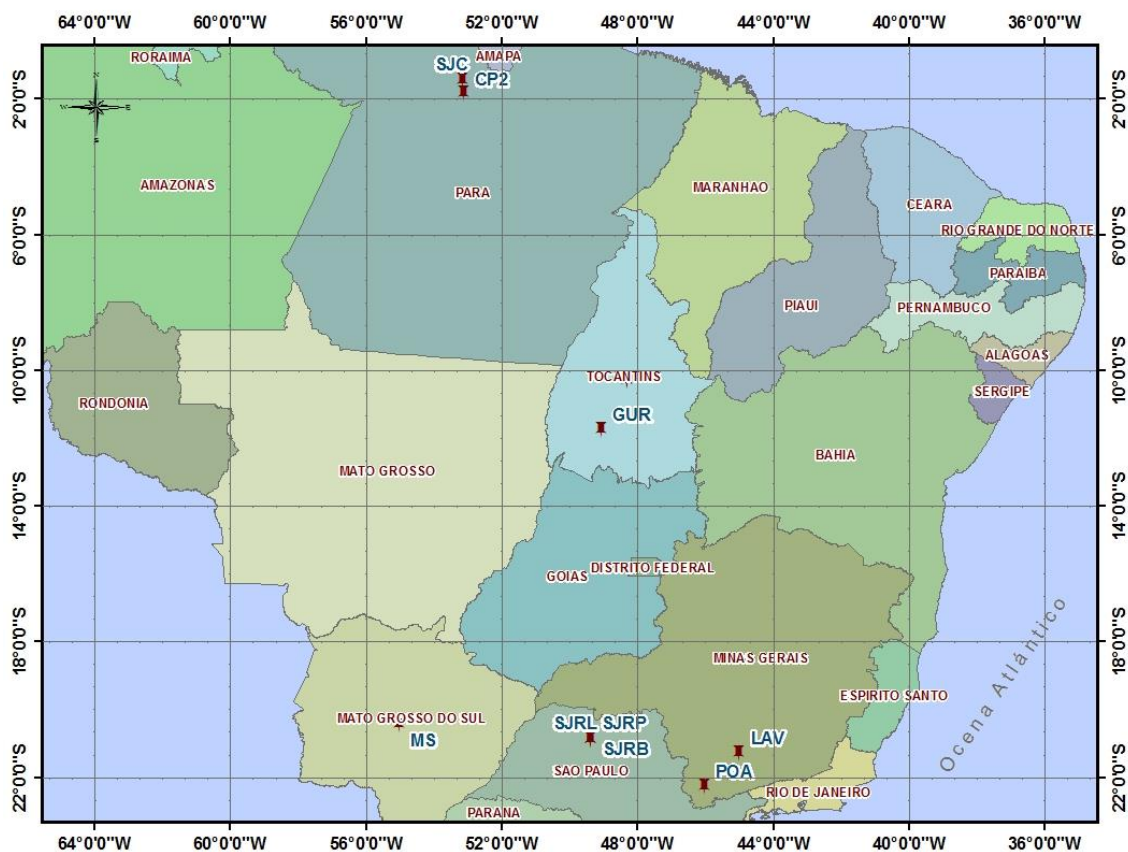


Figura 1. Ubicación espacial de sitios donde se tomaron muestras de *Brevipalpus phoenicis* en Brasil.

Estas muestras fueron procesadas en el Centro de Citricultura Sylvio Moreira ubicado en Cordeirópolis, São Paulo. Bajo observación directa al microscopio estereoscópico, se extrajeron los adultos de las muestras de tejido vegetal con un pincel fino y se colocaron en grupos de diez individuos en tubos Eppendorf estériles los cuales eran almacenados a  $-20^{\circ}$  C. En los sitios en donde se encontraron pocos ejemplares se establecieron crías (isolíneas) en frutos de naranja siguiendo el método de Chiavegato-Gonzaga (1986) con algunas modificaciones.

Los ácaros recibidos en alcohol fueron separados y colocados en tubos Eppendorf estériles en grupos de diez individuos y liofilizados durante media hora para la eliminación completa del alcohol. Todo el material obtenido fue conservado a  $-20^{\circ}$  C hasta su uso.

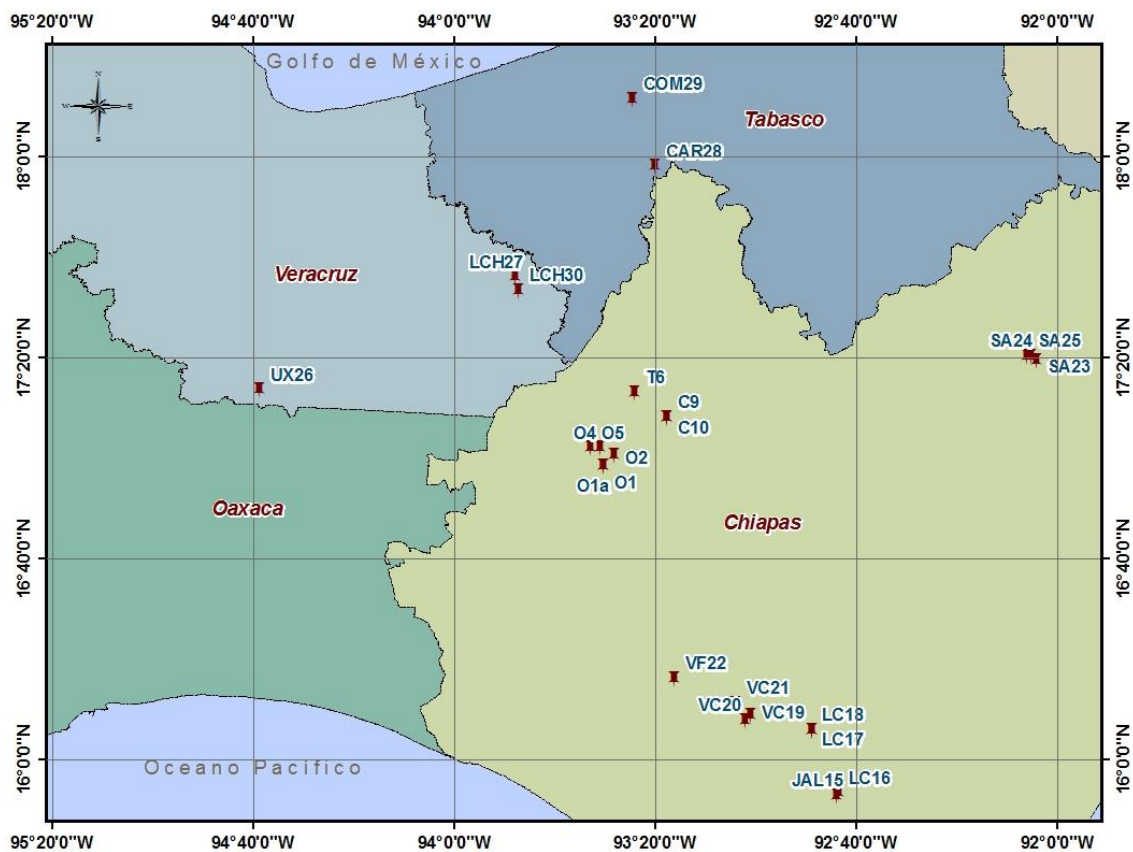
#### **4.1.2 Muestras de México**

En México se realizaron muestreos en los estados de Tabasco (febrero), Veracruz (marzo) y Chiapas (abril y mayo) de 2013 (Figura 2); adicionalmente, en el mes de julio se recibieron muestras de los estados de Veracruz y Chiapas.

Las muestras tomadas en Tabasco y Veracruz fueron procesadas por lavado-tamizado y revisadas al microscopio estereoscópico en las instalaciones del laboratorio de Acarología del Colegio de Postgraduados, campus Montecillos. Las



muestras de tejido vegetal que se recolectaron en el estado de Chiapas fueron procesadas bajo observación directa con un microscopio estereoscópico para la extracción de los ácaros adultos. De igual forma que en Brasil, en los sitios en donde la presencia de ácaros fue baja se establecieron crías en frutos de naranja para aumentar el número de ejemplares.



**Figura 2. Ubicación espacial de sitios donde se tomaron muestras de *Brevipalpus phoenicis* en México.**

Todos los ácaros obtenidos fueron depositados en grupos de diez individuos en tubos Eppendorf estériles que contenían alcohol absoluto; posteriormente se liofilizaron por un periodo de 30 minutos para la eliminación completa del alcohol y se conservaron a una temperatura de -20° C hasta su uso.

#### **4.2 Identificación y caracterización morfológica de poblaciones de *Brevipalpus phoenicis***

Para la identificación y caracterización morfológica sólo fueron consideradas las hembras adultas. Se tomaron 30 individuos por localidad de muestreo, los cuales se montaron entre porta y cubre objetos con líquido de Hoyer (Krantz y Walter, 2009). Una vez realizadas las preparaciones se mantuvieron a una temperatura de 40°C durante 15 días. Posteriormente se limpiaron y se sellaron con esmalte (Brasil) y con pintura anticorrosiva automotriz (Comex®) (México). La identificación y la caracterización de las especies se hicieron con un microscopio óptico a campo claro, en contraste de fases y con microscopía de contraste diferencial de interferencia con los objetivos 16X, 40X y 100X. La identificación de las especies se hizo mediante el uso de claves taxonómicas para el género y las especies de *Brevipalpus* (De Leon 1961; Baker *et al.* 1975; Baker y Tuttle 1987; Welbourn *et al.* 2003, Mesa *et al.* 2009). La descripción de grupos morfológicos (morfoespecies) se hizo de acuerdo con Beard *et al.* (2012).

### 4.3 Extracción de DNA y amplificación

El DNA genómico fue extraído de especímenes adultos de *B. phoenicis* depositados en tubos Eppendorf en grupos de 10 individuos por tubo. Para la extracción se empleó el Kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Germantown, MD, USA) con adaptaciones para la extracción del DNA total en artrópodos pequeños.

El DNA extraído fue amplificado mediante PCR utilizando oligonucleótidos de la región citocromo oxidasa I (CO-I) del DNA mitocondrial DNF- 5' TGA TTT TTT GGT CAC CCA GAA G 3' y DNR- 5' TAC AGC TCC TAT AGA TAA AAC 3' (Navajas *et al.* 1996a). La PCR para la región COI se realizó en un volumen total de reacción de 25  $\mu$ L, que contenía 5  $\mu$ L de DNA, 2.5  $\mu$ L de buffer 10X (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, California, USA), 1  $\mu$ L de  $MgSO_4$  [(50 mM) (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, California, USA)], 0.5  $\mu$ L de dNTP (10 mM), 1  $\mu$ L de la mezcla de oligonucleótidos (10  $\mu$ M) y 0.5  $\mu$ L de Taq Platinum® DNA polimerasa (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, California, USA) ajustando el volumen con agua grado PCR. Las amplificaciones fueron realizadas con un termociclador Applied Biosystems® (Life Technologies Corporation, Foster, CA, USA) en Brasil y con un termociclador MyCycler TM (BIO-RAD Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) en México, usando las mismas condiciones para la PCR. La desnaturalización inicial de las muestras se realizó con un ciclo a una temperatura de 94° C durante 4 min seguida de 35 ciclos de PCR por 1 min de desnaturalización a 94°C, 1 min de alineamiento a 54°C y 1 min

de extensión a 72°C, con una extensión final de 4 min a 72°C, más un periodo infinito a 4°C.

#### **4.4 Secuenciación del DNA**

Las muestras procesadas en el Centro de Citricultura “Sylvio Moreira” IAC, Brasil fueron secuenciadas utilizando el kit “BigDye Terminator 3.1 (Perkin Elmer, Foster City, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras procesadas en el Colegio de Postgraduados, México, fueron enviadas a la empresa MacroGen Inc en Corea del Sur para la realización de la secuenciación.

#### **4.5 Análisis de datos**

Las secuencias fueron editadas y ensambladas mediante el programa BIOEDIT 7.2.0 (Hall 1990), y el alineamiento múltiple de las secuencias fue realizado mediante el programa Clustal W (Thompson *et al.* 1994). Se realizó el análisis de reconstrucción filogenética por el método de máxima parsimonia (MP) mediante el programa MEGA versión 5.2 (Tamura *et al.* 2011). El nivel de confianza de las ramas fue estimado mediante análisis bootstrap con 1000 repeticiones (Felsenstein 1985). Posteriormente los datos fueron analizados para detectar diferencias genéticas entre haplotipos mediante análisis de red por máxima parsimonia (Templeton *et al.* 1992) usando el programa TCS versión 1.21 (Clements *et al.* 2000) y calculando los valores de la diversidad de haplotipos y la diversidad de nucleótidos empleando el programa DnaSP v5 (Librado y Pozas

2009). Finalmente, la significancia en la variación genética entre poblaciones de México y Brasil y entre poblaciones independientemente del origen geográfico fueron determinadas mediante análisis de varianza molecular (AMOVA por sus siglas en inglés), estimado mediante el cálculo del estadístico F usando el programa Arlequin versión 3.5 (Excoffier y Lischer 2010) con 10000 permutaciones.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Identificación y caracterización morfológica de poblaciones de *B. phoenicis*

Se tomaron un total de 35 muestras, tanto de Brasil como de México (Cuadro 1). Se identificaron los ácaros recolectados en cada punto geográfico, tanto de los ácaros mantenidos en alcohol como los usados para establecer una cría. En todos los puntos de muestreo de Brasil sólo se encontró a *B. phoenicis* (Figura 2A). En México, todas las localidades presentaron poblaciones de *B. phoenicis*; sin embargo, sucedió la presencia de *B. californicus* en tres localidades (O2, O4 y O5) (Figura 2B), por lo que se establecieron crías sobre frutos de naranja (un ácaro por fruto). Una vez que se alcanzaba un número suficiente de ácaros (más de 100), se realizaba el montaje e identificación de al menos diez ejemplares, garantizando que sólo individuos de *B. phoenicis* fueran empleados en los estudios.

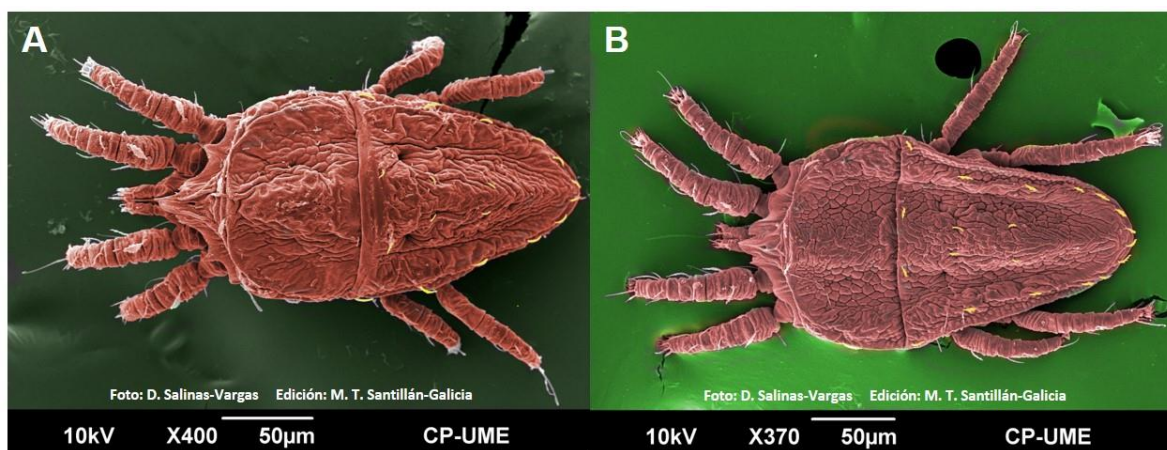


Figura 3. Especies de *Brevipalpus* encontradas en las muestras de naranja dulce. (A) *Brevipalpus phoenicis* y (B) *Brevipalpus californicus*.

**Cuadro 1. Localidades en las cuales se obtuvieron las muestras de *Brevipalpus phoenicis*.**

| <b>Sitio</b>                     | <b>Clave de la muestra</b> | <b>Variedad del hospedero</b> | <b>Latitud/Longitud</b> |
|----------------------------------|----------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| Terenos, Mato Grosso do Sul      | MS (1)                     | Pera                          | 20.428611S 55.008889W   |
| Lavras, Minas Gerais             | LAV (2)                    | Pera                          | 21.287306S 44.988942W   |
| Pouso Alegre, Minas Gerais       | POA (4)                    | Pera                          | 22.266181S 46.008686W   |
| Capitão Poço, Pará               | CP2 (1)                    | Pera                          | 1.825639S 53.10225W     |
| São José Castanhal, Pará         | SJC (2)                    | Pera                          | 1.43325S 53.14735W      |
| São José do Rio Preto, São Paulo | SJRPB (3)                  | Bahía                         | 20.867119S 49.357336W   |
| São José do Rio Preto, São Paulo | SJRPL (3)                  | Lima                          | 20.867119S 49.357336W   |
| São José do Rio Preto, São Paulo | SJRPP (1)                  | Pera                          | 20.867119S 49.357336W   |
| Gurupi, Tocantins                | GUR (2)                    | -----                         | 11.746844S 49.049178W   |
| Palmas, Tocantins                | PAP3 (1)                   | -----                         | 10.291125S 48.2909W     |
| Palmas, Tocantins                | PAP4 (2)                   | -----                         | 10.291125S 48.2909W     |
| Ángel Albino Corzo, Chiapas      | JAL15 (1)                  | Valencia                      | 15.878583N 93.729417W   |

---

|                                   |          |          |                       |
|-----------------------------------|----------|----------|-----------------------|
| Copainalá, Chiapas                | C9 (1)   | Valencia | 17.134611N 93.294472W |
| Copainalá, Chiapas                | C10 (1)  | Valencia | 17.135583N 93.293722W |
| La Concordia, Chiapas             | LC16 (2) | Valencia | 15.888389N 93.7235W   |
| La Concordia, Chiapas             | LC17 (2) | Valencia | 16.097472N 92.812361W |
| La Concordia, Chiapas             | LC18 (2) | Valencia | 16.097472N 92.812361W |
| Ocozocoautla de Espinosa, Chiapas | O1 (1)   | Valencia | 16.972417N 93.503778W |
| Ocozocoautla de Espinosa, Chiapas | O1a (1)  | Valencia | 16.972417N 93.503778W |
| Ocozocoautla de Espinosa, Chiapas | O2 (2)   | Valencia | 17.007528N 93.468111W |
| Ocozocoautla de Espinosa, Chiapas | O4 (1)   | Valencia | 17.033861N 93.515W    |
| Ocozocoautla de Espinosa, Chiapas | O5 (1)   | -----    | 17.033861N 93.544472W |
| Salto de Agua, Chiapas            | SA23 (1) | Valencia | 17.321581N 92.06575W  |
| Salto de Agua, Chiapas            | SA24 (2) | Valencia | 17.338561N 92.083811W |
| Salto de Agua, Chiapas            | SA25 (2) | Valencia | 17.33765N 92.097989W  |
| Tecpatán, Chiapas                 | T6 (2)   | Valencia | 17.217194N 93.400667W |
| Villa Corzo, Chiapas              | VC19 (1) | Valencia | 16.145472N 93.016222W |

---



---

|                       |           |          |                       |
|-----------------------|-----------|----------|-----------------------|
| Villa Corzo, Chiapas  | VC20 (2)  | Valencia | 16.129639N 93.031139W |
| Villa Corzo, Chiapas  | VC21 (2)  | Valencia | 16.18625N 93.064111W  |
| Villa Flores, Chiapas | VF22 (2)  | Valencia | 16.268778N 93.268528W |
| Cárdenas, Tabasco     | CAR28 (2) | Valencia | 17.967194N 93.332361W |
| Comalcalco, Tabasco   | COM29 (1) | Valencia | 18.191419N 93.4054W   |
| Las Choapas, Veracruz | LCH27 (2) | Valencia | 17.599639N 93.796519W |
| Las Choapas, Veracruz | LCH30 (1) | Valencia | 17.555511N 93.785331W |
| Uxpanapa, Veracruz    | UX26 (2)  | Valencia | 17.225931N 94.64535W  |

---

Las características empleadas para la descripción de los grupos morfológicos fueron tomadas de Beard *et al.* 2012 y Ochoa *et al.* 2011. El grupo más predominante fue el tipo naranja o grupo B (Figura 4A), el cual fue encontrado en los cinco estados de Brasil y en los tres de México.

Este grupo se distingue de otros porque en la reticulación de la parte lateral posterior del propodosoma se observan células muy alargadas en comparación con la parte anterior donde son más pequeñas (Figura 4B). La seda dorsal del palpo es setiforme y barbada (Figura 4C).

La reticulación del opistosoma entre las sedas c1 y d1 es lisa a ligeramente arrugada; entre las sedas e1 y posterior a éstas se forman surcos que forman una "V", la cual se desvanece al llegar a las sedas h1 (Figura 4D).

La reticulación ventral entre las sedas 3a y 4a es ligeramente lisa y en la parte posterior lateral a las sedas 4a se observan células redondas (Figura 5A). La placa ventral presenta una reticulación uniforme en forma de células redondas, las cuales son más alargadas en la placa genital (Figura 5B).

La espermoteca se caracteriza por presentar un ducto largo que se une a una vesícula oval, la cual termina con un filamento pequeño (Figura 5C).

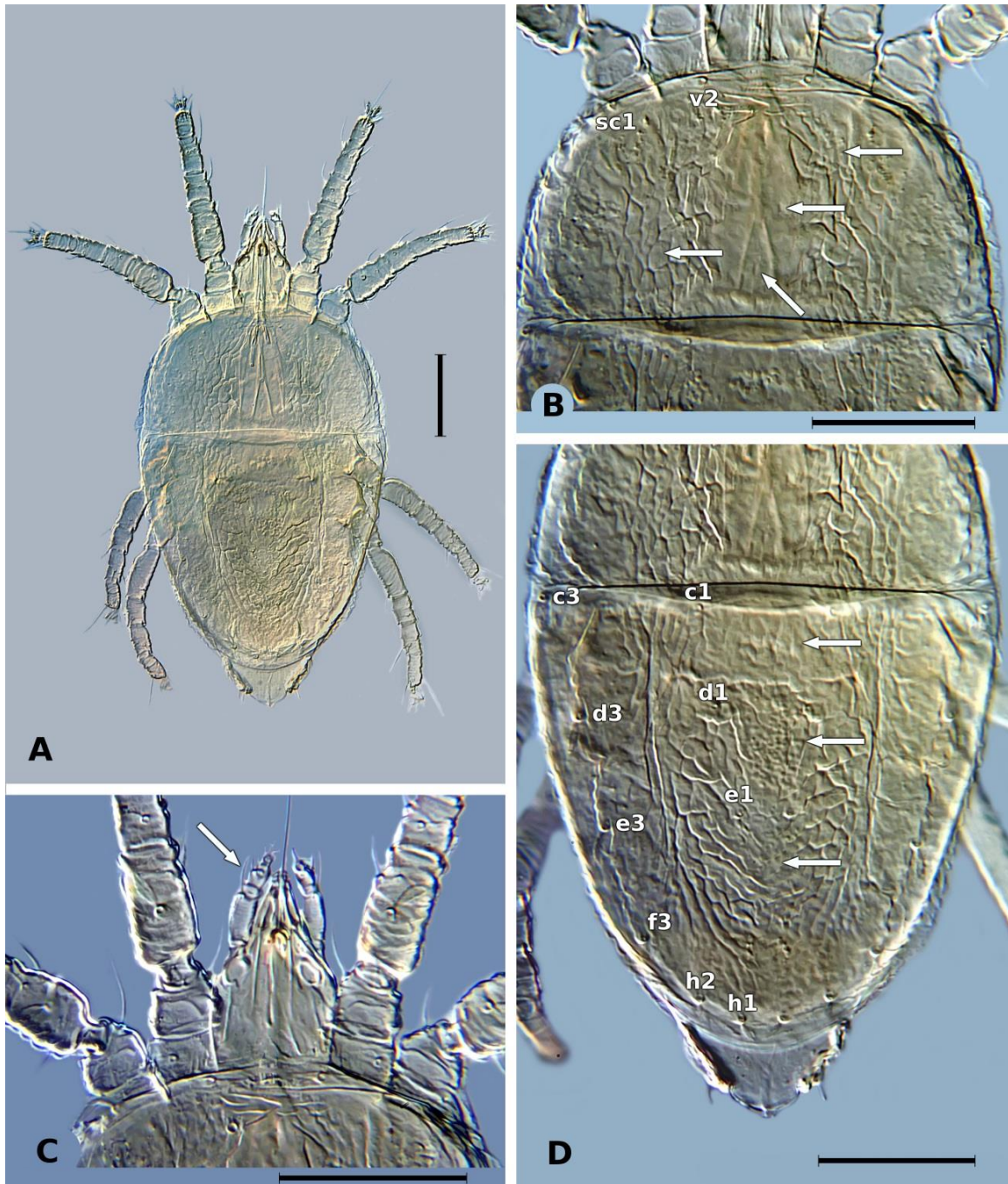


Figura 4. Características distintivas dorsales de la morfoespecie de *Brevipalpus phoenicis* tipo naranja (Grupo B). A) Hembra en vista completa. B) Cutícula del prodorso. C) Cutícula del histerosoma. D) Seda del fémur del palpo.

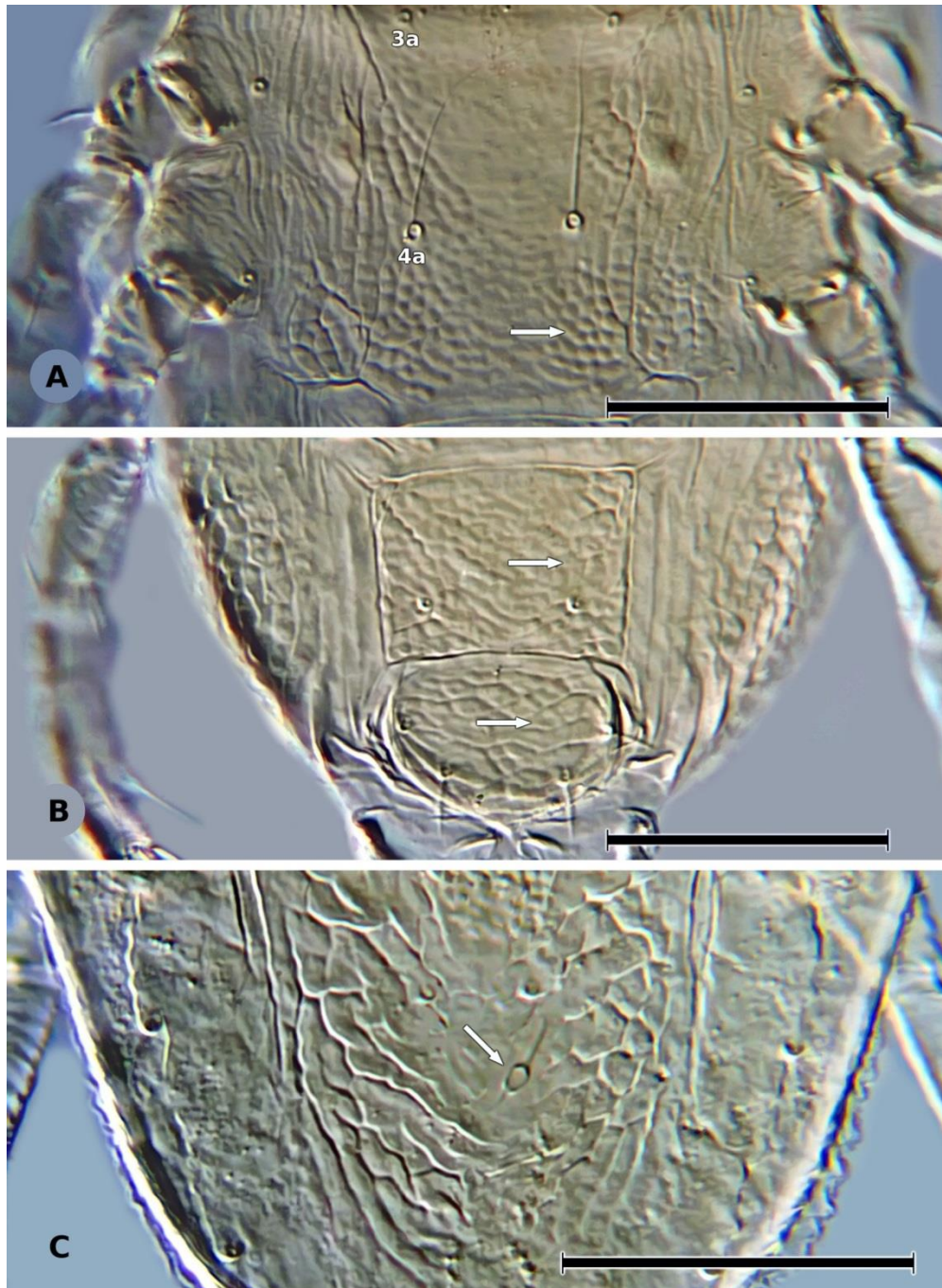


Figura 5. Características distintivas ventrales de la morfoespecie de *Brevipalpus phoenicis* tipo naranja (Grupo B). A) Histerosoma entre las coxas III y IV B) Ornamentación de las placas ventral y genital. C) Espermateca.

El tipo café o grupo C (Figura 6A) sólo fue encontrado en los municipios de Pouso Alegre y Lavras del estado de Minas Gerais. En México sólo se encontró en Ocozocoautla de Espinosa, Chiapas, en la muestra O1, por lo que la caracterización se hizo con base en cinco especímenes montados en líquido de Hoyer (tres de Brasil y dos de México). El número de especímenes se vio limitado porque no fue posible reproducirlas en frutos de naranja, como se hizo con la tipo naranja, tanto en Brasil como en México.

Esta morfoespecie presenta una reticulación en la parte lateral posterior del propodosoma con celdas muy alargadas (Figura 6B). La seda dorsal del palpo es ancha y barbada (Figura 6C). La reticulación del opistosoma entre las sedas c1 y d1 es lisa a ligeramente arrugada y entre las sedas d1 y e1 se observan estrías irregulares. La reticulación entre las sedas e1 y h1 presenta estrías transversales que posteriormente se observan longitudinales (Figura 6D).

La reticulación ventral entre las sedas 3a y 4a es ligeramente rugosa, y en la parte central posterior a las sedas 4a se observan bandas transversales (Figura 7A). La placa ventral y la genital presentan una reticulación que forma bandas transversales (Figura 7B).

La espermateca se caracteriza por presentar un ducto delgado no muy largo que termina distalmente en una vesícula redonda que tiene una corona con proyecciones cortas (Figura 7C).

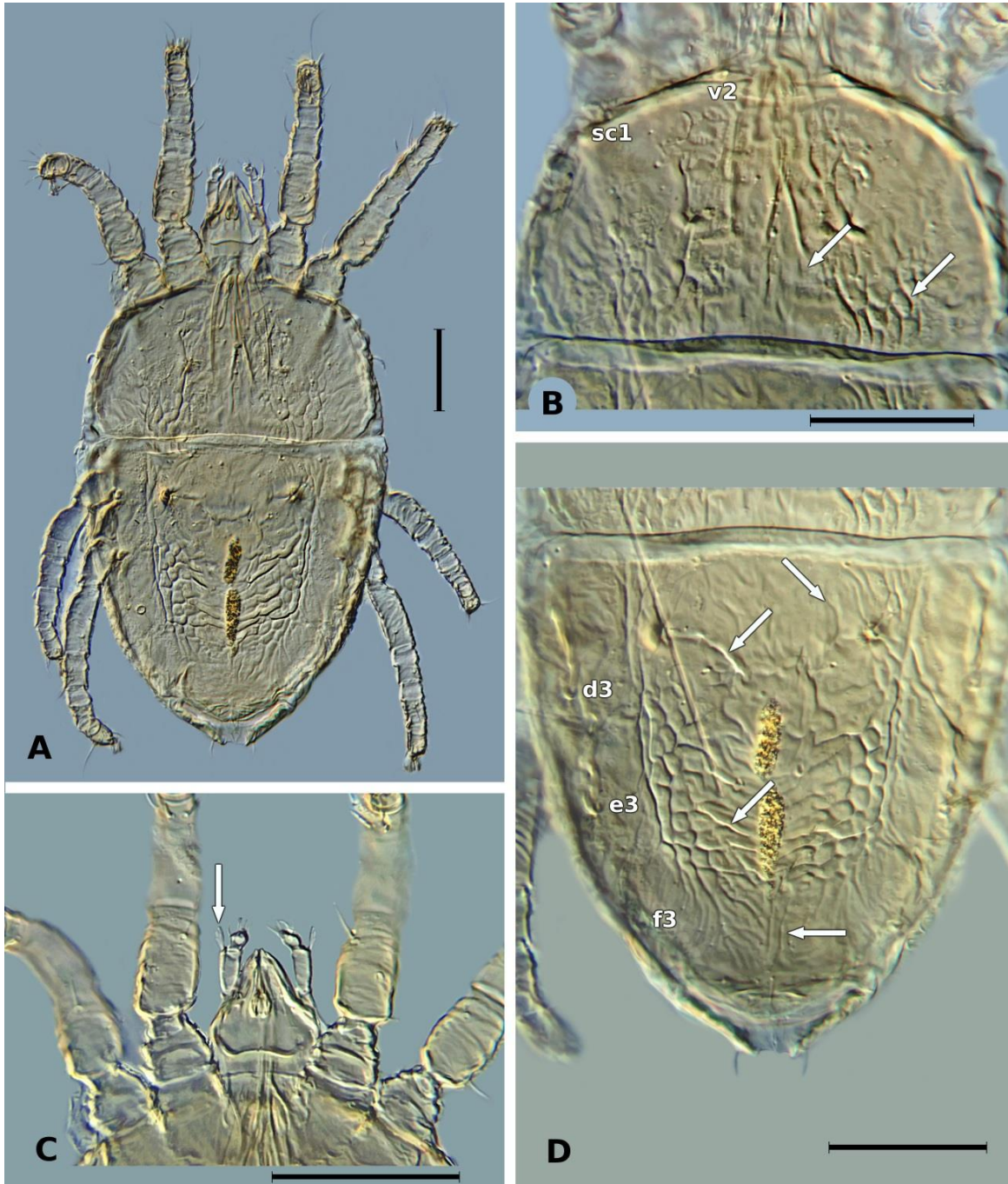


Figura 6. Características distintivas dorsales de la morfoespecie de *Brevipalpus phoenicis* tipo café (Grupo C). A) Hembra en vista completa. B) Cutícula del prodorso. C) Cutícula del histerosoma. D) Seda del fémur del palpo.

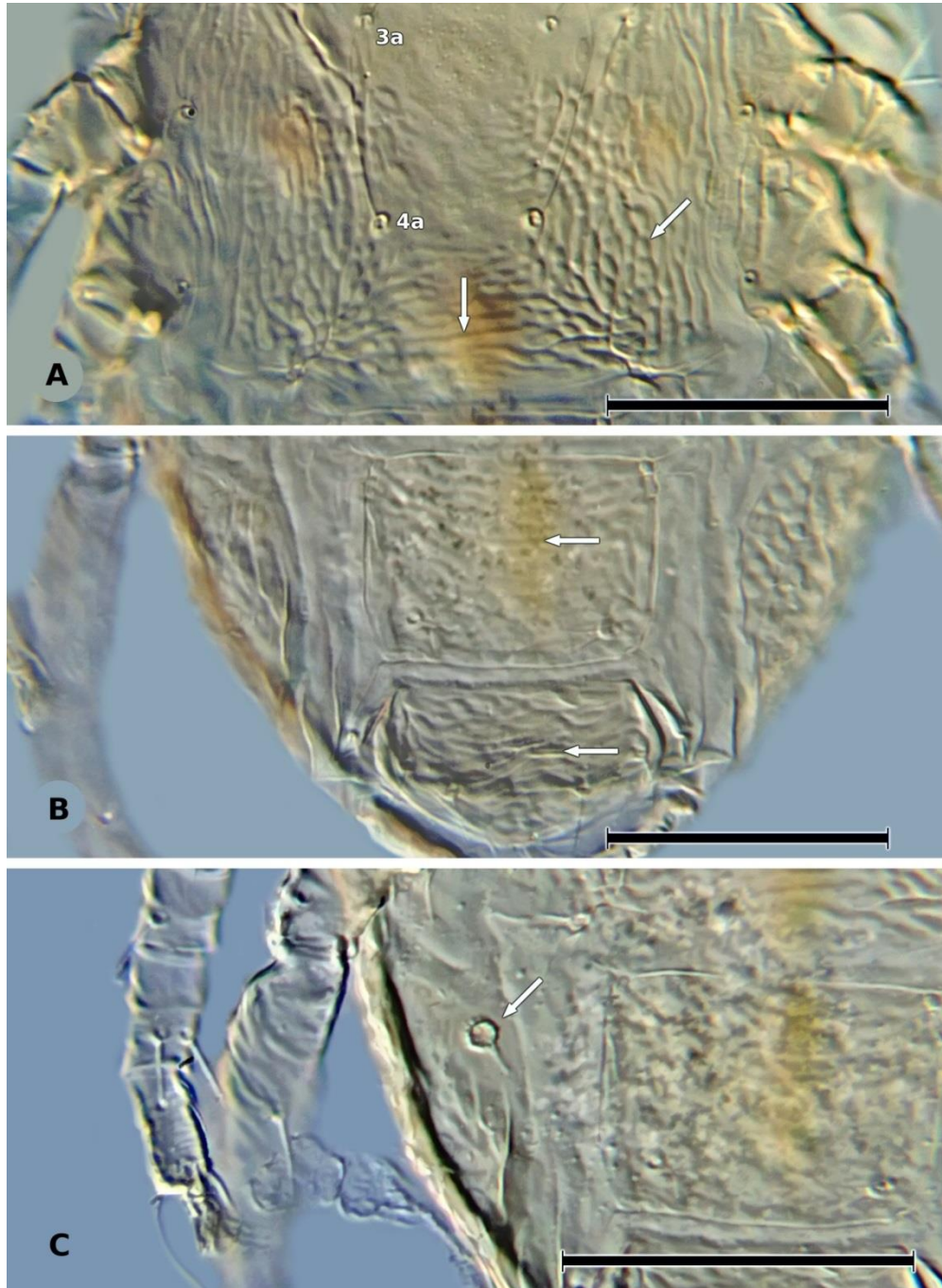


Figura 7. Características distintivas de la morfoespecie de *Brevipalpus phoenicis* tipo café (Grupo C). A) Vista ventral del histerosoma entre las coxas III y IV B) Ornamentación de las placas ventral y genital. C) Espermateca.

## 5.2 Caracterización molecular de poblaciones de *B. phoenicis*

Se obtuvieron 59 secuencias parciales del gen COI, de las cuales después de ser alineadas y cortadas se obtuvo una secuencia final de una longitud de 352 pb. Los números de acceso de GenBank de todas las secuencias se muestran en la Figura 8. El análisis de máxima parsimonia mostró una separación evidente entre los individuos que fueron catalogados como grupo B o C, con un valor de bootstrap del 100% (Figura 8). Todos los individuos del grupo C fueron de Brasil, [Lavras (LAV) y Pouso Alegre (POA)] (Figura 8).

En el grupo B se conformó por el restante de las muestras de Brasil así como con las muestras México, las cuales además se pudieron separar en dos grupos: G1 y G2. En el G1 se agruparon la mayoría de las muestras, excepto São José do Rio Preto (SJRPB-1 y SJRPP-3) que se ubicaron en otra rama, con un valor de bootstrap de 81% (Figura 8). En el G2 sólo se agruparon cinco muestras de Brasil, pero se formaron dos ramas, con un valor de bootstrap de 94%; en la primera se ubicaron las muestras de Terenos (MS-1) y Palmas (PAP3-3) y en la segunda todas las muestras São José do Rio Preto variedad Lima (SJRPL), con un valor de bootstrap de 86%. En el grupo C también se formaron dos ramas (con valor de bootstrap de 96%). En la primera se ubicaron muestras tanto de Lavras (LAV) como de Pouso Alegre (POA), y en la segunda rama sólo muestras de Pouso Alegre (POA) (Figura 8).



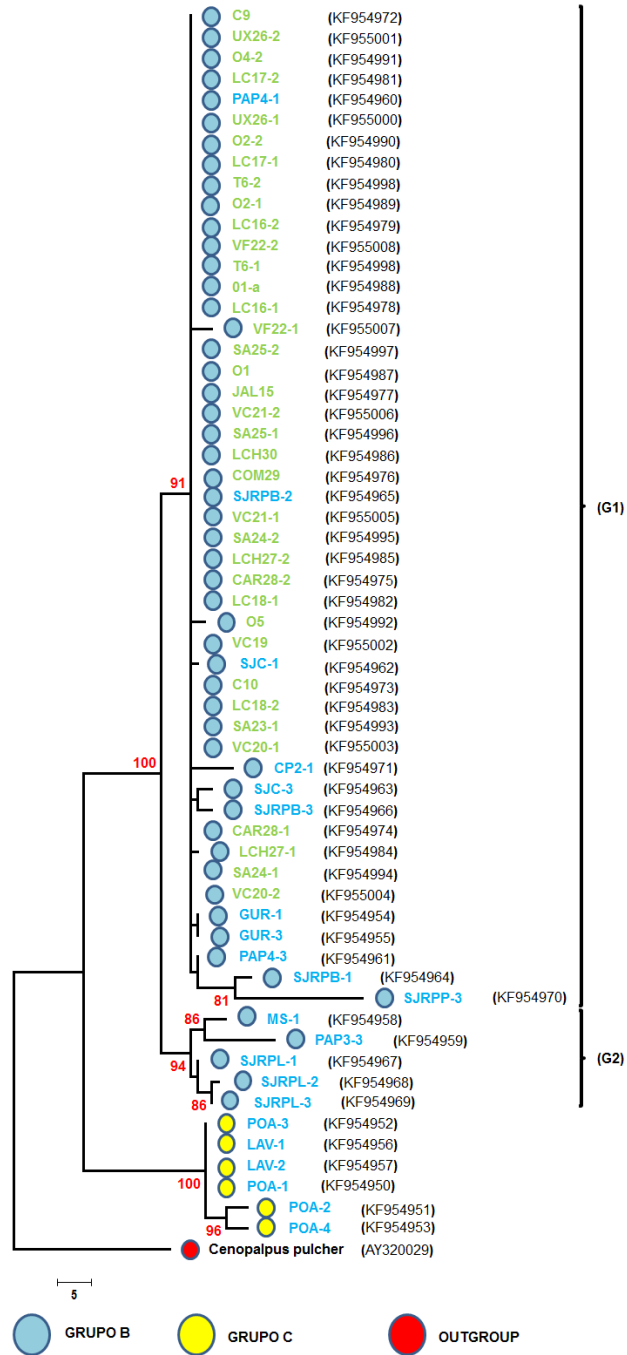


Figura 8. Reconstrucción filogenética de una fracción (352 pb) de la región COI de *B. phoenicis* utilizando el método de máxima parsimonia (MP) con 1000 repeticiones de Bootstrap.

El análisis de red por máxima parsimonia mostró la existencia de 20 haplotipos entre los 35 sitios muestreados de las 20 localidades entre México y Brasil (Cuadro 1 y 2) (Figura 9). Estos haplotipos se dividieron en tres redes no conectadas y dos haplotipos independientes (Figura 9). En la primera (N1) se ubicaron los haplotipos: H01, H02 y H03, todas con una muestra, excepto H01 que contenía cuatro muestras. Todas estas muestras fueron clasificadas morfológicamente en el grupo C y fueron recolectadas de Brasil (Figura 9). La segunda red (N2) contiene cuatro haplotipos, cada uno corresponde a una sola secuencia y todas provienen de Brasil. La última red de haplotipos (N3) contiene 11 haplotipos, los cuales provienen de 47 secuencias. El haplotipo más grande y común fue el H08, el cual agrupó 36 secuencias, de las cuales 34 provienen de poblaciones recolectadas en México. Finalmente, los haplotipos independientes fueron H07 y H17 con una sola secuencia, ambas provenientes de Brasil (Figura 9).

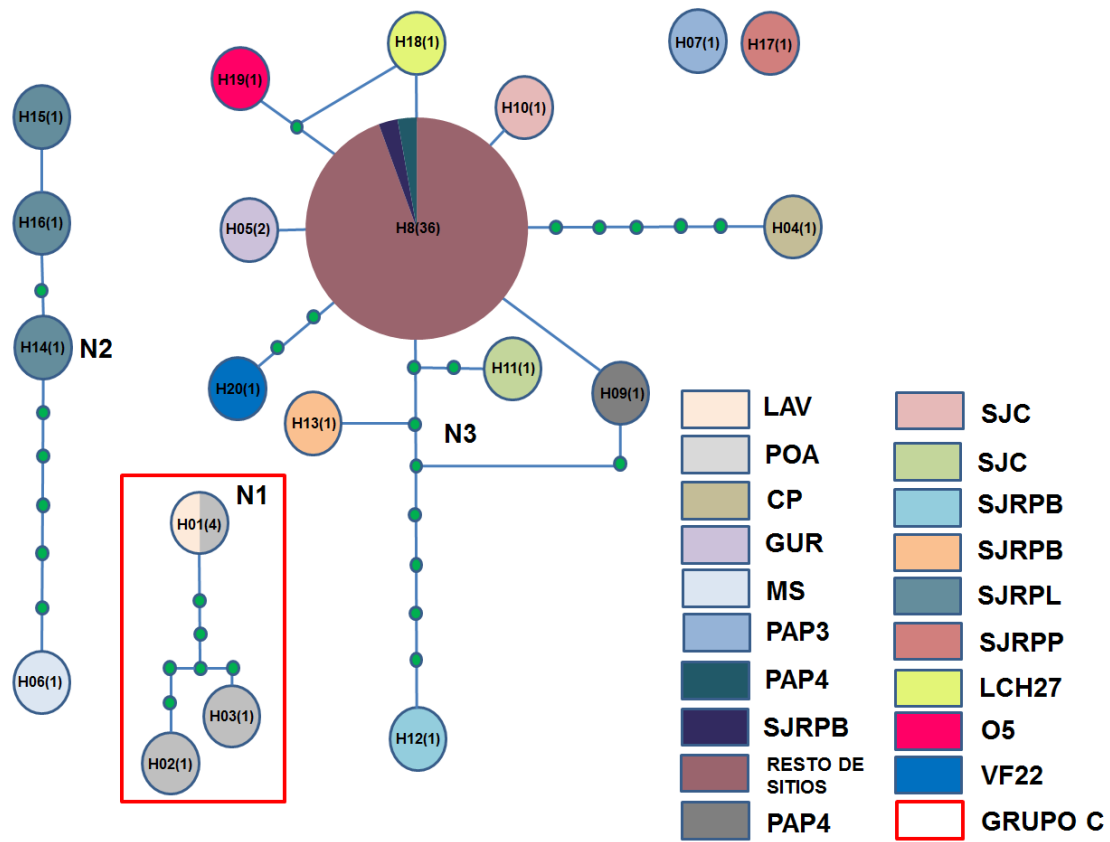


Figura 9. Red de haplotipos de poblaciones de *B. phoenicis* de Brasil y México recolectadas en naranja dulce. Los números entre paréntesis indican las veces que aparece cada haplotipo entre las poblaciones de este estudio.

El análisis de polimorfismos realizado con DnaSp nos muestra que aunque fue mayor el número de secuencias obtenidas de las poblaciones de México, la mayor diversidad genética se encuentra en las poblaciones de Brasil (Cuadro 2).

**Cuadro 2. Análisis de polimorfismos entre las poblaciones de Brasil y México.**

| <b>Grupo</b> | <b>N° de secuencias</b> | <b>No de haplotipos</b> | <b>Diversidad de haplotipos</b> | <b>Diversidad de nucleótidos</b> |
|--------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| Brasil       | 22                      | 17                      | 0.965±0.028                     | 0.06196±0.00701                  |
| México       | 37                      | 4                       | 0.158±0.080                     | 0.00092±0.00152                  |

El análisis AMOVA (Cuadro 3) reveló que la mayor variación (44.92%) fue observada entre las localidades de muestreo de cada país, seguida por la variación entre muestras de cada localidad (29.89%). Finalmente, respecto a la variación de todas las poblaciones combinadas de México comparadas con las de Brasil, a pesar de ser el porcentaje más bajo (25.18%) es significativo ( $P < 0.001$ ), lo cual sugiere que las poblaciones de ambos países están geográficamente estructuradas (Cuadro 3).

**Cuadro 3. Análisis AMOVA para las poblaciones de *B. phoenicis* colectadas en naranja dulce en huertos de Brasil y México.**

| <b>Fuente de variación</b>               | <b>Grados de libertad</b> | <b>Suma de cuadrados</b> | <b>Varianza</b> | <b>Porcentaje de variación</b> |
|------------------------------------------|---------------------------|--------------------------|-----------------|--------------------------------|
| Entre países                             | 1                         | 53.376                   | 1.48            | 25.18**                        |
| Entre localidades dentro de países       | 18                        | 166.180                  | 2.64            | 44.92***                       |
| Dentro de las muestras de cada localidad | 39                        | 68.631                   | 1.75977         | 29.89***                       |
| <b>Total</b>                             | <b>58</b>                 |                          |                 |                                |

\*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001

## 6. DISCUSIÓN

La aplicación de enfoques moleculares y morfológicos en la reconstrucción filogenética de especies es en la actualidad una oportunidad para maximizar la información que se pueda obtener de una especie (Hillis 1987). *Brevipalpus phoenicis* es el vector más importante del CiLV-C por lo que se han realizado estudios en distintos países encaminados a esclarecer la identidad morfológica y genética de este organismo (Welbourn *et al.* 2003; Rodrigues *et al.* 2004; Groot and Breeuwer 2006; Mata *et al.* 2010; Ochoa *et al.* 2011; Navia *et al.* 2013; Mineiro *et al.* 2013a, b y c).

La identificación morfológica, basada en las siguientes características: forma de la espermateca, la seda de la genua del palpo, la reticulación dorsal y ventral descritas por Ochoa *et al.* (2011) y Beard *et al.* (2012), de los ácaros recolectados confirmó claramente la existencia de dos morfoespecies de *B. phoenicis* (B y C), siendo la primera la más frecuente y abundante, en comparación con la morfoespecie del grupo C, la cual sólo fue encontrada en las localidades de Lavras y Pouso Alegre (Minas Gerais) en Brasil y en Ocozocoautla de Espinosa, Chiapas (O1), México, lo que representa el primer reporte de esta morfoespecie para México. Desafortunadamente, no fue posible establecer la cría de este morfoespecie para obtener más individuos para la extracción de DNA y confirmar si existía variación genética como lo obtenido en las muestras de Brasil.

El uso del gen citocromo oxidasa subunidad I ha sido empleado en estudios sobre variabilidad genética y reconstrucción filogenética del ácaro *B. phoenicis* (Rodrigues *et al.* 2004; Groot y Breeuwer 2006; Navia *et al.* 2013); sin embargo, en el trabajo realizado por Groot y Breeuwer se observó que existía cierto conflicto entre el estudio molecular y morfológico. Por ello, en 2013, Navia *et al.* buscaron esclarecer ese conflicto utilizando secuencias ya depositadas en el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) y nuevas secuencias obtenidas de ácaros *Brevipalpus* de distintos países; sus resultados confirmaron la existencia de especies crípticas entre el género *Brevipalpus*.

Con los resultados obtenidos en este trabajo podríamos considerar posible la existencia de especies crípticas entre *B. phoenicis* (Figura 8 y 9), tal y como lo sugieren Navia *et al.* (2013), quienes mostraron que *B. phoenicis* grupo “C” está más relacionado con *B. obovatus* que con otros grupos de *B. phoenicis*.

Aunque no está claro qué factores podrían estar originando esta separación morfológica y genética entre las morfoespecies “B” y “C”, es posible que un proceso de divergencia de especies pudiera estar ocurriendo; sin embargo, creemos que es necesaria la obtención de más muestras y el uso de más de un gen antes de dar una conclusión sobre este asunto. La hibridación entre *B. phoenicis* y *B. obovatus* ha sido propuesta como una causa potencial para la existencia del grupo “C” (Kitajima *et al.* 2011; Navia *et al.* 2013); sin embargo, esto es cuestionable dado a que el tipo de reproducción de *Brevipalpus* spp, es asexual del tipo telitoca, las poblaciones de este género están formadas completamente de

hembras haploides (Weeks *et al.* 2001). A pesar de que algunos machos fueron recolectados en varios sitios de muestreo en Chiapas, México, se ha reportado que los machos de esta especie son espanándricos (estériles) por lo que aunque se llevara a cabo la cópula, no existiría la fertilización (Zaher *et al.* 1970); por lo tanto, postulamos que la hibridación no es el factor que puede originar la divergencia en *B. phoenicis*.

La existencia de las dos morfoespecies encontradas fue genéticamente confirmada para las muestras de Brasil, como se observa en el dendrograma generado del análisis de máxima parsimonia (Figura 8) y la red de haplotipos (Figura 9), ya que en ambos análisis las muestras de la morfoespecie “C” se separaron de las otras muestras confirmadas morfológicamente como morfoespecie “B”.

El análisis de la red de haplotipos sugiere además la necesidad de aumentar la cantidad de sitios de muestreo para reducir la cantidad de “haplotipos hipotéticos” y lograr unir completamente la red del grupo “B”. La consistencia en los resultados demuestra que la morfoespecie “C” posiblemente sea una especie diferente de acuerdo con los resultados publicados por Navia *et al.* (2013), quienes indican que esta morfoespecie está genéticamente más cercana a *B. obovatus* que a otros grupos de *B. phoenicis*.

En 2011 Ochoa *et al.* realizaron recolectas de *B. phoenicis* en café y cítricos en diferentes puntos de São Paulo, Brasil, y observaron diferenciación morfológica de



los especímenes, lo cual estuvo relacionado con el hospedante, a pesar de que observaron que el grupo “B” estuvo presente tanto en cítricos como en café. Similarmente, en nuestro trabajo encontramos tanto el tipo “B” como “C” en las muestras de Lavras, Minas de Gerais, Brasil y Ocozocoautla de Espinosa (muestra O1), Chiapas, México, ambos en naranja. Inicialmente estos grupos morfológicos estuvieron relacionados con el cultivo, cítricos y café, respectivamente; sin embargo, esta concepción ha cambiado al encontrárseles hospedadas en otras plantas.

El análisis de las poblaciones hace notar que existe una mayor variación genética en las poblaciones brasileñas que en las mexicanas. En las poblaciones mexicanas se mostró un nivel muy bajo de diversidad genética por lo que el análisis de MP concentró todas las poblaciones en un solo grupo (Figura 8) y sólo fueron encontrados cuatro haplotipos (Cuadro 2, Figura 9).

A pesar de que la reproducción asexual podría jugar un papel importante en que las poblaciones mexicanas sean monomórficas, es probable que también la presión de selección que las poblaciones de *B. phoenicis* tienen en México no es de la misma intensidad que en Brasil, ya que en este país se da un manejo extensivo con acaricidas para controlar la enfermedad de la leprosis (Campos-Neto *et al.* 1993, Childers 1994; Franco *et al.* 2007; SENASICA 2010).

De forma adicional, posiblemente la planta hospedante podría también tener un rol importante, ya que a pesar de que todas las muestras fueron recolectadas sobre

*Citrus sinensis*, las de Brasil fueron tomadas en cuatro diferentes variedades (Bahía, Lima, Pera, Valencia) y en plantas criollas (Cuadro 1), por lo que cada variedad en cada punto geográfico podría estar formando un nicho especializado (frozen niche) y el haber muestreado casi únicamente naranja var. Valencia en México da soporte a la existencia de poblaciones monomórficas (Groot *et al.* 2005)

La diferenciación asociada al hospedante (DAH) se ha descrito para algunas especies de ácaros anteriormente; por ejemplo, la existencia de 11 linajes genéticamente diferentes de *Aceria tosichella* Keifer (Prostigmata: Eriophyidae) se ha asociado fuertemente con el hospedante (Miller *et al.* 2013). Es interesante cómo el nivel de divergencia puede también ser afectado por el nivel de diferenciación de la planta; por ejemplo, en *Aceria parapopuli* Keifer (Prostigmata: Eriophyidae) la existencia de especies crípticas fue evidente cuando diferentes especies del mismo género de plantas fueron muestreadas, pero cuando plantas de la misma especie fueron muestreadas, la diferenciación genética no fue evidente (Evans *et al.* 2013).

Basados en estas evidencias, proponemos que el haber muestreado diferentes variedades de *C. sinensis* en Brasil pudo haber contribuido a la existencia de diferentes haplotipos comparadas con las poblaciones de México, en donde sólo una variedad fue considerada porque es la variedad más comúnmente cultivada por los agricultores de las localidades muestreadas. Por otra parte, el muestreo en México incluyó únicamente tres de 21 estados citrícolas distribuidos en una gran

diversidad climática y de manejo agronómico por lo que la representatividad es otro factor puede explicar estos resultados.

Tanto en México como en Brasil, la existencia de especies crípticas es un factor que debe considerarse ya que no está clara aún su asociación con la transmisión de partículas virales. Es posible que determinada morfoespecie tenga mayor capacidad para transmitir CiLV-C por lo que la información generada en éste y futuros trabajos pueden dar elementos para desarrollar estrategias más eficaces de control del vector de la leprosis.

Por lo anterior, se propone realizar un muestreo más intensivo abarcando más áreas y plantas hospederas de *B. phoenicis*, así como el uso de más de un gen que permita dar mayor soporte a los resultados en estudios futuros.

## 7. CONCLUSIONES

En todos los huertos de naranja dulce (*Citrus sinensis*) muestreados en Brasil y México se encontró la presencia de *B. phoenicis*; adicionalmente se determinó la presencia de *B. californicus* en tres huertos del estado de Chiapas, municipio de Ocozocoautla de Espinosa.

El estudio morfológico evidenció la presencia de dos grupos (“B” y “C”) de *B. phoenicis* en especímenes provenientes de poblaciones recolectadas tanto en México como en Brasil. El grupo “B” fue el más prevalente, mientras que el grupo “C” sólo se encontró en las localidades de Lavras y Pouso Alegre, Minas Gerais, Brasil y Ocozocoutla de Espinosa, Chiapas, México.

Las poblaciones provenientes de México y Brasil están geográficamente estructuradas. La variación genética entre poblaciones de cada país fue significativa, especialmente entre las localidades de muestreo de cada país.

Estudios adicionales deberán ser realizados para generar resultados más sólidos; mientras tanto, los resultados obtenidos en el presente trabajo sirven como soporte para futuros trabajos sobre la variabilidad e identidad en las morfoespecies de *B. phoenicis*, así como de la implicación en la transmisión de CiLV-C de las mismas.

## 8. LITERATURA CITADA

Alanís-Martínez EI, Rojas-Martínez RI, Otero-Colina G, Robles-García P (2013). Detección de *Citrus Leprosis Virus* tipo nuclear (CiLV-N) mediante RT-PCR en plantas de cítricos. In: XV Congreso Internacional y XL Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C.

Baker EW, Tuttle DM (1987). The false spider mites of Mexico (Tenuipalpidae: Acari). USDA ARS Technical Bulletin 1706.

Baker EJ, Tuttle DM, Abbatiello MJ (1975). The false spider mites of Northwestern and North Central Mexico (Acarina: Tenuipalpidae). Smithsonian Contributions to Zoology 194:1-23.

Baker EW, Suigong Y (1988). A catalog of the false spider mites (Tenuipalpidae: Acari) of the United States. International Journal of Acarology 14: 143-155.

Bastianel M, Freitas-Astúa J, Kitajima EW, Machado MA (2006). The citrus leprosis pathosystem. Summa Phytopathologica 32(3): 211-220.

Bastianel M, Freitas-Astúa J, Nicolini F, Segatti N, Novelli MV, Rodrigues V, Medina CL, Machado MA (2008). Response of mandarin cultivars and hybrids to citrus leprosis virus. Journal of Plant Pathology. 90(2): 307-312.

Bastianel M, Novelli MV, Kitajima WE, Kubo KS, Bassanezi SR, Machado MA, Freitas-Astúa J (2010). Citrus leprosis. Centennial of an unusual mite-virus pathosystem. *Plant Disease* 94(3): 284-292.

Beard JJ, Ochoa R, Redford AJ, Trice MD, Walters TW, Mitter C (2012). Flat mites of the World—Part I *Raoiella* and *Brevipalpus*. Identification Technology Program, CPHST, PPQ, APHIS, USDA; Fort Collins, CO, USA. Disponible via <http://idtools.org/id/mites/flatmites/>

Beheregaray LB, Caccone A (2007). Cryptic biodiversity in a changing world. *Journal of Biology* 6(4): 9.

Behura KS (2006). Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. *Molecular ecology* 15(11): 3087-3113.

Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, Peter KL, Meier R, Winker K, Ingram KK, Das I (2006). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 22(3): 148-155.

Bitancourt AA (1955). Estudos sobre a leprose dos citros. I. Distribuição geográfica e sintomatologia. *Arquivos do Instituto Biológico* 22: 161-189.

Boaretto CMA, Chiavegato-Gonzaga L y da Sylva DCA (1993). Transmissão da leprose através de fêmeas de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari:

Tenuipalpidae) e de seus descendentes, em condições de laboratório. Científica, São Paulo. 21(2): 245-253.

Campos Neto HM, Moura E, Passos HR, Ciniglio Neto F, Mariconi FAM, Scarpari Filho JA (1993). Chemical control of the leprosis mite *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) in citrus. Scientia Agricola. 50(2): 267-271.

Castellana S, Vicario S, Saccone C (2011). Evolutionary patterns of the mitochondrial genome in Metazoa: exploring the role of mutation and selection in mitochondrial protein-coding genes. Genome Biology and Evolution 3: 1067-1079.

Chagas CM, Kitajima WE, Rodrigues VCJ (2003). Coffee ringspot virus vectored by *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) in coffee. Experimental and Applied Acarology. 30(1-3): 203-213.

Chiaradia LA, Souza LC (2001). Flutuação populacional do "ácaro da leprose" *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari, Tenuipalpidae) em pomares de citros do oeste catarinense. Pesquisa Agropecuária Gaúcha 7(2): 201-209.

Chiavegato-Gonzaga L (1986). Biologia do ácaro *Brevipalpus phoenicis* em citros. Pesquisa Agropecuaria Brasileira 21(8): 813-816.

Childers CC (1994). Feeding injury to 'Robinson' tangerine leaves by *Brevipalpus* mites (Acari: Tenuipalpidae) in Florida and evaluation of chemical control on citrus. Florida Entomologist. 77(2): 265-271.

Childers CC, Kitajima WE, Welbourn CW, Rivera C, Ochoa R (2001). *Brevipalpus* como vectores de la leprosis de los cítricos. Manejo Integrado de Plagas 60: 61-65.

Childers CC, Derrick SK (2003). *Brevipalpus* mites as vectors of unassigned rhabdoviruses in various crops. Experimental and Applied Acarology 30(1-3): 1-3.

Childers CC, Rodrigues VJC, Welbourn CW (2003a). Host plants of *Brevipalpus californicus*, *B. obovatus*, and *B. phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) and their potential involvement in the spread of viral diseases vectored by these mites. Experimental and Applied Acarology 30(1-3): 1-4.

Childers CC, French JV, Rodrigues VJC (2003b). *Brevipalpus californicus*, *B. obovatus*, *B. phoenicis* and *B. lewisi* (Acari: Tenuipalpidae): a review of their biology, feeding injury and economic importance. Experimental and Applied Acarology 30(1-3): 5-28.

Childers CC, Rodrigues CV (2011). An overview of *Brevipalpus* mites (Acari: Tenuipalpidae) and the plant viruses they transmit. Zoosymposia 6: 180-192.



Clement M, Posada D, Crandall K (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657-1660.

Colariccio A, Lovisolo O, Chagas OC, Galleti RS, Rossetti V, Kitajima WE (1995). Mechanical transmission and ultrastructural aspects of citrus leprosis disease. *Fitopatologia Brasileira* 20(2): 208-213.

Cruickshank HR (2002). Molecular markers for the phylogenetics of mites and ticks. *Systematic and Applied Acarology* 7: 3-14.

Czermainski BCA, Bassanezi BR, Laranjeira FF, Amorim L (2007). Dinâmica temporal da população do ácaro *Brevipalpus phoenicis* e da leprose dos citros sob condições naturais de epidemia. *Fitopatologia Brasileira* 32(4): 295-303.

De Leon D (1961). The genus *Brevipalpus* in Mexico. Part II (Acarina: Tenuipalpidae). *Florida Entomologist* 44(1): 41-52.

Dowling PGA, Ochoa R, Beard JJ, Welbourn WC, Ueckermann EA (2010). Phylogenetic investigation of the genus *Raoiella* (Prostigmata: Tenuipalpidae): diversity, distribution and world invasions. *Experimental and Applied Acarology* 57(3-4): 257-269.

Evans LM, Allan GJ, Meneses N, Max TL, Whitham TG (2013). Herbivore host-associated genetic differentiation depends on the scale of plant genetic variation examined. *Evolutionary Ecology* 27(1): 65-81.

Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10(3): 564-567.

Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39(4): 783-791.

Franco RC, Casarin FBN, Domingues AF, Omoto C (2007). Resistência de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae) a acaricidas inibidores da respiração celular em citros: resistência cruzada e custo adaptativo. *Neotropical Entomology*. 36(4): 565-576.

Freitas-Astúa J, Kitajima EW, Bastianel M, Locali EC, Antonioli R, Machado MA (2004). Identification of citrus leprosis virus-nuclear type (CiLV-N) in sweet orange in the state of Rio Grande do Sul. *Virus Reviews & Research*. 9(1): 246-247.

Gissi C, Iannelli F, Pesole G (2008). Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species. *Heredity* 101(4): 301-320.

Gómez EM, Vargas RC, Rivadameira, Locali EC, Freitas-Astúa J, Astúa-Monge G, Rodrigues JCV, Mesa Cobo NC, Kitajima WE (2005). First report of citrus leprosis virus on citrus in Santa Cruz, Bolivia. *Plant Disease* 89(6):686.

González HR (1975). Revision of the *Brevipalpus phoenicis* "complex" with descriptions of new species from Chile and Thailand (Acarina: Tenuipalpidae). *Acarologia* 18(1): 81-91.

Groot VMT, Jassen A, Pallini A, Breeuwer AJJ (2005). Adaptation in the asexual false spider mite *Brevipalpus phoenicis*: evidence for frozen niche variation. *Experimental and Applied Acarology* 36(3): 135-160.

Groot VMT, Breeuwer AJJ (2006). *Cardinium* symbionts induce haploid thelytoky in most clones of three closely related *Brevipalpus* species. *Experimental and Applied Acarology* 39(3-4): 257-271.

Hall TA (1990). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.

Haramoto FH (1966). Biology and control of *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) Acarina: Tenuipalpidae. Thesis. Doctor of philosophy. University of Hawaii. 105 p.

Helle W, Bolland HR, Heitmans WRB (1980). Chromosomes and types of parthenogenesis in the false spider mites (Acari: Tenuipalpidae). *Genetica* 54(1): 45-50.

Hillis MD (1987). Molecular vs morphological approaches to systematics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 18: 23-42.

Izquierdo CI, Zermeño DLF, Mendez W, Otero-Colina G, Freitas-Astúa J, Localli-Fabris EC, de Moraes GJ, Faier CR, Tassi AD, Kitajima WE (2011). Confirmation of the presence of the *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C) in Southern Mexico. *Tropical Plant Pathology* 36(6): 400-403.

Jeppson LR, Keifer HH, Baker EW (1975). — Mites injurious to economic plants — Berkeley: University California Press. 614 p.

Kitajima WE, Muller GW, Costa AS, Yuki VA (1972). Short rodlike particles associated with citrus leprosis. *Virology* 50(1): 254-258.

Kitajima EW, Chagas CM, Rodrigues VJC (2003a). *Brevipalpus*-transmitted virus and virus like diseases: cytopathology and some recent cases. *Experimental and Applied Acarology* 30(1-3): 135-160.

Kitajima WE, Rezende JAM, Rodrigues JCV (2003b). Passion fruit green spot vírus vectored by *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) on passion fruit in Brazil. *Experimental and Applied Acarology* 30(1-3): 225-231.

Kitajima EW, Ferreira PTO, Freitas-Astúa J, Machado MA (2004). Ocorrência da leprose dos citros, tipo nuclear (CiLV-N) nos municípios paulistas de Monte Alegre do Sul e Amparo. *Summa Phytopathologica*. 30:68.

Kitajima WE, Kubo KS, Ferreira PTO, Alcantara BK, Boari AJ, Gomes RT, Freitas-Astua J, Rezende JAM, Moraes GJ, Salaroli RB (2007). Chlorotic spots on *Clerodendrum*, a disease caused by a nuclear type of *Brevipalpus* (Acari: Tenuipalpidae) transmitted virus. *Scientia Agricola* 65(1): 36-49.

Kitajima WE, Tassi DA., Novelli MV, Caceres S, Aguirre A, Costa N, de Moraes JG (2011). Asymmetry in the number of solenidia on tarsi II of *Brevipalpus* (Acari: Tenuipalpidae) populations from Argentina. *Zoosymposia* 6: 39-44.

Krantz GW, Walter DE (2009). *A Manual of Acarology* 3rd ed. –Texas Tech University. Press, Lubbock, Texas. 807 p.

Kubo KS, Novelli MV, Bastianel M, Localli-Fabris CE, Antonioli-Luizon R, Machado MA, Freitas-Astúa J (2011). Detection of *Brevipalpus* –transmitted viruses in their mite vectors by RT-PCR. *Experimental and Applied Acarology* 54(1):33-39.

Kumar PN, Rajavel RA, Natarajan R, Jambulingam P (2007). DNA barcodes can distinguish species of Indian mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 44(1):1-7

Leon GA, Realpe CE, Garzon PA, Rodriguez JA, Moreno MG, Childers CC, Achor D, Freitas-Astúa J, Antonioli-Luizon R, Salaroli SB, Cobo, NCM, Kitajima WE (2006). Occurrence of citrus leprosis virus in Llanos Orientales, Colombia. *Plant Disease* 90(5): 682.

Librado P, Rozas J (2009). DnaSp v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25(11): 1451-1452.

Locali-Fabris E, Freitas-Astua J, Souza AA, Takita MA, Astua-Monge G, Antonioli-Luizoni R, Rodrigues V, Targon MLPN, Machado MA (2006). Complete nucleotide sequence, genomic organization and phylogenetic analysis of Citrus leprosis virus cytoplasmic type. *Journal of General Virology* 87(9): 2721-2729.

Lovisol O (2001). Citrus leprosis virus: properties, diagnosis, agro-ecology and phytosanitary importance. *Bulletin OEPP/EPPO* 31: 79-89.

Manson DCM (1967). Mites of the families Tenuipalpidae and Tetranychidae intercepted entering New Zealand from overseas. *New Zealand Journal of Science* 10: 664-674.

- Marques PRJ, Kitajima WE, Freitas-Astúa J, Appezato-da-Gloria B (2010). Comparative morpho-anatomical studies of the lesions caused by citrus leprosis virus on sweet orange. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 8(2): 501-511.
- Mata J, Setamou M, French VJ, Louzada E (2010). Molecular fingerprinting and population dynamics of *Brevipalpus* mites on Texas citrus. *Annals of the Entomological Society of America* 103(6): 898-907.
- Méndez-Méndez P, Sánchez SS, Romero NJ, Ortiz GCF (2012). Fluctuación poblacional de *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae), vector de la leprosis de los cítricos en Tabasco, México. *Fitosanidad* 16(2): 73-77.
- Mesa NC, Ochoa R, Welbourn WC, Evans GA, Moraes GJ (2009). A catalog of the Tenuipalpidae (Acari) of the world with a key to genera. *Zootaxa* 2098: 1–185.
- Miller AD, Skoracka A, Navia D, de Mendonca R, Szydło W, Schultz M, Smith CM, Truol G, Hoffmann AA (2013). Phylogenetic analyses reveal extensive cryptic speciation and host specialization in an economically important mite taxon. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 66(3): 928-940.
- Mineiro JLC, Sato ME, Ferreira PR, Tsuboka CS, Ochoa R (2013a). Caracterização morfológica de diferentes morfoespécies de *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae). IV Simpósio Brasileiro de Acarologia. IV SIBAC - Simpósio Brasileiro de Acarologia. Bento Gonçalves. Rio Grande do Sul, Brasil.

Mineiro JLC, Sato ME, Ochoa R (2013b). Variabilidade morfológica e morfométrica em diferentes populações (morfoespecies) de *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae). IV Simpósio Brasileiro de Acarologia. IV SIBAC - Simpósio Brasileiro de Acarologia. Bento Gonçalves. Rio Grande do Sul, Brasil.

Mineiro JLC, Sato ME, Ferreira PR, Tsuboka CS, Ochoa R (2013c). Distribuição de diferentes morfoespecies de *Brevipalpus phoenicis* (Acari:Tenuipalpidae) em diferentes localidades e plantas no estado de São Paulo. IV SIBAC - Simpósio Brasileiro de Acarologia. Bento Gonçalves. Rio Grande do Sul, Brasil.

Miranda CL, Navia D, Rodrigues JCV (2007). *Brevipalpus* mites Donnadieu (Prostigmata: Tenuipalpidae) associated with ornamental plants in Distrito Federal, Brazil. Neotropical Entomology 36(4): 587 – 592.

Navajas M, Fournier D, Lagnel J, Gutiérrez J, Boursot P (1996a). Mitochondrial COI sequences in mites: evidence for variations in base composition. Insect Molecular Biology 5(4): 281-285.

Navajas M, Gutierrez J, Lagnel J, Boursot P (1996b). Mitochondrial cytochrome oxidase I in tetranychid mites: a comparison between molecular phylogeny and changes of morphological and life history traits. Bulletin of Entomological Research 86(4): 407-417.



Navajas M, Fenton B (2000). The application of molecular markers in the study of diversity in acarology: a review. *Experimental and Applied Acarology* 24(10-11): 751-774.

Navia D, Mendonça SR, Ferragut F, Miranda CL, Trincado CR, Michaux J, Navajas M (2011). Cryptic diversity in *Brevipalpus* mites (Tenuipalpidae). *Zoologica Scripta* 42(2): 406-426.

Ochoa RC, Salas LA (1989). The genus *Brevipalpus* in Costa Rica (Acari: Tenuipalpidae). *International Journal of Acarology* 15(1): 21–30.

Ochoa R, Mineiro JLC, Matioli AL, Beard JJ, de Moraes GJ, Bauchan, Sato ME (2011). *Brevipalpus phoenicis* no Brasil, quem é? III SIBAC – Simpósio Brasileiro de Acarologia. Campinas, São Paulo, Brasil.

Oliveira CAL (1986). Flutuação populacional e medidas de controle do ácaro da leprose *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) em citros. *Laranja* 1(7): 1-31.

Othman EO (2012). Mitochondrial DNA as a marker for genetic diversity and evolution. *Advances in Genetic Engineering & Biotechnology* 1(1):1-2.

Palmieri M, Donis I, Salazar AL, Blanco S, Porres M, Brlansky RH, Guerra-Moreno AS, Manjunath KL, Lee RF (2007). Leprosis in Guatemala. In: Hilf ME, Duran-Vila N,

Rocha-Peña MA (eds) *Proceedings of the 16th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV*. Riverside. 510 p.

Pascon CR, Kitajima JP, Breton CM, Assumpção L, Greggio C, Zanca SA, Okura KV, Alegria CM, Camargo EM, Silva GCG, Cardozo CJ, Vallim AM, Franco FS, Silva HV, Junior JH, Oliveira F, Giachetto FP, Ferrari F, Aguilar-Vildoso CI, Franchiscini JBF, Silva MFJ, Arruda P, Ferro AJ, Reinach F, da Silva RAC (2006). The complete nucleotide sequence and genomic organization of Citrus Leprosis associated Virus, Cytoplasmatic type (CiLV-C). *Virus Genes* 32(3): 289-298.

Pfenninger M, Schwenk K (2007). Cryptic animal species are homogeneously distributed among taxa and biogeographical regions. *BMC Evolutionary Biology* 7(121):1-6.

Rodrigues JCV, Kitajima EW, Childers CC, Chagas CM (2003). Citrus leprosis virus vectored by *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) on citrus in Brazil. *Experimental and Applied Acarology* 30(1-3): 161–179.

Rodrigues VJC, Gallo-Meagher M, Ochoa R, Childers CC, Adams JB (2004). Mitochondrial DNA and RAPD polymorphisms in the haploid mite *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae). *Experimental and Applied Acarology* 34(3-4): 275-290.

Rosas-Acevedo JL, Sampedro-Rosas L (2000). Control biológico de *Brevipalpus* spp em *Citrus aurantifolia* en Guerrero, México. *Manejo Integrado de Plagas*. 55: 59-69.

Roy A, Stone A, Otero-Colina G, Wei G, Choudhary N, Achor D, Shao J, Levy L, Nakhla KM, Hollingsworth RC, Hartung SJ, Schneider LW, Brlansky HR (2013). Genome assembly of citrus leprosis virus nuclear type reveals a close association with orchid fleck virus. *GenomeA* 1(4): 1-2.

Rueanghiran C, Apiwathnasorn C, Sangthong P, Samung Yudthana, Ruanghsittichai J (2011). Utility of a set of conserved mitochondrial Cytochrome Oxidase subunit I for *Mansonia annulata* identification. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 42(6): 1381–1387.

Saavedra de Dominguez FS, Bernal A, Childers CC, Kitajima WE (2001). First report of *Citrus leprosis virus* in Panama. *Plant Disease* 85(2): 228.

Salinas-Vargas D, Santillán-Galicia MT, Valdez-Carrasco J, Mora-Aguilera G, Atanacio-Serrano Y, Romero-Pescador P (2013). Species composition and abundance of *Brevipalpus* spp. on different citrus species in Mexican orchards. *Neotropical Entomology* 42(4): 419-425.

Sánchez-Anguiano H (2005) NAPPO Phytosanitary Alert System [www.pestalert.org/notifications.cfm?region=Mexico](http://www.pestalert.org/notifications.cfm?region=Mexico) (Fecha de consulta: 2 de Enero, 2014).

Schlötterer C (2004). The evolution of molecular markers – just a matter of fashion? *Nature Reviews* 5(1): 63-69.

SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria) (2010).

Protocolo para la detección y el manejo de la leprosis de los cítricos. Dirección General de Sanidad Vegetal. 29 p.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5:

Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28(10): 2731-2739.

Templeton AR, Crandall KA, Sing CF (1992). A cladistic analysis of phenotypic

associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* 132(2): 619-633.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of

progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22(22): 4673-4680.

Toda S, Osakabe MH, Komazaki S (2000). Interspecific diversity of mitochondrial COI

sequences in Japanese *Panonychus* species (Acari: Tetranychidae). *Experimental and Applied Acarology* 24(10-11): 821-829.

Trindade MLB, Chiavegato LG (1994). Caracterização biológica dos ácaros *Brevipalpus obovatus* D, *Brevipalpus californicus* B e *Brevipalpus phoenicis* G (Acari: Tenuipalpidae). Anais da Sociedade Entomológica do Brasil 23(2): 189-195.

Vacante V (2010). Review of the phytophagous mites collected on citrus in the world. *Acarologia* 50(2): 221-241.

Weeks AR, Marec F, Breeuwer AJ (2001). A mite species that consists entirely of haploid females. *Science* 292(5526): 2479-2482.

Welbourn WC, Ochoa R, Kane EC, Erbe FE (2003). Morphological observations on *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) including comparisons with *B. californicus* and *B. obovatus*. *Experimental and Applied Acarology* 30(1-3): 107–133.

Yuan Ming-Long, Wei Dan-Dan, Zhang Kun, Gao Yu-Zhen, Liu Yong-Hua, Wang Bao-Jun, Wang Jin-Jun (2010). Genetic diversity and population structure of *Panonychus citri* (Acari: Tetranychidae), in China based on mitochondrial COI gene sequences. *BioOne* 103(6): 2204-2213.

Zaher MA, Wafa AK, Yousef AA (1970). Biology of *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) in Egypt. *Bulletin de la Societé Entomologique d'Egypte* 54: 177-183.