



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

PROGRAMA DE POSTGRADO EN FITOSANIDAD

ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

**DETERMINACIÓN
MORFOMÉTRICA-MOLECULAR
DE UNA POBLACIÓN ABERRANTE
DE *Brevipalpus californicus* Y SU
PAPEL COMO VECTOR DE *Citrus
leprosis virus* (CiLV-C y OFV-citrus)**

JUAN MANUEL ÁVALOS CERDAS

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2019

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe JUAN MANUEL ÁVALOS CERDAS, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser participe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor GABRIEL OTERO COLINA, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis Determinación morfológica-molecular de una población aberrante de Brevipalpus californicus y su papel como vector de Citrus leprosis virus (CiLV-C y OFV-citrus)

y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 02 de mayo de 2019



Firma del
Alumno (a)



Gabriel Otero Colina

Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis, titulada Determinación morfométrica-molecular de una población aberrante de *Brevipalpus californicus* y su papel como vector de *Citrus leprosis virus* (CiLV-C y OFV-citrus), realizada por el alumno Juan Manuel Ávalos Cerdas con 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

Dr. Gabriel Otero Colina

ASESOR

Dr. Néstor Bautista Martínez

ASESOR

Dr. Daniel L. Ochoa Martínez

ASESOR

Dr. Ángel Villegas Monter

Montecillo, Texcoco, Estado de México, mayo de 2019

**Determinación morfométrica-molecular de una población aberrante de *Brevipalpus californicus* y su papel como vector de *Citrus leprosis virus* (CiLV-C y OFV-citrus),
Juan Manuel Ávalos Cerdas, M. en C.
Colegio de Postgraduados, 2019**

RESUMEN

Se realizó la caracterización morfométrica y molecular de la población aberrante de *Brevipalpus californicus* y se determinó su capacidad de adquirir e inocular los virus de la leprosis de los cítricos tipos citoplasmático (CiLV-C) y nuclear (OFV-citrus). Para la parte morfométrica, se realizó un estudio fotográfico con las especies la población aberrante de *B. californicus*, designada como *Brevipalpus* sp. (Tetipac) por su sitio de colecta, *B. californicus* (designados como “Texcoco”, procedentes de una población fundada a partir de una hembra colectada en Texcoco, México), *B. lewisi* y *B. californicus*, las dos últimas con ejemplares de sus respectivas series tipo. En ejemplares de cada una de estas especies se midieron 37 características morfométricas y se compararon por análisis univariado y multivariado (componentes principales). En el estudio molecular se utilizaron ejemplares de la población aberrante de *Brevipalpus* sp. (Tetipac) y *B. californicus* (Texcoco). Se amplificaron por PCR dos segmentos del gen COI de 339 pb (iniciadores DNF/DNR) y 650 pb (iniciadores LCOI/HCOI), así como un segmento del gen 28S (iniciadores D23F-D6R). Con las secuencias obtenidas se construyeron árboles de filogenia por el método Neighbor-Joining. Las pruebas de adquisición de CiLV-C y OFV-citrus se realizaron con larvas, ninfas y hembras adultas (15 ácaros por repetición en 10 repeticiones por estadio), confinadas durante periodos de 24, 48 y 72 h en hojas de naranja con positivas a leprosis citoplasmática o nuclear. Las pruebas de transmisión se llevaron a cabo en Cárdenas, Tabasco (CiLV-C) y en Toluca, Querétaro (OFV-citrus), México. En este estudio, 25 ácaros (todos los estadios) fueron confinados durante 48-120 h en hojas de naranja infectadas con CiLV-C u OFV-citrus y posteriormente fueron transferidos a plántulas de *Arabidopsis thaliana*, *Phaseolus vulgaris* o *Citrus sinensis* var. Valencia. La detección de dichos virus se realizó mediante RT-PCR con los iniciadores MPF/MPR (CiLV-C) y CiLV-N-NPF/CiLVN-NPR (OFV-citrus). En la caracterización morfométrica solo 17

características fueron significativamente diferentes entre especies, según el análisis univariado. El análisis multivariado mostró que la población aberrante de *Brevipalpus* sp. (Tetipac) y *B. californicus* (Texcoco) no son entidades separadas. La caracterización molecular mostró que *Brevipalpus* sp. (Tetipac) es un linaje cercano a *B. californicus* sensu lato. En dos repeticiones hubo adquisición de CiLV-C, mientras que en OFV-citrus se obtuvieron 84 resultados positivos. En plantas indicadoras de *A. thaliana* y *P. vulgaris* no se observaron síntomas luego de la infestación con la población aberrante de *Brevipalpus* sp. (Tetipac) infectados con OFV-citrus. En plantas de *C. sinensis* mantenidas en Tolimán, Querétaro, se observaron síntomas asociados con OFV-citrus. Sin embargo en ningún caso este virus fue detectado por RT-PCR.

PALABRAS CLAVE: relación morfométrica, relación filogenética, leprosis de cítricos, Tenuipalpidae, Acari.

Morphometric-molecular determination of an aberrant population of *Brevipalpus californicus* and its role as vector of *Citrus leprosis virus* (CiLV-C and OFV-citrus),

Juan Manuel Ávalos Cerdas, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2019

ABSTRACT

A morphometric and molecular characterization of the aberrant population of *Brevipalpus californicus* was conducted, and its capacity to acquire and inoculate citrus leprosis viruses cytoplasmic (CiLV-C) and nuclear (OFV-citrus) was determined. For the morphometric study, a photographic study the aberrant population of *B. californicus*, named *Brevipalpus* sp. (Tetipac) because of its collection site, *B. californicus* (designed as “Texcoco”, proceeding from a colony initiated by a single female collected in Texcoco, Mexico), *B. lewisi* and *B. californicus*, the last two with specimens from their respective type series. From specimens of each species, 37 morphometric characters were measured and compared by univariate and multivariate analysis (principal components). In the molecular study, specimens *Brevipalpus* sp. (Tetipac) and *B. californicus* (Texcoco) were used. Two segments of the COI gen were amplified by PCR, 339 bp (primers DNF/DNR) and 650 bp (LCOI/HCOI), as well as a segment of the 28S gen (primers D23F-D6R). With the obtained sequences, phylogenetic trees were constructed by the Neighbor-Joining test. For the acquisition tests of the viruses CiLV-C and OFV-citrus larvae, nymphs and adult females were used, 15 specimens per replicate, 10 replicates per stage; they were confined during periods of 24, 48 or 72 h on orange leaves with symptoms of cytoplasmic or nuclear leprosis. The citrus to citrus inoculation was carried out in Cárdenas, Tabasco (CiLV-C) and in Toluimán, Querétaro (OFV-citrus), both in Mexico. In this study, 25 mites (all the stadia) were confined during 48-120 h on orange leaves infected by CiLV-C or OFV-citrus and then transferred to *Arabidopsis thaliana*, *Phaseolus vulgaris* or *Citrus sinensis* var. Valencia seedlings. To diagnose these viruses, the primers MPF/MPR (CiLV-C) and CiLV-N-NPF/CiLVN-NPR (OFV-citrus) were used. The morphometric characterization showed that only 17 characters were significantly different among species, after univariate analysis. The multivariate analysis showed that *Brevipalpus* sp. (Tetipac) and *B. californicus*

(Texcoco) are not separate entities. The molecular characterization showed that *Brevipalpus* sp. (Tetipac) is a strain close to *B. californicus* sensu lato. In the acquisition tests, only two replicates were positive to CiLV-C, whereas for OFV-citrus 84 replicates were positive. In the inoculation tests, symptoms did not appear in the indicator plants *A. thaliana* and *P. vulgaris* after infestation of *Brevipalpus* sp. (Tetipac) infected with OFV-citrus. Only on *C. sinensis* at Tolimán, Querétaro, symptoms associated to OFV-citrus were observed. In no case this virus was detected by RT-PCR.

KEY WORDS: morphometric relation, phylogenetic relation, citrus leprosis, Tenuipalpidae, Acari.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de postgrado en México. Al personal administrativo y académicos del Colegio de Postgraduados en el área de Fitosanidad, por la formación en profesional realizada y la oportunidad de cumplir una meta personal.

Al Dr. Gabriel Otero Colina por su gran espíritu de enseñanza y la confianza depositada en mi persona para la cumplir con el trabajo encomendado más la oportunidad de crecer como persona en todos los campos; el conocer a un apasionado de la acarología y un profesional en el área será la más grande experiencia de mi estancia en México.

A los miembros de mi consejo particular Dr. Daniel Ochoa, Dr. Néstor Bautista y Dr. Ángel Villegas, fueron muchas la formas en que me hicieron crecer como persona y profesional en Fitosanidad, les estaré siempre agradecido por la confianza puesta en mí, gracias.

Al personal del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, ubicado en Tecámac, Edo. de México, por la facilidades para la utilización del microscopio de electrónico de barrido. Además, al Colegio de Postgraduados Campus Tabasco por las disposición para el montaje y facilidades para la utilización de sus instalaciones, con agradecimiento especial al Dr. Freddy Ortiz García y al Dr. Saúl Sánchez Soto.

A los personeros del Comité de Sanidad Vegetal de Cárdenas, Tabasco, por las colectas que me permitieron realizar durante el desarrollo de esta investigación, en especial al Ing. Isidro Izquierdo. También a José Manuel Baltazar, técnico del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria en Toluca, Querétaro, por la gran ayuda brindada en el desarrollo de las colectas y experimentos de la zona, muchas gracias José.

A mi familia, mis hermanos y en especial a mis padres, por confiar en mí en esta nueva etapa de mi vida, sé que ha sido difícil siempre se le ha extrañado. Unidos lejos o cerca

están siempre a mi lado en mi corazón y pensamientos. Mis amigos y conocidos le agradezco el apoyo, la paciencia pero más él estar ahí cuando más los necesité.

A los compañeros del laboratorio de Toxicología y Acarología del Colegio de Postgraduados del Campus Montecillo (maestra Mari, Don Memo, Don Mundo, Raúl, Fernando, Sandra, Carmen, Renata, Manuel, Marco, Cipri, Paúl, Yuri), la experiencia no habría sido la misma sin sus consejos, experiencias y sobre todo la convivencia.

La experiencia en México no sería lo misma si no los hubiera conocidos chicos (as), le estaré siempre agradecido por la oportunidad de haber creado una gran amistad con ustedes, en definitiva de mejor de este lindo país es su gente. Gracias Mari, aún me podrás seguir molestando no te preocupes yo me dejaré, no te vayas a sentir mal porque no estemos tan cerca. Gracias Pablo, serás un maestro, un consejero, un amigo, en cualquier momento estaremos siempre en contacto, pa` las que sean. Señorita, si Paty, eres tú, gracias por abrirme tu corazón y dejarme ser parte de tu vida en buenos y malos momentos, siempre estaré para ti, de una u otra forma no lo dudes, este tico ahí estará. Muchas gracias muchachos (as) siempre les estaré agradecido y formaran parte importante de mi vida, se les quiere un buen.

A todas las personas que de una u otra manera colaboraron para que este trabajo llegara a buen término y cumpliera con las expectativas esperadas.

Muchas gracias!!!!!!!!!!!!!!

DEDICATORIA

“A Dios, por darme el privilegio de cada día conocer mis fortalezas y debilidades para crecer todos los días como persona y profesional, más a esa persona que me hizo conocer lo mejor de mí, en los momentos más difíciles y deo que comprendiera lo que soy y valgo en cada momento de mi vida”

CONTENIDO

RESUMEN	iv
ABSTRACT	vi
AGRADECIMIENTOS	viii
DEDICATORIA	x
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE CUADROS	xv
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	5
HIPÓTESIS	5
MATERIALES Y MÉTODOS	6
A. OBTENCIÓN Y MULTIPLICACIÓN DE <i>Brevipalpus</i> sp. (Tetipac).	6
B. CARACTERIZACIÓN MORFOMÉTRICA	8
C. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR	10
1. Extracción de ADN	10
2. Amplificación mediante PCR.....	10
3. Análisis filogenético	12
D. PRUEBAS DE TRANSMISIÓN DE CILV-C Y OFV-citrus	12
1. Prueba de adquisición.....	13
2. Pruebas de inoculación	15
RESULTADOS	17
A. Obtención y multiplicación de <i>Brevipalpus</i> sp. (Tetipac).	17
B. Caracterización morfométrica	17
C. Caracterización molecular	28
D. Pruebas de transmisión de CILV-C y OFV-citrus	34
E. Pruebas de inoculación de CILV-C y OFV-citrus	36
DISCUSIÓN	41
CONCLUSIONES	47
LITERATURA CITADA	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Naranjas agrias en la etapa de desarrollo fisiológico que resultó apropiado para el establecimiento de colonias de <i>Brevipalpus</i> sp. (Tetipac).....	6
Figura 2.	Naranjas agrias habilitadas como arenas de cría utilizadas para el establecimiento de colonias uni-parentales de <i>Brevipalpus</i> sp. (Tetipac).....	7
Figura 3.	Arenas empleadas para las pruebas de adquisición de CiLV-C y OFV-citrus por los ácaros.....	14
Figura 4.	Desarrollo de la colonia de <i>Brevipalpus</i> sp. (Tetipac) luego de un año y seis meses sobre las arenas de cría de naranja agria.....	17
Figura 5.	Solenidios en patas II: A) <i>Brevipalpus</i> sp. (Tetipac); B) <i>B. californicus</i> (Texcoco); C) <i>B. californicus</i> (tipo); D) <i>B. lewisi</i> (tipo). A-B fotografías de microscopia electrónica (SEM-CNRF), C-D fotografías de microscopia DIC.....	19
Figura 6.	Panorámicas de las ornamentaciones presentes en el cuerpo de los ácaros (vista dorsal): A) <i>Brevipalpus</i> sp. Tetipac); B) <i>B. californicus</i> (Texcoco); C) <i>B. californicus</i> (tipo); D) <i>B. lewisi</i> (tipo). A-B fotografías de microscopia electrónica (SEM-CNRF), C-D fotografías de microscopia DIC.....	20
Figura 7.	A-D: fotomicrografías DIC de espermateca. A: <i>Brevipalpus</i> sp. (Tetipac); B: <i>B. californicus</i> (Texcoco); C: <i>B. californicus</i> (tipo); D: <i>B. lewisi</i> (tipo). E-F: fotomicrografías SEM de microplacas. E: <i>Brevipalpus</i> sp. (Tetipac); F: <i>B. californicus</i> (Texcoco).....	21
Figura 8.	Componentes principales 1 y 2 análisis obtenido con 37 variables morfológicas para las hembras adultas de los cuatro grupos de especies de <i>Brevipalpus</i> . Porcentaje de la variación explicada entre paréntesis. Cada número corresponde a un individuo específico, n=60.....	25
Figura 9.	Criterios para la determinación del número de conglomerados. Lo anterior a partir de las 37 variables morfométricas para hembras adultas de los cuatro grupos de especies de <i>Brevipalpus</i> . La línea vertical indica el número de conglomerados que representan al conjunto de datos del análisis de componentes principales.....	26
Figura 10.	Grupos de especies (conglomerados) obtenidos a partir de las 37 variables morfológicas para hembras adultas de <i>Brevipalpus</i> según el análisis multivariado. BrevMx= <i>Brevipalpus</i> sp. (Tetipac); BcalifM= <i>B. californicus</i> (Texcoco); Bcalif_ <i>=B. californicus</i> (tipo); Blewis= <i>B. lewisi</i> (tipo). La línea vertical representa 85.78% (0.8578) de la variación de los componentes principales, expresada en valor de r^2	27
Figura 11.	Árbol filogenético realizado a partir del fragmento COI mitocondrial de 339 pb amplificado con los iniciadores DNF-DNR de las especies de <i>Brevipalpus</i> , secuencias recuperadas del GenBank. Valores de bootstrap superiores a 80, en cada rama. Rectángulos de color rojo señalan las secuencias obtenidas en este estudio.....	30
Figura 12.	Árbol filogenético realizado a partir del fragmento COI mitocondrial de 650 pb amplificado con los iniciadores LCOI-HCOI de las especies de <i>Brevipalpus</i> , secuencias proporcionadas por Tassi (2018) (datos sin	

- publicar). Valores de bootstrap superiores a 60, en cada rama. Rectángulos de color azul señalan las secuencias obtenidas en este estudio. 32
- Figura 13. Árbol filogenético realizado a partir del fragmento D1-D3 del gen 28S de 900 pb amplificado con los iniciadores D23F-D6R de las especies de *Brevipalpus*, secuencias proporcionadas por Tassi (2018) (datos sin publicar). Valores de bootstrap superiores a 50, en cada rama. Rectángulos de color lila señalan las secuencias obtenidas en este estudio. 33
- Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, para la detección de CiLV-C usando los iniciadores MPF/MPR (339 pb); MM, marcador de peso molecular 1 kb; carriles 1, larvas 24 h (éste y los demás representan el tiempo del que dispusieron los ácaros para adquirir el virus); 2, ninfas 24 h; 3, hembras adultas 24 h; 4, larvas 48 h.; 5, ninfas 48 h; 6, hembras adultas 48 h; 7-9, larvas 24 h; 10-11, hembras adultas 24 h; 12, ácaros libres de virus; 13-14, positivo *B. yothersi* virulíferos; 15, blanco agua. MM (Gen ruler 100bp Plus Lader, Thermo Scientific). 35
- Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, para la detección de OFV-citrus usando los iniciadores CiLV-N-NPF/CiLV-N-NPR (681 pb.); MM, marcador de peso molecular 1 kb; carriles 1-3, larvas 24 h (éste y los demás representan el tiempo del que dispusieron los ácaros para adquirir el virus); 4-6, ninfas 24 h.; 7-9, hembras adultas 24h; 10-12, larvas 48h; 13-15, ninfas 48 h; 16-17, hembras adultas 48 h.; 18-20, larvas 72 h; 21-23, ninfas 72 h; 24, hembras adultas 72 h.; 25, positivo (OFV-citrus); 26, ácaros libres de virus; 27, blanco agua. MM (Gen ruler 100bp Plus Lader, Thermo Scientific). 36
- Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, para la detección de OFV-citrus usando los iniciadores CiLV-N-NPF/CiLV-N-NPR (681 pb.); MM, marcador de peso molecular 1 kb; tejido vegetal de *Phaseolus vulgaris*; carriles 1-3, hembras adultas 48 h (éste y los demás representan el tiempo del que dispusieron los ácaros para adquirir el virus); 4-6, ninfas 48 h.; 7, positivo (OFV-citrus); 8, testigo sin ácaros; 9, blanco agua. MM (Gen ruler 100bp Plus Lader, Thermo Scientific). 37
- Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, para la detección de OFV-citrus usando los iniciadores CiLV-N-NPF/CiLV-N-NPR (681 pb.); MM, marcador de peso molecular 1 kb; tejido vegetal de *Arabidopsis thaliana*; carriles 1-5, hembras adultas 48 h (éste y los demás representan el tiempo del que dispusieron los ácaros para adquirir el virus); 6-9, ninfas 48 h.; 10, positivo (OFV-citrus); 11, testigo sin ácaros; 12, blanco agua. MM (Gen ruler 100bp Plus Lader, Thermo Scientific). 37
- Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, para la detección de CiLV-C en *Brevipalpus* sp. (Tetipac) usando los iniciadores MPF/MPR (339 pb); MM, marcador de peso molecular 1 kb; carril 1, larvas R1; 2, larvas R2; 3, larvas R3; 4, larvas R4; 5, ninfas R1; 6, ninfas R2; 7, ninfas R3; 8, ninfas R4; 9, hembras adultas R1; 10, hembras adultas R2; 11, hembras adultas R3; 12, hembras adultas R4; 13, ácaros libres de virus; 14, blanco agua. MM (Gen ruler 100bp Plus Lader, Thermo Scientific). 39
- Figura 19. Hojas con síntomas típicos de leprosis tipo nuclear (OFV-citrus) para plantas inoculadas con ninfas en *Brevipalpus* sp. (Tetipac) alimentadas

	durante cinco días en hojas con OFV-citrus. DDI= días después de inoculación.....	39
Figura 20.	Hojas con síntomas típicos de leprosis tipo nuclear (OFV-citrus) para plantas inoculadas con larvas en <i>Brevipalpus</i> sp. (Tetipac) alimentadas durante cinco días en hojas con OFV-citrus. DDI= días después de inoculación.....	40
Figura 21.	Electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, para la detección de OFV-citrus usando los iniciadores CiLV-N-NPF/CiLV-N-NPR (681 pb.); MM, marcador de peso molecular 1 kb; carriles 1, larvas R1; 2, larvas R2; 3, larvas R3; 4, ninfas R1; 5, ninfas R2; 6, ninfas R3; 7, hembras adultas R1; 8, hembras adultas R2; 9, hembras adultas R3; 10, ácaros libres de virus; 11, testigo absoluto; 12, negativo; 13, positivo de OFV-citrus; 14, blanco agua. MM (Gen ruler 100bp Plus Lader, Thermo Scientific).....	40

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Iniciadores específicos utilizados para la PCR y secuenciación de los segmentos específicos de ADN de los dos grupos de ácaros.....	11
Cuadro 2. Programas de amplificación para cada uno de los pares de iniciadores utilizados.....	11
Cuadro 3. Medias (\pm error estándar, EE), mínimos y máximos valores (μ m) observados en 36 características analizadas por medio de ANOVA para las hembras adultas de cuatro grupos de individuos de <i>Brevipalpus</i> (*).	23
Cuadro 4. Identificación de las secuencias utilizadas para la filogenia de <i>Brevipalpus</i> a partir del fragmento COI (iniciadores DNF-DNR).....	29
Cuadro 5. Identificación de las secuencias utilizadas para la filogenia de <i>Brevipalpus</i> a partir del fragmento COI (iniciadores LCOI-HCOI).....	30
Cuadro 6. Identificación de las secuencias utilizadas para la filogenia de <i>Brevipalpus</i> a partir del fragmento D1-D3 gen 28S (iniciadores D23F-D6R).	32
Cuadro 7. Adquisición de CiLV-C y OFV-citrus por diferentes estados de desarrollo de <i>Brevipalpus</i> sp. (Tetipac).	35

INTRODUCCIÓN

Los ácaros de la familia Tenuipalpidae (Acari: Trombidiformes: Tetranychoidae) son comúnmente llamados ácaros planos o falsas arañas rojas. Todos los ácaros de esta familia son fitófagos obligados y son capaces de causar daños directos al alimentarse de las células del mesófilo de las plantas huéspedes (Mesa *et al.*, 2009). Los tenuipálpidos se distinguen de los de otras familias de la superfamilia Tetranychoidae por poseer palpos simples (sin una proyección en forma de uña en la tibia) con uno o varios artejos, al igual que tres pares de setas dorsales en el propodosoma (Ochoa *et al.*, 1991).

Esta familia se compone de 34 géneros (Krantz y Walter, 2009), cinco de los cuales provocan mayor daño a los cultivos de interés agrícola: *Brevipalpus*, *Raoiella*, *Cenopalpus*, *Tenuipalpus* y *Dolichotetranychus* (Childers y Rodrigues, 2011). Las especies *Raoiella indica* Hirst, *Brevipalpus californicus* Banks, *B. chilensis* Banks, *B. lewisi* McGregor, *B. obovatus* Donnadieu y *B. phoenicis* (Geijskes) ocasionan pérdidas económicas de mayor impacto en la agricultura (Mesa *et al.*, 2009; NAPPO, 2014).

Los ácaros del género *Brevipalpus* tienen especial importancia por ser polífagos, estar distribuidos en todo el mundo y presentar alta capacidad para transmitir virus, de donde nace la expresión de virus transmitidos por *Brevipalpus* (VTBr o BTV, siglas en inglés) (Navia *et al.*, 2013). Dentro de los principales y más importantes VTBr se encuentran los causantes de la leprosis de los cítricos, los cuales se dividen en los tipos citoplasmáticos: *Citrus leprosis virus*-Cytoplasmic 1 y 2 (CiLV-C 1 y 2), del género *Cilevirus*, y nucleares: *Citrus leprosis virus*-Nuclear y *Orchid fleck virus*-citrus (CiLV-N y OFV-citrus, respectivamente), del género *Dichorhavirus* (Ramos-González *et al.*, 2017).

El declive de los cítricos, principalmente naranja dulce, es provocado en mayor parte por CiLV-C, dado que es el que se ha diseminado desde Sudamérica hasta México (Rodrigues y Childers, 2013). Sin embargo, Hartung *et al.* (2015) demostraron que el virus que causó severos daños en Florida (EE.UU.) en los siglos XIX y XX es una variante de tipo nuclear.

La leprosis de los cítricos se encontró por primera vez en México en el estado de Chiapas, en 2004, y desde su primer hallazgo se inició una campaña que ha contenido su diseminación (Childers y Rodrigues, 2011; Rodrigues y Childers, 2013). Recientemente se ha determinado la presencia de los tipos citoplasmático y nuclear en la parte sur y centro de México (Izquierdo *et al.*, 2011; Roy *et al.*, 2015a). Según SENASICA (2016), la leprosis se encuentra presente en los estados de Chiapas, Campeche, Hidalgo, Guerrero, Jalisco, Nayarit, Oaxaca, Morelos, Quintana Roo, Querétaro, Puebla, San Luis Potosí, Sinaloa, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz y Zacatecas.

Se ha comprobado la capacidad de *B. californicus* para transmitir OFV-citrus, así como la de *B. yothersi* para transmitir CiLV-C (García-Escamilla *et al.*, 2017). En México, la distribución de estos virus es alopatrica y se asocia con diferentes niveles altitudinales; el CiLV-C se puede encontrar entre 10 y 885 m de altitud, mientras que el OFV-citrus se puede encontrar de 1239 a 1710 m (Duran-Trujillo, 2017). De igual forma se puede asociar la distribución de estos virus con el clima; CiLV-C en zonas cálidas (Izquierdo-Castillo *et al.*, 2011) y OFV-citrus hacia zonas templadas (Domínguez *et al.*, 2001; Bastianel *et al.*, 2010).

El uso de plantas indicadoras para el estudio de leprosis de los cítricos se ha realizado con la finalidad de reducir el tiempo de aparición de síntomas; por ejemplo, se corroboró la capacidad de *B. yothersi* para transmitir CiLV-C en plantas de *Phaseolus vulgaris*, al generar lesiones necróticas en cinco días (Garita *et al.*, 2014; Tassi *et al.*, 2017). Kondo *et al.* (2003) mostraron también la capacidad que posee *B. californicus* infectado con OFV para generar lesiones locales amarillas en *P. vulgaris*. Por otro lado, *Arabidopsis thaliana* puede presentar síntomas de CiLV-C tres veces más rápido que plantas de *Citrus sinensis* (Arena *et al.*, 2016); *A. thaliana*, luego ocho a diez días de ser inoculada con *B. phoenicis* sensu stricto infectados con CiLV-N, desarrolló lesiones cloróticas (Ramos-González *et al.*, 2017). *A. thaliana* es una especie ampliamente utilizada en estudios de la interacción planta-patógeno (Nishimura y Dangl, 2010).

García-Escamilla *et al.* (2017) concluyeron que la asociación de los diferentes virus causantes de leprosis con un ácaro vector es específica, por lo cual la correcta identificación de los ácaros es fundamental. Welbourn *et al.* (2003), Mesa *et al.* (2009) y Navia *et al.* (2013) observaron variaciones intraespecíficas dentro del género *Brevipalpus*; ese hecho, así como el pequeño tamaño de estos ácaros, ha llevado a identificaciones erróneas y a que muchas supuestas especies en realidad sean sinónimos. Estos errores de identificación han persistido durante muchos años.

Por la variación intraespecífica y la existencia de complejos, muchas especies del género *Brevipalpus* se hacen indistinguibles cuando se aplican los criterios morfológicos tradicionales para identificarlos (Navia *et al.*, 2013). Estos criterios de morfológicos tan variables deben ser cotejados con técnicas moleculares para detectar las especies crípticas dentro de grupos (Bickford *et al.*, 2007). Con un análisis cuidadoso de características morfológicas y uso de microscopio electrónico de barrido, Beard *et al.* (2015) demostraron que el complejo de especies del grupo *B. phoenicis* en realidad está formado por ocho especies. Por otra parte, Navia *et al.* (2013), con bases morfológicas y moleculares, describieron a *Brevipalpus incognitus* Ferragut & Navia y la definieron como especie críptica, no reconocible si sólo se identificaba con base en su morfología.

Brevipalpus lewisi McGregor es un ácaro fitófago que suele encontrarse en zonas áridas (Hao *et al.*, 2016; Saccaggi *et al.*, 2017). Se ha reportado como una plaga importante en Arizona y California (EE.UU.), afecta de manera directa frutos de limón y causa pérdidas considerables a los productores (Childers y Rodrigues, 2011; Childers *et al.*, 2013; Kerns *et al.*, 2011).

Según Ochoa *et al.* (2016a), por el momento no hay registros de la presencia de *B. lewisi* en cítricos en México, pero sí en China (Hao *et al.*, 2016), Sudáfrica (Saccaggi *et al.*, 2017) y los Estados Unidos de América (Mesa *et al.*, 2009; Childers *et al.*, 2013). A la fecha no se han reportado casos de leprosis de los transmitida por este ácaro (Ochoa *et al.*, 2016a); sin embargo, la variación morfológica interespecífica en *Brevipalpus* es tan amplia (Rodríguez y Childers, 2013; Ochoa *et al.*, 2016a; Ochoa *et al.*, 2016b), que se pueden presentar

diferencias morfológicas aún sin descubrir, y se requieren estudios nuevos para corroborar la existencia de esta especie y su posible asociación con los virus causantes de leprosis.

En recorridos de campo llevados a cabo por el autor de este trabajo en el municipio de Tetipac, Guerrero (18°37'32.81"N; 99°41'56.79"O), se colectaron ejemplares de ácaros del género *Brevipalpus* que se identificaron tentativamente como *B. lewisi*, con base en sus características diagnósticas presentadas por Baker (1949) y Baker y Tuttle (1987); básicamente, por la presencia de un solenidio en cada una de las patas del segundo par y la presencia de las sedas f2, aunque las ornamentaciones de la cutícula semejaban más las de *B. californicus*. Con estos ejemplares se fundó una colonia en frutos de naranja agria y se les designó como *Brevipalpus* sp. (Tetipac). Partiendo del supuesto de que se trataba de *B. lewisi* o una especie cercana, se llevó a cabo el presente trabajo, con el objetivo inicial de corroborar su identidad específica, y segundo, probar su capacidad como vector de CiLV-C y OFV-citrus.

OBJETIVOS

- I. Determinar de forma morfométrica y molecular la identidad de *Brevipalpus* sp. (Tetipac).
- II. Analizar el proceso de transmisión de CiLV-C y OFV-citrus por *Brevipalpus* sp. (Tetipac) en plantas indicadoras y *Citrus sinensis* var. Valencia.

HIPÓTESIS

- *Brevipalpus* sp. (Tetipac) es morfométrica y molecularmente igual a otras especies de grupo *californicus*.
- El ácaro *Brevipalpus* sp. (Tetipac) puede adquirir e inocular CiLV-C u OFV-citrus.

MATERIALES Y MÉTODOS

A. OBTENCIÓN Y MULTIPLICACIÓN DE *Brevipalpus* sp. (Tetipac).

Se muestrearon plantas de naranja dulce y limón mexicano (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle) ubicados en Muyuapan, municipio de Tetipac, estado de Guerrero, México (18°37'32.81"N; 99°41'56.79"O), considerados como zonas libres de leprosis de los cítricos. Las muestras consistieron en frutos, hojas y ramas tomados de los cuatro puntos cardinales de cada árbol, los cuales se transportaron al Laboratorio de Acarología, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados, para su revisión e identificación microscopio estereoscópico (Carl Zeiss 475022). Con base en las características visibles (Baker y Tuttle, 1987), los ácaros se identificaron como cercanos a *B. lewisi* y se designaron *Brevipalpus* sp. (Tetipac).

Una vez que se obtuvieron los ácaros, se establecieron colonias uni-parentales o isolíneas (formadas a partir de una sola hembra) con el método descrito por Franco *et al.* (2007) con modificaciones; se tomaron naranjas agrias (*Citrus aurantium* L.) con edad intermedia de cosecha (entre colores verde y amarillo de la fruta) (Figura 1), se sumergieron en solución detergente al 5% (Axion Espuma Activa®) por 1 h, se frotaron con esponja, se enjuagaron en agua de la llave y se dejaron secar 24 h.



Figura 1. Naranjas agrias en la etapa de desarrollo fisiológico que resultó apropiado para el establecimiento de colonias de *Brevipalpus* sp. (Tetipac).

Una vez secas, las naranjas fueron revisadas en microscopio estereoscópico para corroborar que estaban libres de ácaros u otros organismos, a los que se definió como contaminantes. Transcurrido este tiempo, cada una de las naranjas se sumergió $\frac{3}{4}$ partes en parafina derretida a temperatura de 69°C a 75°C y se dejaron enfriar para la formación de una capa en su superficie. Posteriormente, se preparó mezcla de harina de trigo, arena y yeso (1:1:1) y agua hasta que se formó pasta espesa, la cual se aplicó con pincel sobre la parte no cubierta con parafina para formar un círculo de 2 cm de diámetro. Al secarse, la pasta forma una costra que los ácaros utilizan como sustrato para su establecimiento (García-Escamilla *et al.*, 2017) (Figura 2).

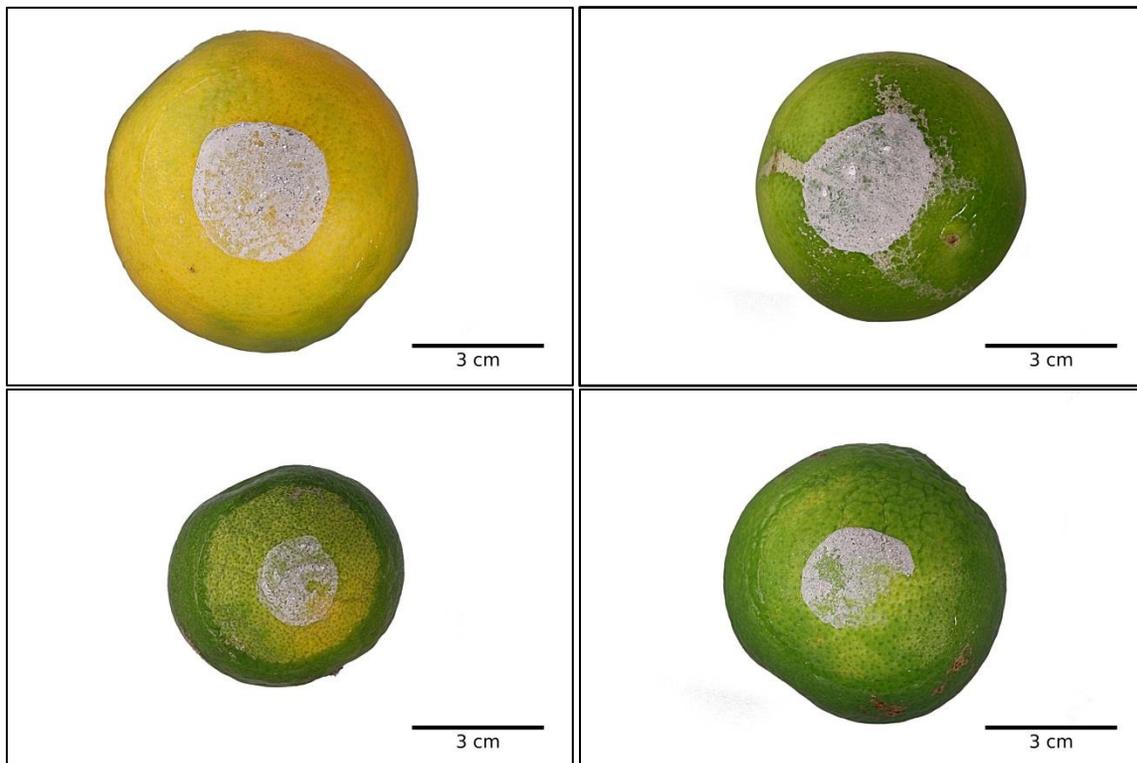


Figura 2. Naranjas agrias habilitadas como arenas de cría utilizadas para el establecimiento de colonias uni-parentales de *Brevipalpus* sp. (Tetipac).

Finalmente, en cada naranja, justo al borde de la parafina, se trazó una línea de pegamento para plagas agrícolas STICK-BUG 50 (Alterna Agro, México), para evitar que las hembras se escapen y sólo queden confinadas a una zona. En cada naranja se colocó una hembra

adulta para que ovipositará; cuando había puesto al menos un huevo, se extrajo para su montaje con el fin de corroborar su identidad.

Las colonias se mantuvieron a 24-27°C y 40-50% de humedad relativa, con iluminación led de 14.76 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ y fotoperiodo 12:12 h. Semanalmente se revisaron cada una de las naranjas, para observar el desarrollo y estado de la población de ácaros; asimismo, los frutos se reemplazaban cuando se empezaban a marchitar para evitar deterioro de las colonias y tener suficientes ácaros para la realización de las pruebas de transmisión. Las naranjas de remplazo fueron obtenidas del Campus Montecillo del Colegio de Postgraduados y lugares aledaños al municipio de Texcoco, Estado de México, considerada como zona libre de leprosis (SENASICA, 2013; SENASICA, 2016).

B. CARACTERIZACIÓN MORFOMÉTRICA

Se realizó con dos poblaciones de ácaros, una identificada con criterios morfológicos como *B. californicus*; la otra, identificada como *Brevipalpus* sp. (Tetipac). Cada población fue obtenida a partir de una colonia uni-parental o aislada, la primera del municipio de Texcoco, Estado de México (19°27'46.42"N; 98°54'14.75"O) y la segunda de Tetipac, Guerrero (18°37'32.81"N; 99°41'56.79"O), México.

Ácaros procedentes de las colonias uni-parentales se recolectaron y almacenaron en frascos tubulares con etanol 70%. Veinte ejemplares representativos de las dos poblaciones se colocaron en una solución de KOH al 10% (para aclaración de los ejemplares) por 1 min, luego se pasaron por agua destilada (para eliminar restos de KOH) y posteriormente se montaron entre porta y cubreobjetos con solución de Hoyer (Krantz y Walter, 2009). Las láminas se colocaron en estufa (Felisa mod.132) a 40°C por siete días y finalmente se observaron en un microscopio de contraste de fases (Carl Zeiss GmbH Primo Star mod. 314800509) y contraste diferencial de interferencia (o las siglas DIC, en inglés differential interference contrast) (fotomicroscopio 3, Carl Zeiss). Se compararon las características observadas con la descripción original (Baker, 1949) y redescripciones de *B. lewisi* (Baker y Tuttle, 1987; Flat mites of the world, <http://idtools.org/id/mites/flatmites/>).

Además de la identificación por microscopia de contraste de fases y DIC, se procesaron ácaros para microscopia electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés: scanning electron microscope). Individuos de *Brevipalpus* sp. (Tetipac) y *B. californicus* de las colonias uni-parentales se fijaron y deshidrataron pasándolos por distintas diluciones de alcohol etílico (de 60% hasta 100%, 1 h cada cambio); en el primer cambio de alcohol se sometieron a limpieza con ultrasonido (Bransonic Ultrasonic Cleaner modelo 2510R-DTH, 50-60 Hz) durante 15 seg. Una vez concluido este paso, los ácaros se llevaron a secadora de punto crítico (Samdri-780^a marca Tousimis, EE.UU) mediante la incorporación de CO₂; finalmente fueron recubiertos con oro (Fine Coat ion sputter JFC-1100 marca Jeol, Japón) para observación con él SEM.

Se tomaron 37 mediciones en cada uno de los ejemplares (Cuadro 3) y se usó la terminología de la quetotaxia de los ácaros propuesta por Beard *et al.* (2015) y Tassi (2018). Cada medida se hizo a partir de fotomicrografías con microscopio óptico contraste de fases (Carl Zeiss GmbH Primo Star mod. 314800509) y microscopio óptico DIC (Carl Zeiss fotomicroscopio 3), a magnificaciones de 640 a 1000X. Las mediciones se presentan en micrómetros (μm) y van seguidas de los valores mínimo y máximo entre paréntesis. El factor de redondez tiene el intervalo de 0 (totalmente alejado de la redondez) a 1 (redondez perfecta); de cada individuo se estimó la media aritmética. Las láminas utilizadas para este estudio se encuentran en la colección de laboratorio de Acarología, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México, México.

Adicionalmente, se tomaron las mismas medidas de 16 ejemplares de la serie tipo de *B. lewisi* y cinco ejemplares de la serie tipo de *B. californicus*, a partir de fotomicrografías de ejemplares de la colección del Systematic Entomology Laboratory, Beltsville Agricultural Research Center, USDA, EE.UU. Estas fotomicrografías se tomaron mediante la técnica DIC con microscopio Carl Zeiss Axioplan 2 y se utilizaron como comparación de las características de las poblaciones de México. Dentro de estas características también se tomó como referencia la comparación entre las espermatecas y microplacas (*Brevipalpus* sp. (Tetipac) y *B. californicus* procedente de Texcoco. Todas las imágenes obtenidas fueron editadas con él programa GIMP 2.8.22.

La longitud de las sedas individuales se midió desde la base hasta parte apical, mientras que la distancia entre sedas fue desde la base de ambas sedas. Para estimar el grado de redondez solamente se consideraron las ornamentaciones del dorso del propodosoma, de las celdas que se encontraban con un borde definido en las fotografías. Cada variable fue medida con el software ImageJ 1.52^a, basada en la escala obtenida de cada una de las fotografías incluidas en este estudio.

Los valores de cada variable se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y comparación múltiple de Tukey ($\alpha=0.05$); los grupos a comparar fueron los ejemplares de *B. californicus* procedentes de la colonia establecida, los cuales en lo sucesivo se designarán como *B. californicus* (Texcoco), los ejemplares de *B. californicus* de la serie tipo [en lo sucesivo *B. californicus* (tipo)], los ejemplares identificados como *Brevipalpus* sp. (Tetipac) y los ejemplares de *B. lewisi* de la serie tipo [en lo sucesivo *B. lewisi* (tipo)]. Se verificaron los supuestos de normalidad (Prueba de Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianzas (prueba de Bartlett). Para el análisis conjunto de todas las variables se utilizó análisis multivariado, donde se realizó, (1) análisis de los componentes principales (ACP) y (2) análisis de conglomerados (CLUSTER). Todos los análisis se realizaron con el software estadístico SAS versión 9.4.

C. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

1. Extracción de ADN

Se extrajo ADN total de grupos de 10 ácaros *B. californicus* (Texcoco) y *Brevipalpus* sp. (Tetipac), procedentes de las colonias uni-parentales con el kit QIAamp DNA Micro kit (Cat. No. 56304), según el protocolo del fabricante con modificaciones (Klimov & OConnor, 2008).

2. Amplificación mediante PCR

Se realizó con GoTag® G2 Green Master Mix de Promega (Cat. No. M7822) con iniciadores que amplifican los segmentos D1-D3 (gen 28S) y COI (región mitocondrial) (Cuadro 1). La mezcla de reacción consistió en 12.5 µL de 2X Go Tag® G2 Green Master Mix, 2.5 µL iniciador sentido (10 µM), 2.5 µL iniciador antisentido (10 µM) y 2.5 µL MG agua. El volumen de la mezcla fue de 20 µL, a la cual se le adicionaron 5 µL de ADN molde (volumen final de 25 µL). La reacción de amplificación se realizó en termociclador Thermo Scientific Type 5020 (modelo ITCA0096) con los programas indicados en el Cuadro 2.

Cuadro 1. Iniciadores específicos utilizados para la PCR y secuenciación de los segmentos específicos de ADN de los dos grupos de ácaros.

Región de ADN	Iniciadores (5´-3´)		Referencia
D1-D3 (28S)	D23F	GAGAGTTCAAGAGTACGTG	Park y Foighil (2000)
	D6R	CCAGCTATCCTGAGGGAAACTTGG	
COI (mitocondrial)	DNF	TACAGCTCCTATAGATAAAAC	Navajas <i>et al.</i> (1996)
	DNR	TGATTTTTTGGTCACCCAGAAG	
COI (mitocondrial)	LCOI1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	Folmer <i>et al.</i> (1994)
	HCOI2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	

Cuadro 2. Programas de amplificación para cada uno de los pares de iniciadores utilizados.

D23F- D6R	95°C/3min	35 ciclos					10°C ∞
		95°C/45s	50°C/1min 30s	72°C/1min 10s	72°C/10 min		
LCOI- HCOI	95°C/3min	40 ciclos					10°C ∞
		95°C/45s	53°C/30s	72°C/1min 10s	72°C/10 min		
DNF- DNR	95°C/4min	35 ciclos					4°C ∞
		92°C/ 1min	50°C/1min	72°C/1min	72°C/10 min		

Los productos de la amplificación se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio con un marcador de peso molecular de 1 kb a 90 volts por 60 min en cámara de electroforesis Thermo Scientific (modelo 7309 B1) y se visualizaron en un fotodocumentador Quantum Vilber Lourmart (serial N°13 200819) bajo luz UV.

El producto de PCR se purificó y secuenció por la empresa Macrogen Inc, Korea. Las secuencias obtenidas se editaron en el programa BioEdit (7.2.5 versión [www.mbio.ncsu.edu/bioedit /bioedit.html](http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html)) y se compararon con aquellas de *Brevipalpus* disponibles en la base de datos del Centro para la Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information, NCBI).

3. Análisis filogenético

Las secuencias fueron analizadas y editadas con el programa Bioedit Sequence Alignment Editor 7.2.5. El alineamiento de las secuencias consenso se realizó con MUSCLE, en el software MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2007). Las secuencias de los dos grupos de ácaros fueron editadas y comparadas con otras presentes en el GenBank (Oliveira *et al.*, 2014) y las facilitadas por la Dra. Aline Daniele Tassi, Universidad de São Pablo, Brasil (datos sin publicar).

Se generaron tres árboles filogenéticos, dos para los fragmentos COI amplificados con los iniciadores DNF-DNR (Navaja *et al.*, 1998) y LCOI-HCOI (Folmer *et al.*, 1994), y uno para el fragmento 28S (D1-D2) amplificado con los iniciadores D23F-D6R (Park y Foighil, 2000). Para realizar los árboles se utilizaron como referencia grupos cercanos como *Cenopalpus* y *Raoiella*. Para la selección del mejor modelo de sustitución de nucleótidos para la construcción de árboles se utilizó el programa jModelTest 2.1.10 (Darriba *et al.*, 2012), la construcción fue realizada en el programa MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013), por el método Neighbor-Joining con 5000 repeticiones.

D. PRUEBAS DE TRANSMISIÓN DE CiLV-C Y OFV-citrus

Una vez establecidas las colonias uni-parentales de *Brevipalpus* sp. (Tetipac), se confirmó que estuvieran libres de CiLV-C y OFV-citrus. Para ello se extrajo ARN total de un grupo de 20 individuos de la colonia con CTAB (Locali *et al.*, 2003). Posteriormente se realizó RT-PCR utilizando el kit RNeasy Plant Mini Kit Qiagen OneStep RT-PCR (Cat. No. 210212) (García-Escamilla *et al.*, 2017) con los iniciadores MPF/MPR (Locali *et al.*, 2003) y CiLV-N-NPF/CiLVN-NPR (Roy *et al.*, 2015b), para CiLV-C y OFV-citrus, respectivamente.

1. Prueba de adquisición

Se realizaron en el Campus Montecillo del Colegio de Postgraduados (19°27'46" N, 98°54'15" W), con 2243 m de altitud. Se utilizaron ejemplares de *Brevipalpus* sp. (Tetipac) libres de virus procedentes de las colonias uni-parentales. Asimismo, se colectaron hojas de naranja dulce con síntomas de leprosis de tipo citoplasmático en Huimanguillo, Tabasco, y hojas de naranja agria con síntomas de leprosis de tipo nuclear, en Tolimán, Querétaro. Estos sitios son áreas de prevalencia de CiLV-C y OFV-citrus, respectivamente (SENASICA, 2013).

La presencia de CiLV-C en las hojas colectadas en Tabasco, así como de OFV-citrus en las colectadas en Querétaro, se confirmó mediante RT-PCR usando los iniciadores MPF/MPR (Locali *et al.*, 2003) y CiLV-N-NPF/CiLVN-NPR (Roy *et al.*, 2015b), respectivamente, mediante el kit RNeasy Plant Mini Kit Qiagen OneStep RT-PCR (Cat. No. 210212), con ligeras modificaciones realizadas por el Dr. Gang Wei, del National Plant Germoplasm and Biotechnology Laboratory, del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (Beltsville, EE.UU), documentos WI-B-T-1-31 y WI-B-T-1-36, respectivamente (material no publicado).

Para las pruebas de adquisición se confeccionaron arenas de observación con contenedores plásticos de domo de 12x13x8 cm, en los cuales se colocó algodón de forma que cubriera el fondo; luego se agregaron a cada contenedor 100 ml de agua destilada para saturar el algodón. Una vez listas las arenas, se tomaron hojas positivas a CiLV-C u OFV-citrus (previamente revisadas y libres de ácaros y otros artrópodos), y se les colocó una línea de

pegamento STICK-BUG 50 en el borde del envés, luego de lo cual se les introdujo en las arenas, con el envés hacia arriba (Figura 3).



Figura 3. Arenas empleadas para las pruebas de adquisición de CiLV-C y OFV-citrus por los ácaros.

En las hojas se colocaron grupos de 15 ácaros en estados de desarrollo de larvas, ninfas (protoninfas más deutoninfas, en proporciones no definidas) y hembras adultas, con 10 repeticiones de cada estadio. Los ácaros de cada grupo se alimentaron en periodos de 24, 48 o 72 horas, después de las cuales se retiraron los individuos que se encontraban vivos y se colocaron dentro de tubos Eppendorf de 1.5 ml para su almacenamiento a -80°C . Se utilizaron adultos de *B. californicus* y *B. yothersi* como testigos positivos procedentes de las colonias libres de virus, que se alimentaron de hojas infectadas con OFV-citrus o CiLV-C, respectivamente. Asimismo, las hojas de cada repetición se colectaron, etiquetaron y almacenaron a -80°C . Los ácaros y el tejido foliar se analizaron mediante RT-PCR como se mencionó anteriormente.

2. Pruebas de inoculación

Se colectaron ejemplares de las líneas uni-parentales y se corroboró que se encontraban libres de CiLV-C y OFV-citrus por RT-PCR. Se colocaron 10 ninfas y 10 hembras adultas sobre hojas con síntomas de leprosis y positivas a OFV-citrus durante 48 h para la adquisición el virus (procedimiento antes mencionado). Esta prueba se repitió 20 veces.

Una vez transcurridas las 48 h, los ácaros se pasaron a plantas de *A. thaliana* o *P. vulgaris*, usadas como indicadoras por Ramos-González *et al.* (2017) y Kondo *et al.* (2003). Cada tercer día se observaron las plantas para registrar los síntomas durante 22 días. Al término de este tiempo las plantas fueron analizadas por RT-PCR (Locali *et al.*, 2003). El producto de PCR fue enviado para secuenciación a MacroGen Inc., Corea.

Además de las plantas indicadoras, el procedimiento recién descrito se realizó en plantas de *Citrus sinensis* var. Valencia de aproximadamente cinco meses, libres de CiLV-C y OFV-citrus, lo que se confirmó mediante RT-PCR. Se tuvieron ocho repeticiones para cada uno de los estados del ácaro (larva, ninfa y hembra adulta), ocho repeticiones con *B. yothersi* (alimentados durante cinco días de hojas de naranja dulce positivas a CiLV-C) o *B. californicus* (alimentados durante cinco días de hojas de naranja agria positivas a OFV-citrus), ocho repeticiones con ácaros libres de virus de la colonias uni-parentales, más ocho repeticiones de un testigo absoluto en el que no se transfirió ningún ácaro. Los ácaros de todos los tratamientos se transfirieron a plantas sanas de naranja donde permanecieron por cinco meses. En este período se realizó registro fotográfico de la aparición de síntomas cada 25 días.

El primer experimento se llevó a cabo en el Campus Tabasco, Colegio de Postgraduados, (17°59'10.45" N y 93°35'2.70" O) con 22 m de altitud; el segundo ensayo se llevó a cabo en Tolimán, Querétaro (20°54'23.20"N y 99°55'41.55" O), a 1574 m de altitud. En ambos casos se utilizó un diseño completamente al azar; los ácaros y el tejido vegetal se analizaron mediante RT-PCR, con los iniciadores específicos para CiLV-C (Locali *et al.*, 2003) y OFV-citrus (Roy *et al.*, 2015b).

La RT-PCR se realizó con el protocolo de la National Plant Germoplasm and Biotechnology (Beltsville, EE.UU) documento WI-B-T-1-31. La extracción de ARN total se realizó con el kit RNeasy Plant Mini Kit Qiagen OneStep RT-PCR (Cat. No. 210212), la mezcla de reacción para la RT-PCR consistió en 10 μ L agua MG, 5 μ L 5X Qiagen OneStep RT-PCR Buffer, 1 μ L Qiagen dNTPs (10mM), 3 μ L MPF-MPR o NPF- NPR Primer Mix (2 μ M), 3 μ L Nad5F-Nad5mr Primer Mix (2 μ M), 1 μ L Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix y 2 μ L de ARN total en un volumen final de 25 μ L.

Las condiciones de amplificación fueron: 50 °C por 30 min, 95 °C por 15 min; 40 ciclos: 95 °C por 15 seg, 56 °C (CiLV-C) o 58 °C (OFV-citrus) por 30 seg y 72 °C por 30 seg y una extensión final de 72 °C por 10 min. Los productos de amplificación se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % teñido con bromuro de etidio, a 90 volts por 60 min y la visualización se realizó en fotodocumentador bajo luz UV. Los productos de PCR se secuenciaron en Macrogen Inc., Corea.

RESULTADOS

A. Obtención y multiplicación de *Brevipalpus* sp. (Tetipac).

Se obtuvo y preservó una colonia estable de *Brevipalpus* sp. (Tetipac) libre de virus en condiciones de laboratorio durante el desarrollo del experimento. Se mantuvieron 45 naranjas agrias para el desarrollo de la cría durante un año y seis meses, con lo cual se contó con suficientes ejemplares para la realización de las pruebas de transmisión (Figura 4).

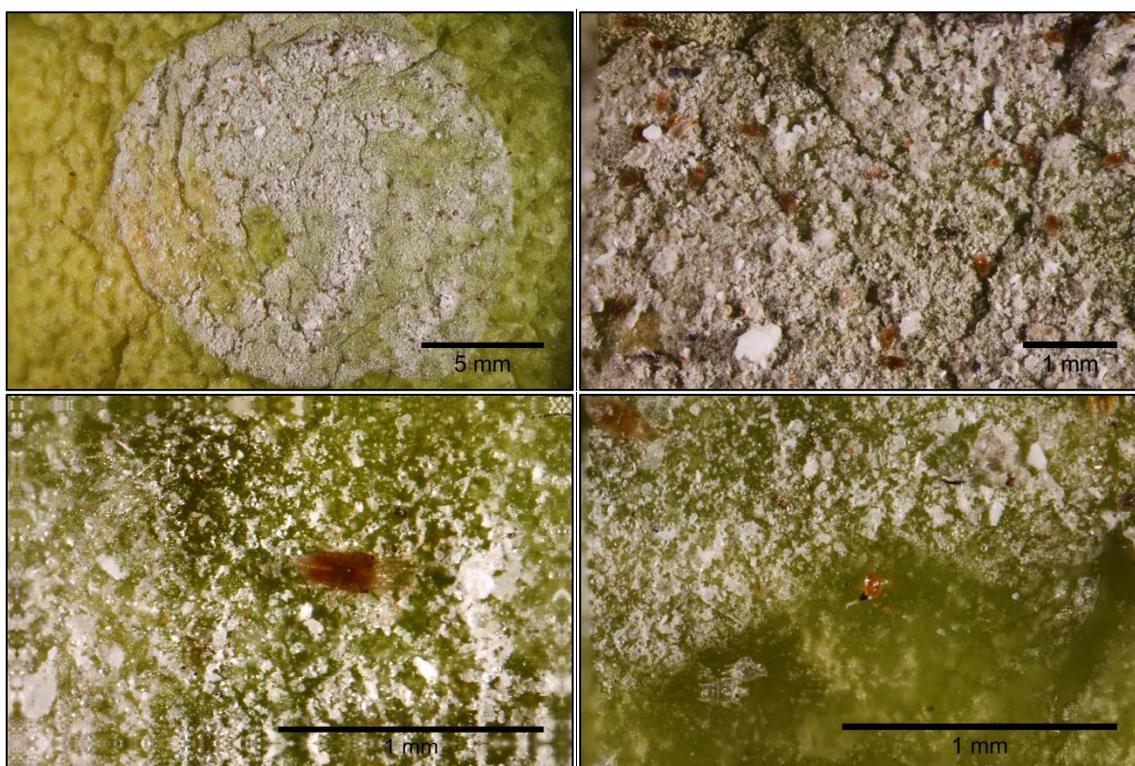


Figura 4. Desarrollo de la colonia de *Brevipalpus* sp. (Tetipac) luego de un año y seis meses sobre las arenas de cría de naranja agria.

B. Caracterización morfométrica

Se obtuvieron fotomicrografías SEM y DIC de *Brevipalpus* sp. (Tetipac) y *B. californicus* (Texcoco), así como fotografías DIC de *B. californicus* y *B. lewisi*, de sus respectivas series tipo. Las primeras permitieron observar con gran aumento estructuras externas, mientras

que con las segundas se observaron las espermatecas. Como referencia se usaron fotografías de la galería de Flat Mites of the World (<http://idtools.org/id/mites/flatmites/>).

Todos los ácaros observados tenían sedas f2, palpos con cuatro artejos y tres sedas en el tarso palpal; los ejemplares de *B. californicus* (tipo), así como los identificados como *B. californicus* (Texcoco) tenían dos solenidios en cada tarso II, que los ubica en el grupo *californicus* de acuerdo con el sistema de Baker y Tuttle (1987). En contraste, los ejemplares de *B. lewisi* (tipo) y *Brevipalpus* sp. (Tetipac) tenían un solenidio en cada tarso II, lo que los ubica en el grupo *cuneatus* de acuerdo con el mismo sistema (Figuras 5 y 6).

Las espermatecas presentaban forma de vesícula redondeada con presencia de una cresta o corona en su parte final, la cual era similar entre las cuatro especies por lo que no era una característica contundente para separarlas. Lo anterior incluía a *B. lewisi* (tipo), ubicada por Baker y Tuttle (1987) en el grupo *cuneatus* (Figura 7 A-D). Las microplacas de *Brevipalpus* sp. (Tetipac) y *B. californicus* (colonia) tenían forma similar, de redondeada a ovoide y presentaban crestas longitudinales en su superficie; estaban más separadas en la última especie (Figura 7 E y F). Para los ejemplares de las series “tipo” de *B. californicus* y *B. lewisi* no se tuvo acceso a las microplacas, debido que se encontraban en lamillas y no se dispuso de ejemplares adicionales que se pudieran observar con microscopio electrónico de barrido.

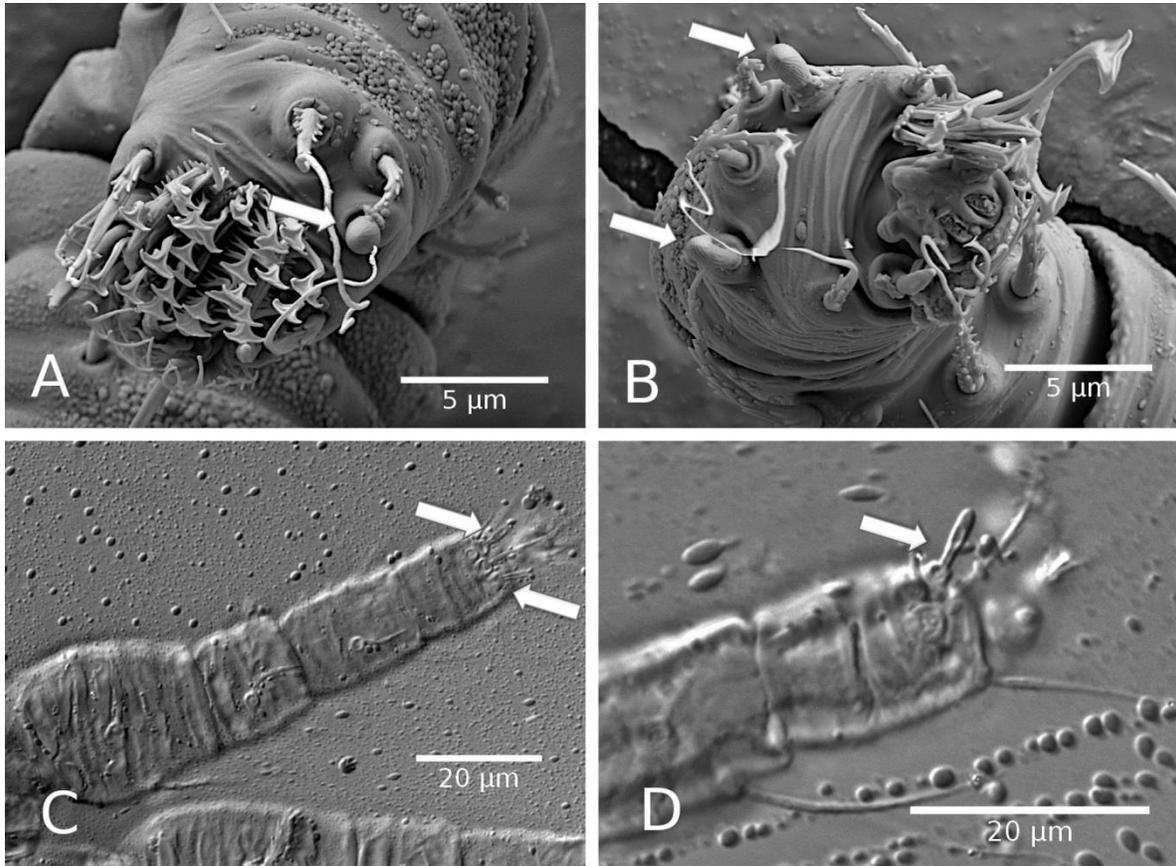


Figura 5. Solenidios en patas II: **A)** *Brevipalpus* sp. (Tetipac); **B)** *B. californicus* (Texcoco); **C)** *B. californicus* (tipo); **D)** *B. lewisi* (tipo). A-B fotografías de microscopia electrónica (SEM-CNRF), C-D fotografías de microscopia DIC.

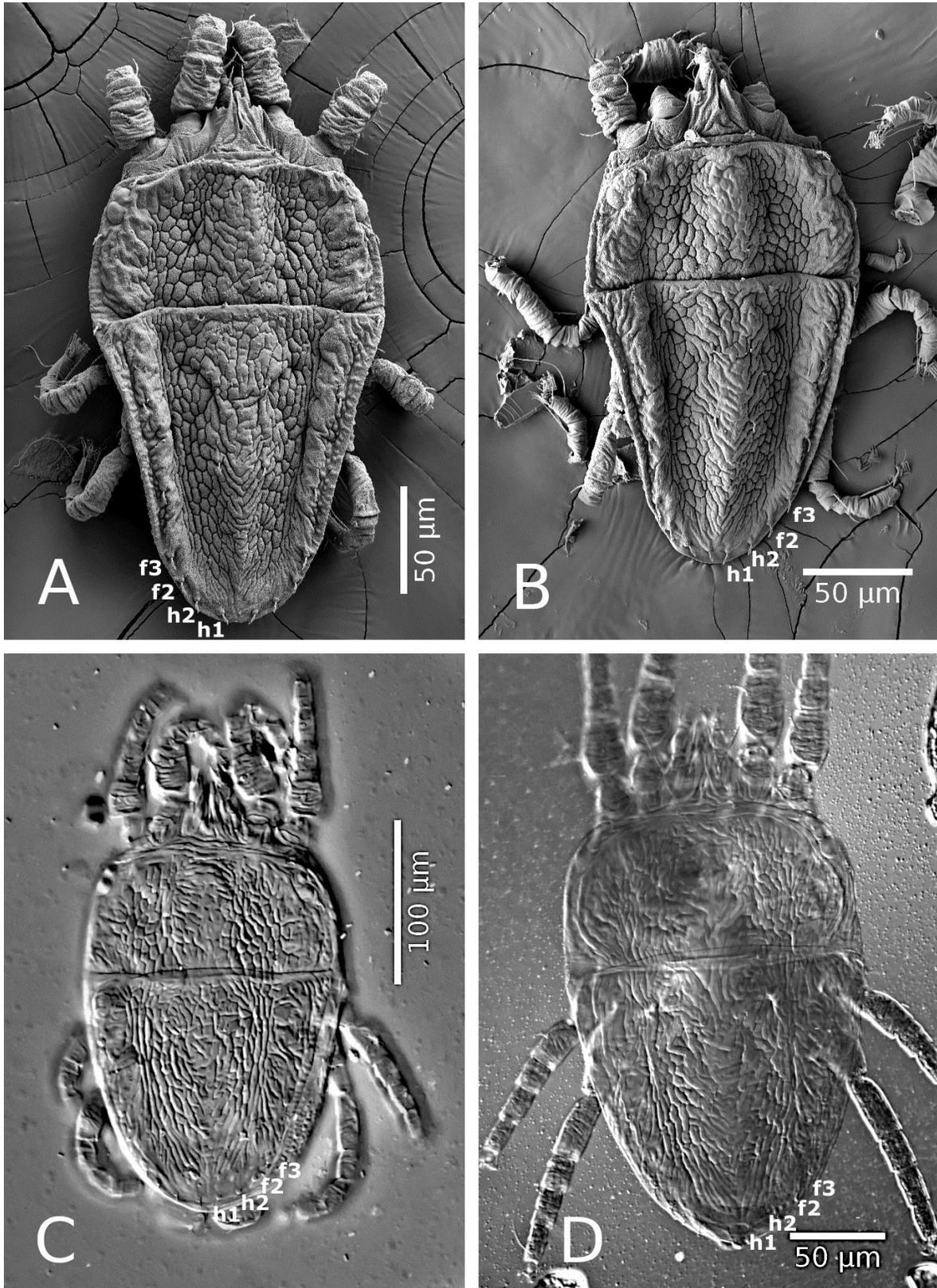


Figura 6. Panorámicas de las ornamentaciones presentes en el cuerpo de los ácaros (vista dorsal): **A)** *Brevipalpus* sp. (Tetipac); **B)** *B. californicus* (Texcoco); **C)** *B.*

californicus (tipo); **D**) *B. lewisi* (tipo). A-B fotografías de microscopía electrónica (SEM-CNRF), C-D fotografías de microscopía DIC.

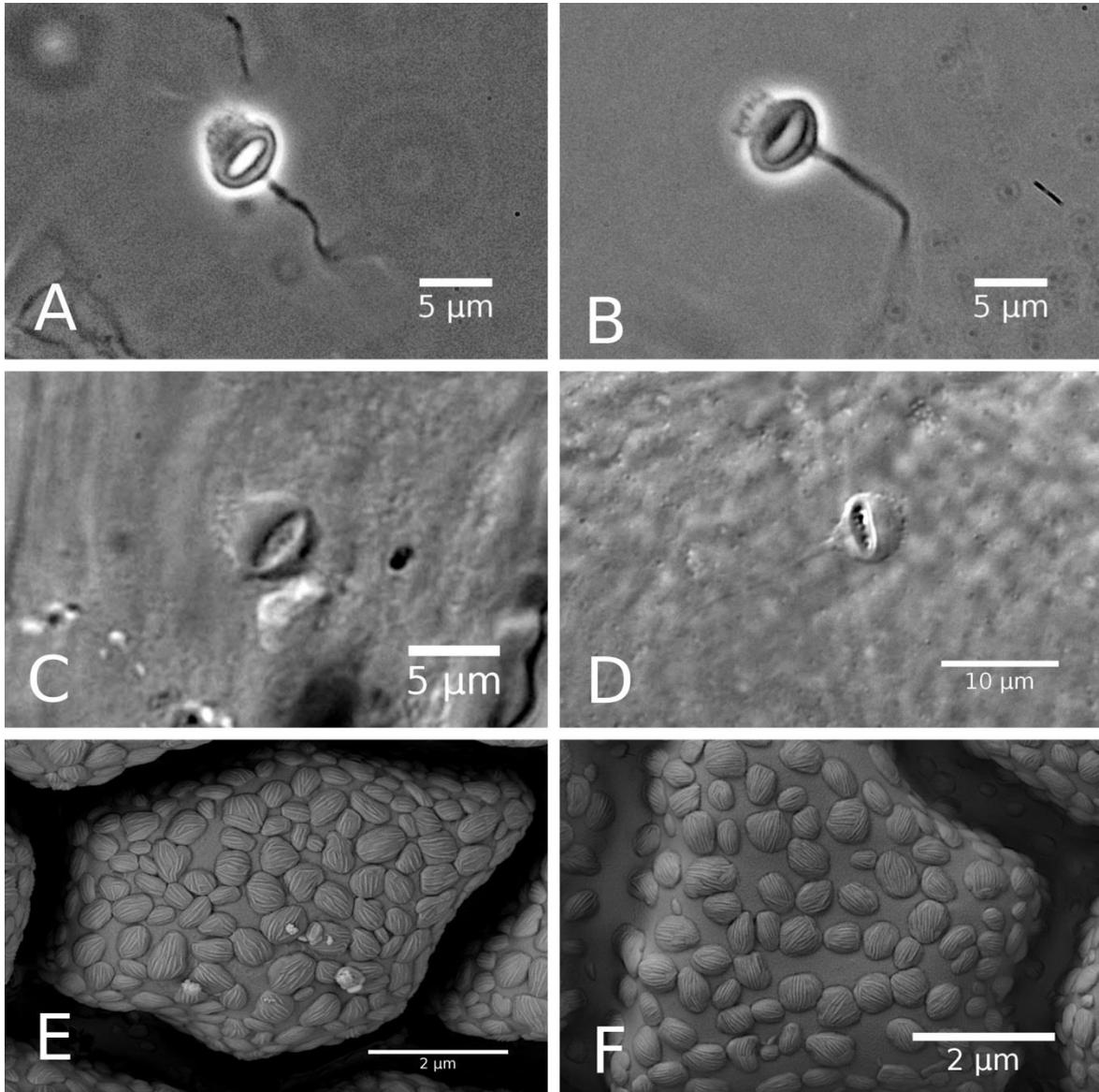


Figura 7. A-D: fotomicrografías DIC de espermateca. **A:** *Brevipalpus* sp. (Tetipac); **B:** *B. californicus* (Texcoco); **C:** *B. californicus* (tipo); **D:** *B. lewisi* (tipo). E-F: fotomicrografías SEM de microplacas. **E:** *Brevipalpus* sp. (Tetipac); **F:** *B. californicus* (Texcoco).

Las 37 mediciones realizadas para los cuatro grupos de especies se muestran en el Cuadro 3. De las características antes mencionadas, en el análisis univariado solamente se

contemplaron 17 de ellas, dado que fueron las que cumplieron con los supuestos de distribución normal y homogeneidad de varianzas para realizar el ANOVA. En las dimensiones lineales se observa que los valores de unas son significativamente mayores en una especie o población, mientras que otras son menores. Sin embargo, *B. lewisi* (tipo) presentó en lo general las mayores dimensiones, tanto en el largo y ancho del idiosoma como en la longitud de las sedas y la distancia entre ellas; en el otro extremo se encontró a *B. californicus* (tipo), con las menores dimensiones y donde en 16 de 17 variables fue significativamente diferente de *B. lewisi* (tipo). Por su parte, *B. californicus* (Texcoco) y *Brevipalpus* sp. (Tetipac) se encontraron en posición intermedia, formando un bloque en el que fueron significativamente diferentes entre sí en seis de las 17 variables analizadas.

El valor numérico asignado al grado de redondez de las reticulaciones del dorso del propodosoma ubicó a *B. californicus* (Texcoco) y a *Brevipalpus* sp. (Tetipac) en el mismo grupo, sin diferencia significativa, mientras que *B. californicus* (tipo) y *B. lewisi* (tipo) tuvieron grados de redondez significativamente inferiores y también diferentes entre sí (Cuadro 1); las reticulaciones de esta última especie fueron claramente alargadas (Figura 6 D), carácter que se consideró como característica diagnóstica en su descripción original (McGregor, 1949).

Cuadro 3. Medias (\pm error estándar, EE), mínimos y máximos valores (μm) observados en 36 características analizadas por medio de ANOVA para las hembras adultas de cuatro grupos de individuos de *Brevipalpus* (*).

Características evaluadas	<i>Brevipalpus</i> sp. (Tetipac)			<i>B. californicus</i> (Texcoco)			<i>B. californicus</i> (tipo)			<i>B. lewisi</i> (tipo)		
	Media \pm E.E	Min	Max	Media \pm E.E	Min	Max	Media \pm E.E	Min	Max	Media \pm E.E	Min	Max
Ancho del cuerpo (c3-c3)	145,02 \pm 1,07 B	133,1	151	138,54 \pm 0,57 A	131	143,9	148,71 \pm 2,44 B	143,2	155,8	156,59 \pm 1,94 C	149,7	181,7
Distancias entre sedas c1-c1	42,81 \pm 0,62 A	37,2	48,2	42,76 \pm 0,38 A	38,1	45,3	45,86 \pm 1,45 B	41,8	50,1	46,49 \pm 0,86 C	41,2	54,2
Distancias entre sedas e1-e1	18,65 \pm 0,32 B	16,2	21,5	17,64 \pm 0,36 AB	14,6	20,7	18,37 \pm 0,29 B	17,9	19,5	16,29 \pm 0,31 A	14,3	18
Distancias entre sedas f2-f2	55,97 \pm 0,62 A	51,9	61,3	53,26 \pm 0,56 A	48,1	57,6	61,11 \pm 1,29 B	57,8	65,5	68,26 \pm 0,83 C	63,9	77,5
Distancias entre sedas f3-f3	73,44 \pm 0,77 A	67,2	81	73,62 \pm 0,59 A	69,3	78,9	79,28 \pm 2,25 B	73,3	85,6	88,88 \pm 0,94 C	79,3	94,7
Distancias entre sedas h2-h2	35,13 \pm 0,36 B	32,9	38	31,31 \pm 0,47 A	27,8	35,5	37,67 \pm 0,59 C	36,3	39,5	42,65 \pm 0,58 D	39,1	46,3
Longitud seda sc2	9,39 \pm 0,22 B	7,6	11,6	11,17 \pm 0,22 C	8,8	13	8,06 \pm 0,60 A	6,5	9,8	9,72 \pm 0,28 B	7,8	12,2
Longitud seda c1	7,06 \pm 0,10 AB	5,1	9	6,72 \pm 0,18 A	5	8,2	6,31 \pm 0,49 A	5,2	8,1	7,82 \pm 0,17 B	6,7	9,2
Longitud seda d3	7,94 \pm 0,19 B	5,8	9,2	7,55 \pm 0,17 AB	6,2	8,8	6,84 \pm 0,47 A	5,4	8,4	7,78 \pm 0,17 B	6,6	8,9
Longitud seda e1	6,54 \pm 0,10 C	5,8	7,4	5,32 \pm 0,10 A	4,6	6,1	5,67 \pm 0,27 AB	4,7	6,3	6,14 \pm 0,11 BC	5,4	6,7
Longitud seda f3	7,21 \pm 0,15 A	5,9	8,2	7,21 \pm 0,15 A	5,6	8,5	6,80 \pm 0,26 A	6,3	7,7	9,14 \pm 0,23 B	8	11,8
Longitud seda h1	6,74 \pm 0,17 BC	5,2	8,8	5,68 \pm 0,12 A	4,9	6,8	5,95 \pm 0,46 AB	5,1	7,6	7,47 \pm 0,19 C	6,1	9
Longitud seda ag	9,48 \pm 0,25 B	6,9	11,8	6,80 \pm 0,21 A	5	8,2	7,17 \pm 0,77 A	5,5	9,9	10,53 \pm 0,40 B	7,7	13,6
Longitud seda g1	13,49 \pm 0,34 B	10	15,8	13,38 \pm 0,33 B	10,5	16,2	11,47 \pm 1,28 A	7,8	15,2	14,23 \pm 0,35 B	11,4	16,7
Longitud placa genital	28,83 \pm 0,27 A	26,9	32	27,51 \pm 0,29 A	25,5	30	30,41 \pm 0,84 B	27,7	32,8	28,86 \pm 0,34 A	26,7	30,9
Ancho placa ventral	44,58 \pm 0,33 A	42,4	47,6	45,75 \pm 0,39 A	42,4	48,6	50,51 \pm 0,67 C	48,4	52,6	48,25 \pm 0,63 B	45,3	54
Factor de redondez (0-1)	0,62 \pm 0,01 C	0,5	0,7	0,60 \pm 0,01 C	0,5	0,6	0,55 \pm 0,01 B	0,5	0,6	0,41 \pm 0,01 A	0,3	0,5
Largo del cuerpo (v2-h1)	214,93 \pm 1,49	200,78	223,78	202,19 \pm 0,93	195,7	211,5	210,88 \pm 7,94	181,2	225,7	231,18 \pm 2,78	218,56	266,5
Distancias entre sedas v2-v2	29,44 \pm 0,55	25,08	35,51	32,23 \pm 0,30	29,9	34,2	30,64 \pm 0,74	28,7	32,6	32,23 \pm 0,47	29,53	35,77
Distancias entre sedas sc1-sc1	95,05 \pm 0,83	87,13	103,82	90,41 \pm 0,45	86,9	94,1	102,41 \pm 2,33	98,7	111,4	100,31 \pm 1,15	97,05	115,44

<i>Distancias entre sedas sc2-sc2</i>	134,93±0,95	123,02	140,93	129,66±0,44	125,6	133,3	138,66±1,86	133,0	144,3	147,81±1,55	142,62	166,92
<i>Distancias entre sedas d1-d1</i>	24,36±0,36	22,16	27,95	21,57±0,40	16,9	24,5	24,84±2,06	18,7	28,7	22,82±0,56	18,39	25,7
<i>Distancias entre sedas d3-d3</i>	111,36±0,84	103,14	119,39	110,95±0,52	106,0	115,2	119,58±2,43	112,5	127,2	124,69±1,77	113,97	144,18
<i>Distancias entre sedas e3-e3</i>	91,05±0,98	82,6	97,2	95,22±0,57	90,0	100,0	100,64±1,25	97,2	104,0	105,49±1,30	99,7	121,5
<i>Distancias entre sedas h1-h1</i>	14,39±0,40	10,16	17,64	10,06±0,24	8,0	11,9	12,36±0,37	11,4	13,5	14,9±0,71	10,39	18,5
<i>Largo del opistosoma (c1-h1)</i>	134,76±1,18	124,29	142,05	129,63±0,76	125,3	138,0	129,18±7,66	99,4	140,7	146,3±1,61	139,95	166,85
<i>Seda v2</i>	8,88±0,19	7,42	10,52	8,99±0,19	7,1	10,5	6,25±0,14	6,0	6,8	8,94±0,12	7,87	9,67
<i>Seda sc1</i>	9,56±0,19	7,7	11,06	10,27±0,17	8,0	11,8	7,41±0,61	5,4	8,8	9,47±0,38	5,87	11,41
<i>Seda c3</i>	8,30±0,20	6,95	10,79	9,05±0,14	7,3	10,3	7,44±0,27	6,6	8,3	9,36±0,40	6,77	11,94
<i>Seda d1</i>	6,91±0,18	5,46	8,99	5,97±0,11	5,1	7,1	6,27±0,23	5,8	7,1	6,45±0,10	5,79	7,12
<i>Seda e3</i>	7,42±0,12	6,42	8,49	6,65±0,13	5,3	7,5	6,12±0,35	5,1	7,0	8,52±0,28	6,07	10,26
<i>Seda f2</i>	7,33±0,12	6,59	8,8	6,51±0,12	5,6	8,2	6,71±0,24	6,0	7,5	8,82±0,12	8,01	9,66
<i>Seda h2</i>	6,70±0,14	5,24	8,12	6,24±0,15	4,9	7,5	6,10±0,38	5,5	7,5	7,46±0,11	6,55	8,19
<i>Seda g2</i>	11,38±0,23	9,41	13,16	9,98±0,25	7,8	12,5	10,25±0,81	8,6	12,4	12,29±0,56	8,55	15,78
<i>Ancho placa genital</i>	39,06±0,33	35,83	41,6	40,28±0,31	36,7	43,0	45,03±0,49	43,7	46,4	43,83±0,72	38,17	47,79
<i>Largo placa ventral</i>	40,68±0,31	37,62	42,27	37,24±0,23	34,7	39,1	36,11±1,14	31,9	38,4	37,4±0,65	33,18	41,28
<i>Seda palpo-fémur</i>	11,15±0,17	9,69	12,74	11,21±0,19	10,0	13,2	11,32±0,82	9,2	13,9	12,13±0,40	9,92	15,3

***Medias con diferente letra representan diferencias significativas entre sí (Tukey P<0.05), comparación de forma horizontal. Las demás medidas no se incluyeron en el análisis porque no cumplieron los supuestos de ANOVA (distribución normal y homogeneidad de varianzas).**

En el análisis de componentes principales, los dos primeros componentes (CP1= 75.0%, CP2= 10.78%) explicaron 86% de la variabilidad total (Figura 8). En el caso del CP1, por su valor ponderado (de mayor a menor peso), el orden de las variables fue: largo del cuerpo (v2-h1), ancho del cuerpo (c3-c3), largo del opistosoma (c3-c3), distancia entre las sedas sc2-sc2, d3-d3, f2-f2, f3-f3 y e3-e3. Para CP2, el valor ponderado de las variables fue: largo del cuerpo (v2-h1), largo del opistosoma (c1-h2), distancia entre sedas e3-e3, f3-f3, d3-d3 y ancho de la placa genital. Cabe resaltar que el análisis separó a los individuos 56 [*B. californicus* (tipo)] y 51 [*B. lewisi* (tipo)]; el resto de los individuos formaron un solo grupo, sin separación entre las putativas especies o poblaciones.

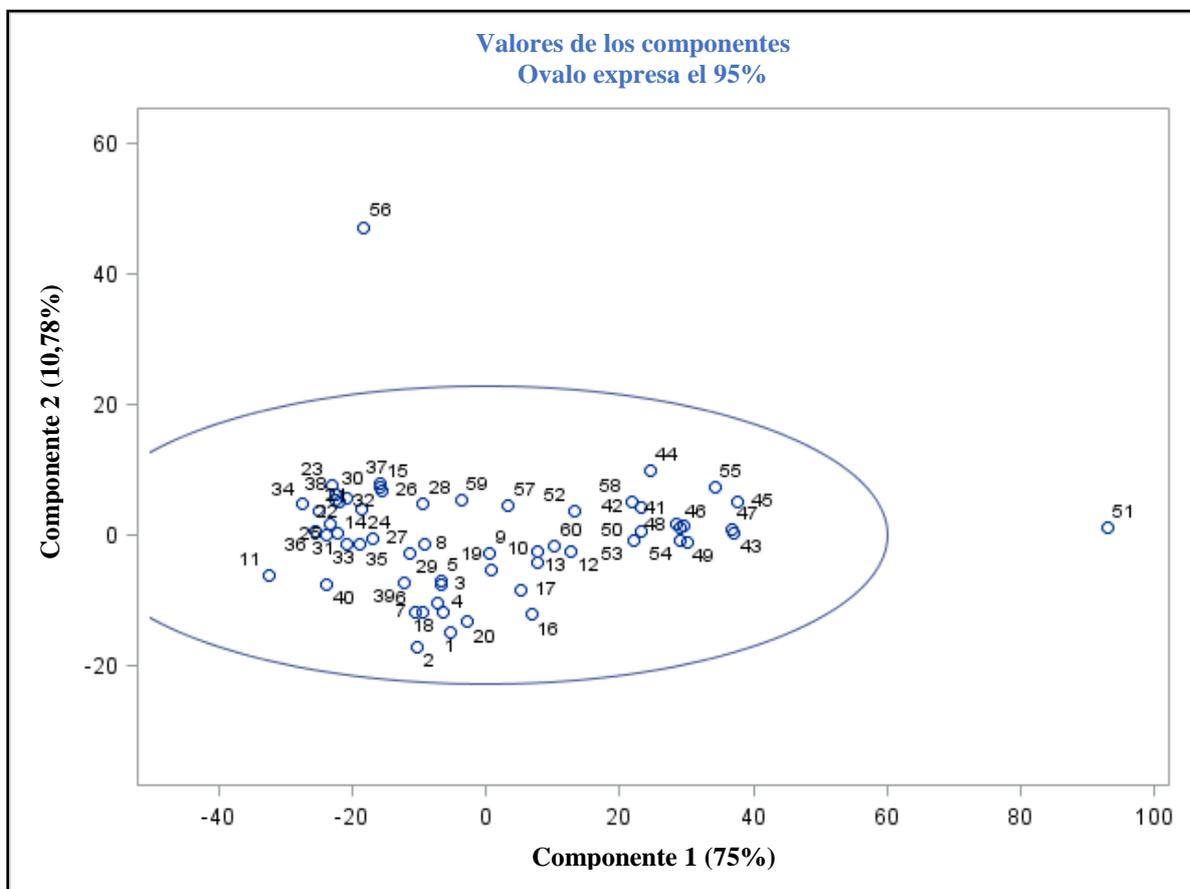


Figura 8. Componentes principales 1 y 2 análisis obtenido con 37 variables morfológicas para las hembras adultas de los cuatro grupos de especies de *Brevipalpus*. Porcentaje de la variación explicada entre paréntesis. Cada número corresponde a un individuo específico, n=60.

El análisis de conglomerados mostró la presencia de al menos siete grupos (Figura 9) entre las especies. Para la escogencia del mejor número de conglomerados se tomaron en cuenta los criterios de CCC (cubic clustering criterion), Pseudo F (mide la separación entre todos los

grupos en el nivel actual) y Pseudo T² (mide la separación entre los dos grupos cercanos más unidos) (SAS Institute Inc, 2018). El CCC indica que pueden ser siete u 11 conglomerados, los valores para este parámetro deben ser positivos; mientras más alto sea el criterio Pseudo F indica mejores números de conglomerados, para nuestro caso que deben ser 11 conglomerados. Para obtener el valor de Pseudo T² se debe observar en la gráfica el valor más alto de derecha a izquierda y el valor inmediato al valor más alto de izquierda a derecha es el criterio a utilizar (SAS Institute Inc, 2018), con lo que indica que el número de conglomerados puede ser siete u ocho (Figura 9).

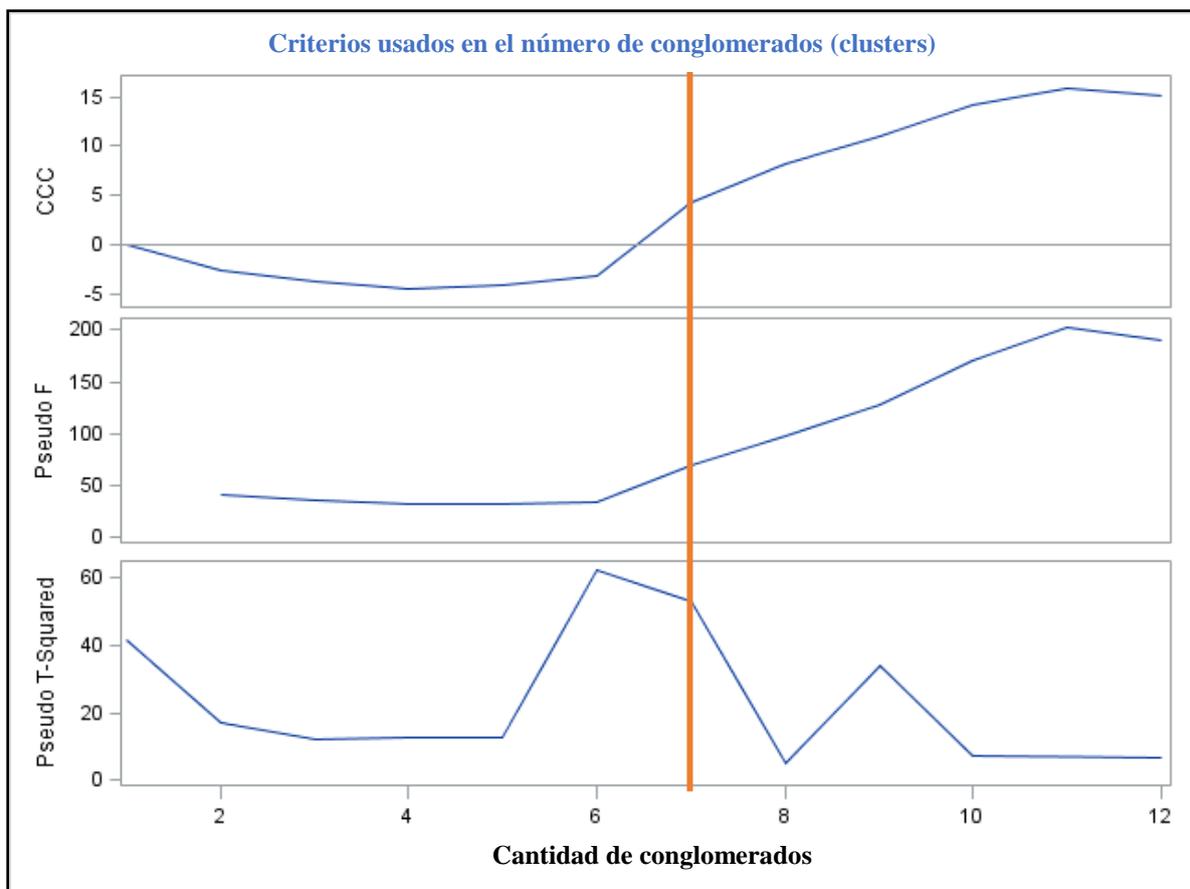


Figura 9. Criterios para la determinación del número de conglomerados. Lo anterior a partir de las 37 variables morfométricas para hembras adultas de los cuatro grupos de especies de *Brevipalpus*. La línea vertical indica el número de conglomerados que representan al conjunto de datos del análisis de componentes principales.

Considerando los tres criterios anteriores y la distribución de conglomerados en el dendrograma (Figura 9), la población se dividió en siete conglomerados, donde se separan seis individuos de *B. lewisi* (tipo) y tres ejemplares de *B. californicus* (tipo), mientras todos los individuos de *Brevipalpus* sp. 1 y *B. californicus* (colonia) se encuentran en el mismo

grupo, en conjunto con algunos individuos de ambas series tipo. Utilizar esta cantidad de conglomerados toma la mayor parte de la variación de los datos utilizados (≈ 0.85); es decir, solamente tomando los siete conglomerados se explica más de 85% de la variación (Figura 10).

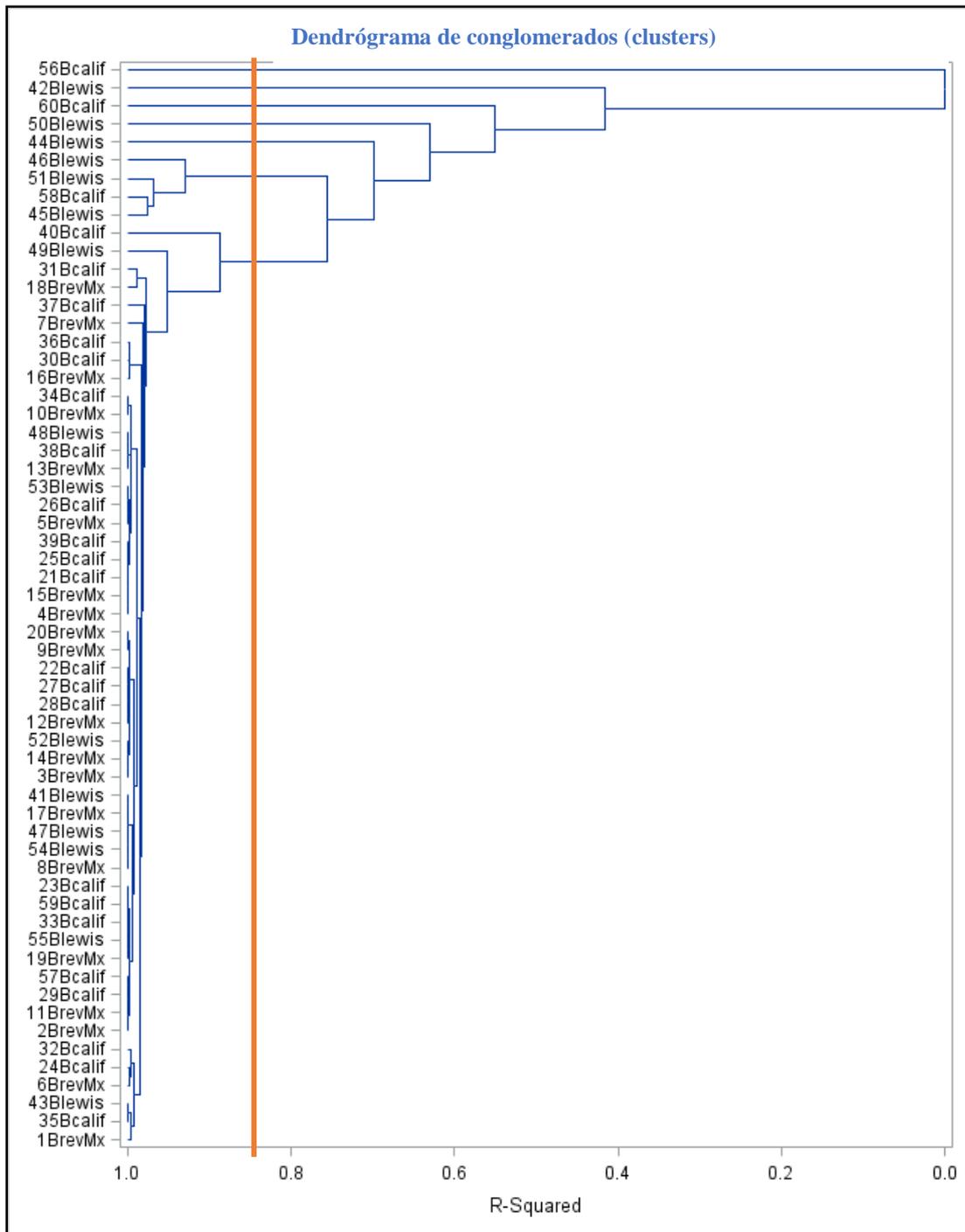


Figura 10. Grupos de especies (conglomerados) obtenidos a partir de las 37 variables morfológicas para hembras adultas de *Brevipalpus* según el análisis multivariado. **BrevMx**=*Brevipalpus* sp. (Tetipac); **BcalifM**=*B. californicus* (Texcoco); **Bcalif**=*B.*

californicus (tipo); **Blewis**= *B. lewisi* (tipo). La línea vertical representa 85.78% (0.8578) de la variación de los componentes principales, expresada en valor de r^2 .

Los datos obtenidos en este estudio muestran que las cuatro especies analizadas forman un mismo grupo (basándose en los 37 parámetros en estudio) y según la información presentada no se pueden separar de forma morfométrica entre sí (exceptuando algunos los puntuales antes mencionados).

C. Caracterización molecular

Las secuencias de *Brevipalpus* sp. (Tetipac) amplificadas con DNF-DNR tuvieron una similitud de 100% con *B. californicus* (No. de acceso KX100321.1 KX100319 y KX100299.1) mientras que para *Brevipalpus californicus* (Texcoco) fue 98% con *B. californicus* (No. de acceso KX100321.1).

Las secuencias de *Brevipalpus* sp. (Tetipac) obtenidas con los iniciadores LCOI-HCOI tuvieron una similitud del 90.9% con *Tenuipalpidae* no identificado (No. de acceso MF749883.1); mientras que *B. californicus* (Texcoco) presentó una similitud de 84.2% con *Brevipalpus* sp. (No. de acceso KY922443.1). Por otro lado, las secuencias de *Brevipalpus* sp. (Tetipac) obtenidas con los iniciadores D23F-D6R presentaron una similitud de 94.1% con *Tenuipalpus* sp. (No. de acceso KY922069.1), mientras que las secuencias de *B. californicus* (colonia) tuvieron 92,5% de similitud con *Tenuipalpus* sp. (No. de acceso KY922069.1). Las secuencias obtenidas con los iniciadores DNF-DNR de *Brevipalpus* sp. (Tetipac). y *B. californicus* (Texcoco) tuvieron una similitud de 100% con ejemplares identificados como *B. californicus*, haplotipo 2, por Salinas-Vargas *et al.* (2016).

Mediante el uso del programa jModelTest 2.1.10 (Darriba *et al.*, 2012) para obtener el mejor modelo de sustitución de nucleótidos para la construcción de los árboles filogenéticos, el mejor modelo para uno de los segmentos de COI (iniciadores DNF-DNR y D23F-D6R) fue Kimura2-parameter model (TPM1) (Kimura, 1981), mientras que para el otro segmento de COI (iniciadores LCOI-HCOI) fue Tamura and Nei model (TrN+G) (Tamura & Nei, 1993). Los árboles filogenéticos obtenidos se muestran en las Figuras 11, 12 y 13. Las secuencias utilizadas para la realización de las filogenias de los fragmentos COI (DNF-DNR y LCOI-HCOI) y 28S (D23F-D6R) se presentan en los cuadros 4, 5 y 6.

Cuadro 4. Identificación de las secuencias utilizadas para la filogenia de *Brevipalpus* a partir del fragmento COI (iniciadores DNF-DNR).

Especie	Planta hospedera	País	Código de secuencias	Fuente
<i>Brevipalpus</i> sp. (Tetipac)	<i>Citrus × aurantium</i>	México	MK875980	Este estudio
<i>B. californicus</i> (Texcoco)	<i>Citrus × aurantium</i>	México	MK875981	Este estudio
<i>B. californicus</i> (Texcoco)	<i>Citrus × aurantium</i>	México	MK875982	Este estudio
<i>B. grupo californicus</i> especie B	-	Estados Unidos	KC291402	Oliveira (2014)
<i>B. grupo californicus</i> n. especie B	<i>Rhododendron</i> sp.	Brasil	DQ789591	Oliveira (2014)
<i>B. californicus</i>	<i>Citrus sinensis</i>	México	KX100321	Salinas-Vargas <i>et al.</i> (2016)
<i>B. grupo californicus</i> sp.	<i>Thevetia peruviana</i>	Holanda	DQ789594	Oliveira (2014)
<i>B. californicus</i>	<i>Citrus sinensis</i>	México	KX100319	Salinas-Vargas <i>et al.</i> (2016)
<i>B. grupo phoenicis</i> tipo1	<i>Ligustrum</i> sp.	Brasil	KC291387	Oliveira (2014)
<i>B. grupo phoenicis</i> tipo1	<i>Citrus sinensis</i>	Brasil	KF954951	Oliveira (2014)
<i>B. n. grupo phoenicis</i> tipo 1	<i>Malpighia glabra</i>	Brasil	DQ789586	Oliveira (2014)
<i>B. obovatus</i>	<i>Camellia sinensis</i>	Estados Unidos	AY320028	Oliveira (2014)
<i>B. incongitus</i>	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil	KC291390	Oliveira (2014)
<i>B. n. yothersi</i> 1	<i>Hibiscus</i> sp.	Brasil	KC291369	Oliveira (2014)
<i>B. yothersi</i>	<i>Citrus sinensis</i>	México	KF955007	Oliveira (2014)
<i>B. yothersi</i>	<i>Citrus sinensis</i>	Brasil	KF954967	Oliveira (2014)
<i>B. yothersi</i>	<i>Citrus sinensis</i>	Brasil	KF954958	Oliveira (2014)
<i>B. lewisi</i>	-	China		Hao <i>et al.</i> (2016)
<i>Cenopalpus pulcher</i>	-	-	AY320029	Rodríguez <i>et al.</i> (2004)
<i>Tetranychus urticae</i>	-	-	EU345430	Van Leeuwen <i>et al.</i> (2008)

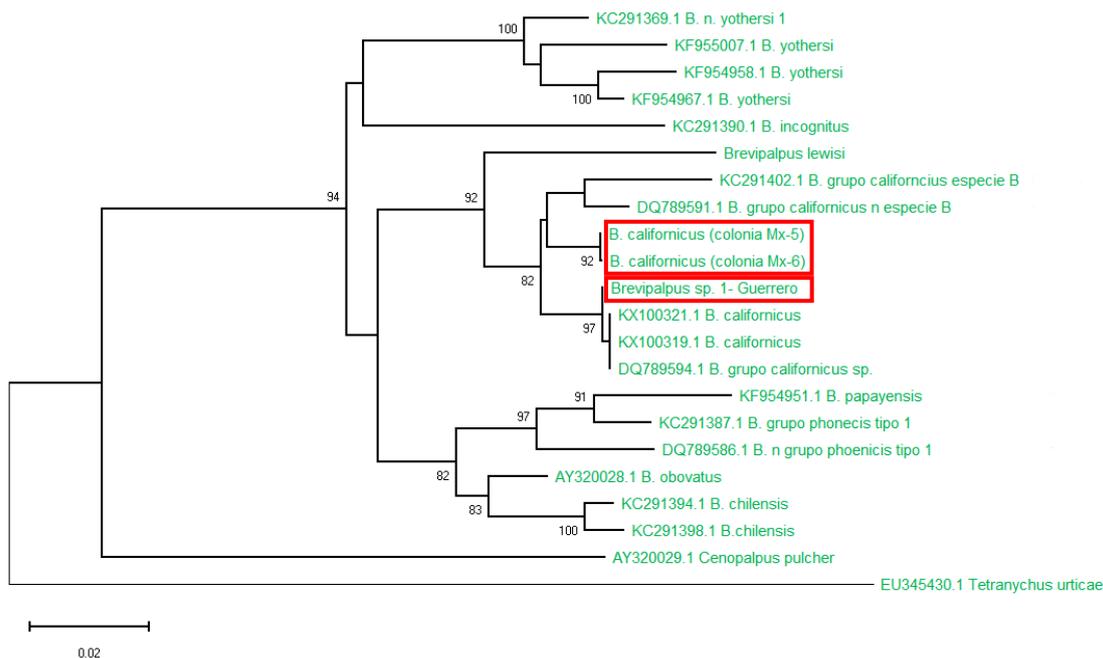


Figura 11. Árbol filogenético realizado a partir del fragmento COI mitocondrial de 339 pb amplificado con los iniciadores DNF-DNR de las especies de *Brevipalpus*, secuencias recuperadas del GenBank. Valores de bootstrap superiores a 80, en cada rama. Rectángulos de color rojo señalan las secuencias obtenidas en este estudio.

Cuadro 5. Identificación de las secuencias utilizadas para la filogenia de *Brevipalpus* a partir del fragmento COI (iniciadores LCOI-HCOI).

Especie	Planta hospedera	País	Código de secuencias	Fuente
<i>Brevipalpus</i> sp. (Tetipac)	<i>Citrus</i> × <i>aurantium</i>	México	-	Este estudio
<i>B. californicus</i> (Texcoco)	<i>Citrus</i> × <i>aurantium</i>	México	-	Este estudio
<i>B. yothersi</i>	<i>Citrus</i> sp.	Brasil	22 Cisp SBS SP	Tassi (2018)
	<i>Ptepdolobium</i> sp.	Brasil	37 Ptsp_ARA_AL	Tassi (2018)
	<i>Passiflora edulis</i>	Brasil	118-Paed SIM MT	Tassi (2018)
	<i>Clerodendrum thomsoniae</i>	Brasil	1-Cith PIC SP	Tassi (2018)
	<i>Ligustrum sinense</i>	Brasil	51-Lisi PIC SP	Tassi (2018)
<i>Brevipalpus</i> sp. nueva 1	<i>Ligustrum sinense</i>	Brasil	48-Lisi PIC SP	Tassi (2018)
	<i>Ptepdolobium</i> sp.	Brasil	41 Ptsp_ARA_AL	Tassi (2018)
<i>Brevipalpus</i> sp. nueva 1	<i>Delonix regia</i>	Brasil	100-Dere PIC SP	Tassi (2018)

<i>Brevipalpus</i> sp. nueva 3	<i>Citrus</i> sp.	Brasil	113-Cisp-TER_Pi	Tassi (2018)
<i>Brevipalpus</i> sp. nueva 4	<i>Phoenix</i> <i>roebelenii</i>	Brasil	28-Phro_PIC_SP	Tassi (2018)
<i>B. californicus</i> s.l 2	<i>Ligustrum</i> <i>sinense</i>	Brasil	49-LisiPIC SP	Tassi (2018)
<i>B. ferraguti</i>	<i>Cestrum</i> <i>nocturnum</i>	Brasil	115-Ceno SBO SP	Tassi (2018)
<i>Brevipalpus</i> sp. nueva 2	<i>Delonix regia</i>	Brasil	95-Dere_PIC_SP	Tassi (2018)
<i>B. obovatus</i>	<i>Cestrum</i> <i>nocturnum</i>	Brasil	101-Ceno SBO SP	Tassi (2018)
<i>B. phoenicis</i>	<i>Citrus</i> sp.	Brasil	109-Cisp IBI SP	Tassi (2018)
<i>B. papayensis</i>	<i>Ligustrum</i> <i>sinense</i>	Brasil	53-Lisi BRA	Tassi (2018)
	<i>Coffea arabica</i>	Brasil	124-Coar CAM SP	Tassi (2018)
<i>B. oncidii</i>	<i>Brassia</i> <i>verrucosa</i>	Australia	36-Bvre TAS AUS	Tassi (2018)
<i>Cenopalpus</i> <i>malus</i>	-	-	77Cenopalpus_Malus	Tassi (2018)
<i>Raoiella indica</i>	-	-	81EU682431_R_indica	Tassi (2018)

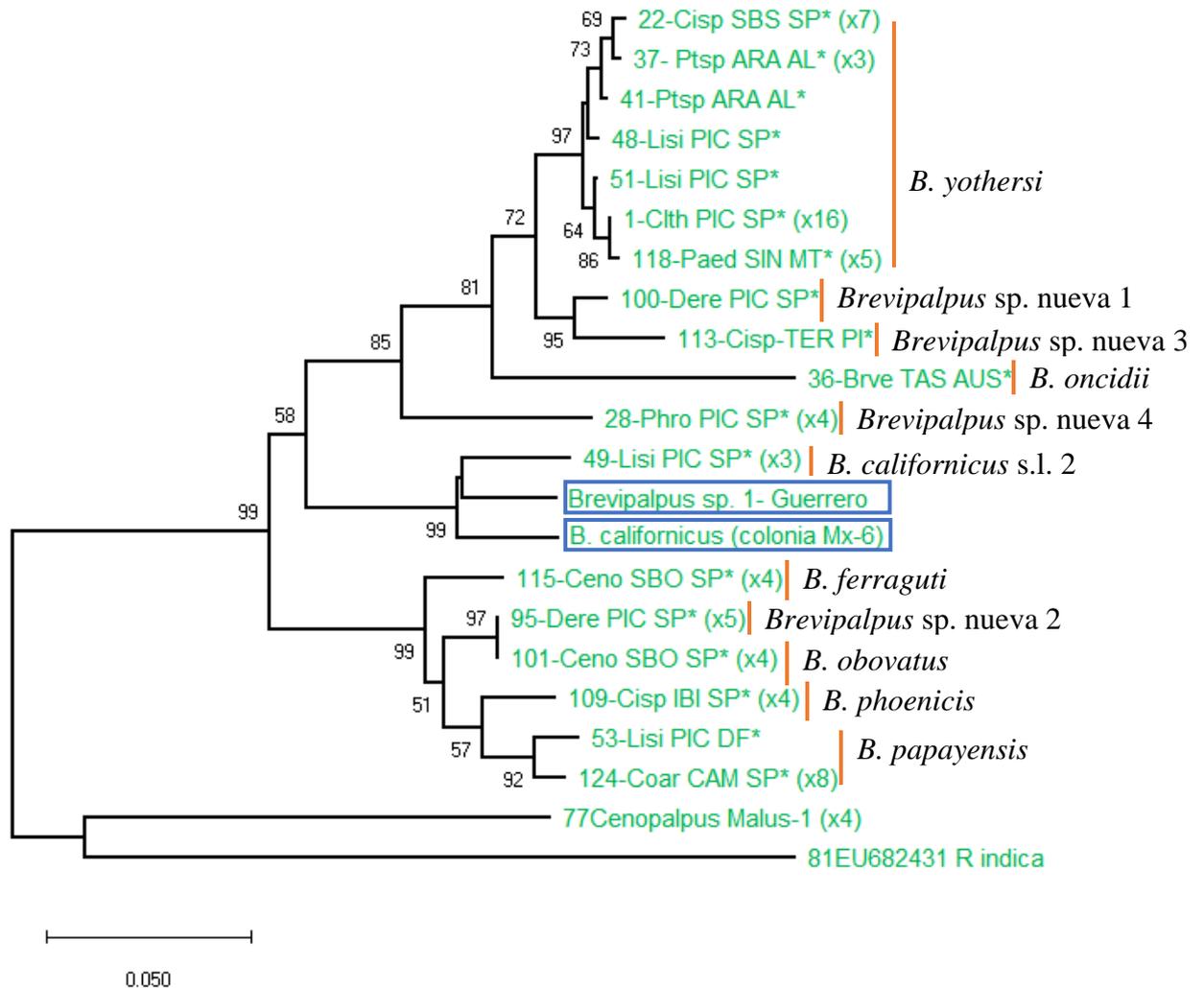


Figura 12. Árbol filogenético realizado a partir del fragmento COI mitocondrial de 650 pb amplificado con los iniciadores LCOI-HCOI de las especies de *Brevipalpus*, secuencias proporcionadas por Tassi (2018) (datos sin publicar). Valores de bootstrap superiores a 60, en cada rama. Rectángulos de color azul señalan las secuencias obtenidas en este estudio.

Cuadro 6. Identificación de las secuencias utilizadas para la filogenia de *Brevipalpus* a partir del fragmento D1-D3 gen 28S (iniciadores D23F-D6R).

Especie	Planta hospedera	País	Código de secuencias	Fuente
<i>Brevipalpus</i> sp. (Tetipac)	<i>Citrus</i> × <i>aurantium</i>	México	MK875164	Este estudio
<i>B. californicus</i> (Texcoco)	<i>Citrus</i> × <i>aurantium</i>	México	MK875165	Este estudio
	<i>L. sinense</i>	Brasil	48-Lisi PIC SP	Tassi (2018)
<i>B. yothersi</i>	<i>Citrus</i> sp.	Brasil	22-Cips SBS SP	Tassi (2018)
	<i>Thunbergia</i>	Brasil	105-Ther CAM SP	Tassi (2018)

		<i>erecta</i>		
	<i>Ipomoea batatas</i>	Brasil	37-Ptsp ARA AL	Tassi (2018)
<i>Brevipalpus</i> sp. nueva 4	<i>D. regia</i>	Brasil	28-Phro PIC SP	Tassi (2018)
<i>Brevipalpus</i> sp. nueva 8	<i>Quillaja saponaria</i>	Chile	89-Qusa CHI	Tassi (2018)
<i>Brevipalpus</i> sp. nueva 2	<i>D. regia</i>	Brasil	95-Dere BRA DF	Tassi (2018)
<i>B. californicus</i> s.l 2	<i>L. sinense</i>	Brasil	49-Lisi PIC	Tassi (2018)
<i>B. araucanos</i> s.l 1	<i>Aristotelia chilensis</i>	Chile	61-Arch CHI	Tassi (2018)
<i>B. obovatus</i>	<i>L. sinense</i>	Brasil	42-Lisi BRA DF	Tassi (2018)
	<i>L. sinense</i>	Brasil	47-Lisi PIC SP	Tassi (2018)
<i>B. papayensis</i>	<i>C. arabica</i>	Brasil	123-Coar CAM SP	Tassi (2018)
<i>B. ferraguti</i>	<i>C. nocturnum</i>	Brasil	114-Ceno SBO SP	Tassi (2018)
<i>B. oncidii</i>	<i>B. verrucosa</i>	Australia	36-Bvre TAS AUS	Tassi (2018)
<i>Raoiella indica</i>	-	-	81EU682431_R_indica	Tassi (2018)

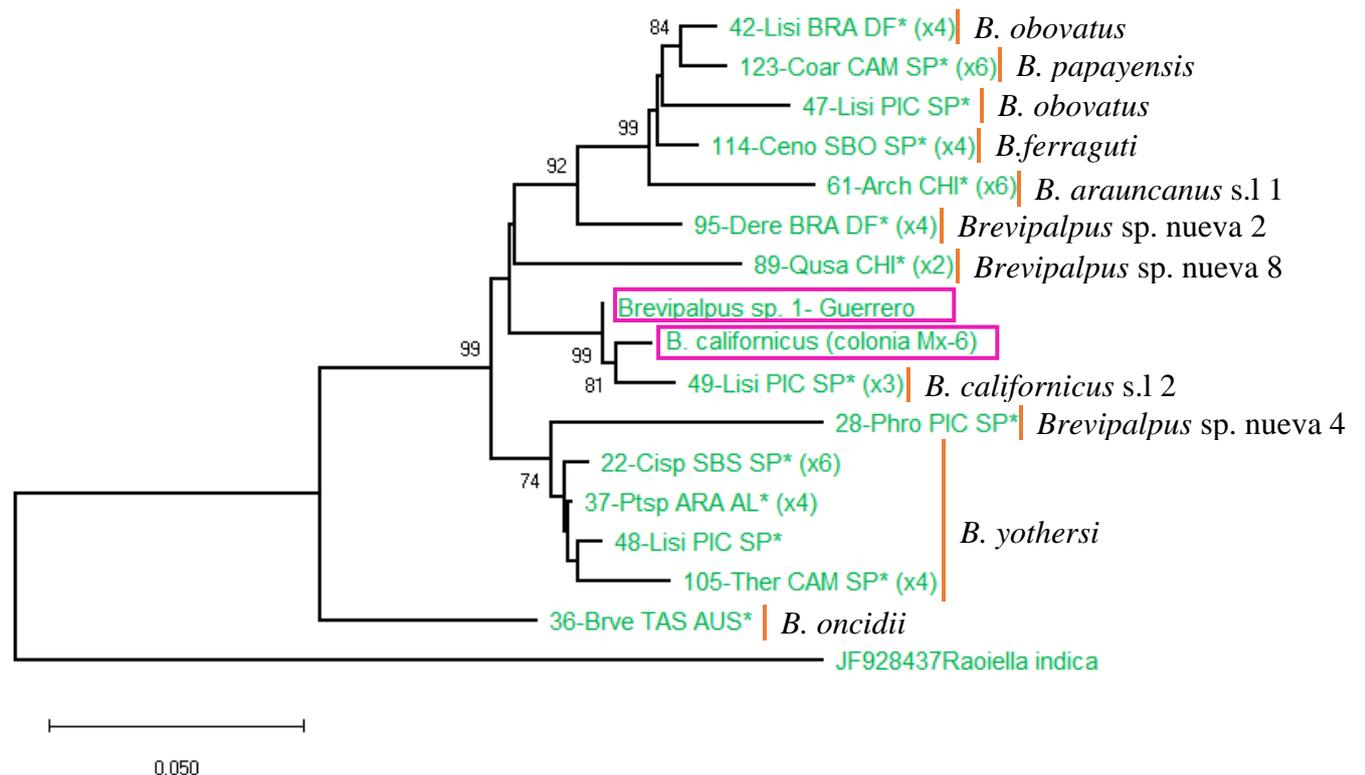


Figura 13. Árbol filogenético realizado a partir del fragmento D1-D3 del gen 28S de 900 pb amplificado con los iniciadores D23F-D6R de las especies de *Brevipalpus*, secuencias proporcionadas por Tassi (2018) (datos sin publicar). Valores de bootstrap superiores a 50, en cada rama. Rectángulos de color lila señalan las secuencias obtenidas en este estudio.

De las secuencias obtenidas en los tres árboles filogenéticos se puede observar la separación de los diferentes linajes de los distintos grupos, *B. yothersi*, *B. incognitus*, *B. californicus*, *B. phoenicis* y *B. obovatus*. El grupo *californicus*, donde se encuentran las secuencias de *Brevipalpus* sp. (Tetipac) y *B. californicus* (Texcoco), se agrupa con *B. lewisi*, ubicada por Baker y Tuttle (1987) en el grupo *cuneatus* por tener un solo solenidio en cada uno de los tarsos II.

Los resultados de las secuencias obtenidas con el par de segmentos de la región mitocondrial (COI) y del fragmento D1-D3 del gen 28S son consistentes con los datos del estudio de morfometría. Por lo anterior, *Brevipalpus* sp. (Tetipac) es un linaje de *B. californicus* sensu lato, aberrante por poseer un solo par de solenidios en los tarsos de las patas II. Por ello se le designa de aquí en adelante como una población aberrante de *B. californicus*.

D. Pruebas de transmisión de CiLV-C y OFV-citrus

CiLV-C se detectó en hembras adultas a las 24 y 48 horas después de la alimentación sobre tejido vegetal infectado (1 de 10 en ambos casos). En larvas y ninfas no se detectó al virus luego de 24, 48, o 72 h de alimentación en hojas infectadas. Por otro lado, todos los estados de desarrollo del ácaro fueron capaces de adquirir al OFV-citrus: larvas (28 de 30), ninfas (29 de 30) y hembras adultas (27 de 30) (Cuadro 7). Estos resultados se corroboraron mediante RT-PCR (Figuras 14 y 15). Las secuencias de los segmentos amplificadas de CiLV-C presentaron una similitud de 97% con Citrus leprosis virus-Cytoplasmic (No. de acceso KR093133 y KR093133), mientras que las del OFV-citrus tuvieron una similitud del 98% con Orchid fleck virus-citrus (No. de acceso KF209275.2, KJ195893.1 y KJ195893.1, KF209275.2).

Cuadro 7. Adquisición de CiLV-C y OFV-citrus por diferentes estados de desarrollo de la población aberrante de *B. californicus* [*Brevipalpus* sp. (Tetipac)].

Estado de desarrollo	Tiempos de adquisición CiLV-C			Tiempos de adquisición OFV-citrus		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Larvas	0/10	0/10	0/10	9/10*	10/10	9/10
Ninfas	0/10	0/10	0/10	9/10	10/10	10/10
Hembras adultas	1/10*	1/10	0/10	8/10	9/10	10/10

*Positivo (grupos de 15 ácaros)/total de repeticiones

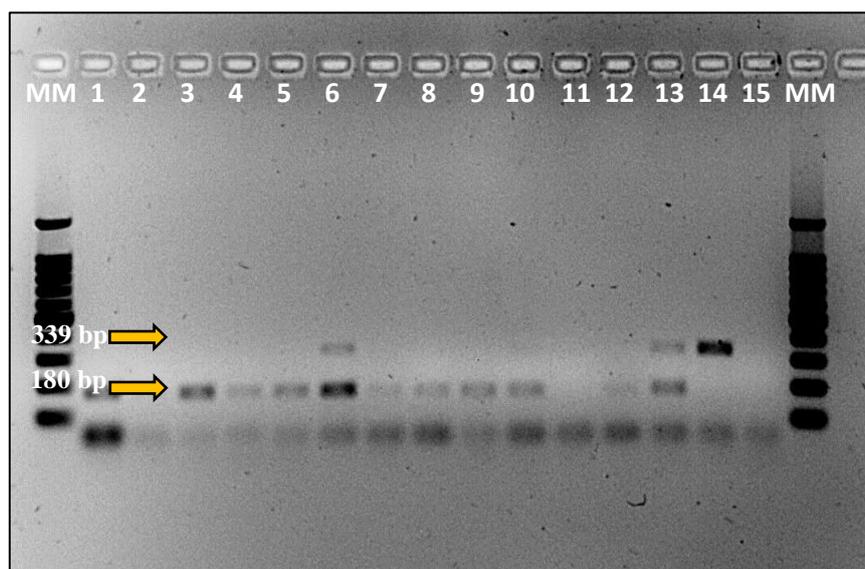


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, para la detección de CiLV-C usando los iniciadores MPF/MPR (339 pb); MM, marcador de peso molecular 1 kb; carriles 1, larvas 24 h (éste y los demás representan el tiempo del que dispusieron los ácaros para adquirir el virus); 2, ninfas 24 h; 3, hembras adultas 24 h; 4, larvas 48 h.; 5, ninfas 48 h; 6, hembras adultas 48 h; 7-9, larvas 24 h; 10-11, hembras adultas 24 h; 12, ácaros libres de virus; 13-14, positivo *B. yothersi* virulíferos; 15, blanco agua. MM (Gen ruler 100bp Plus Lader, Thermo Scientific).

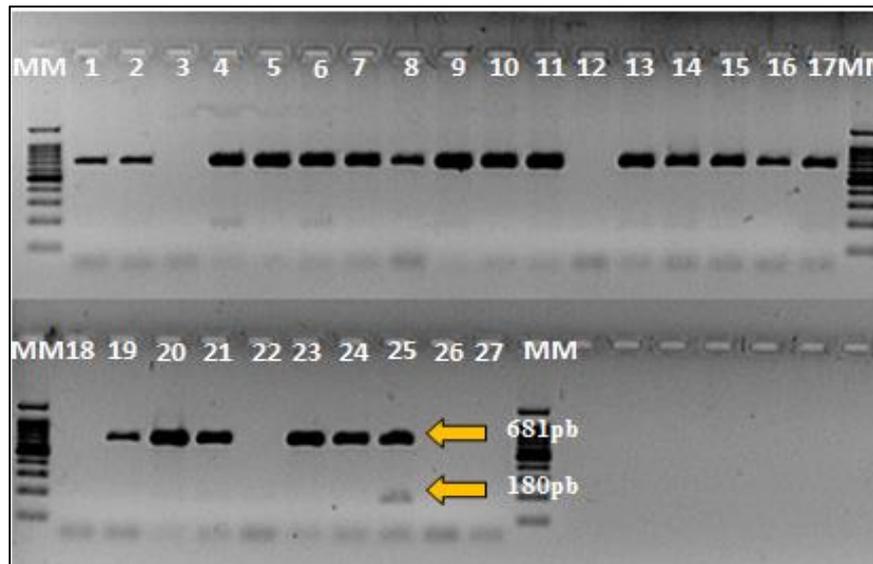


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, para la detección de OFV-citrus usando los iniciadores CiLV-N-NPF/CiLV-N-NPR (681 pb.); MM, marcador de peso molecular 1 kb; carriles 1-3, larvas 24 h (éste y los demás representan el tiempo del que dispusieron los ácaros para adquirir el virus); 4-6, ninfas 24 h.; 7-9, hembras adultas 24h; 10-12, larvas 48h; 13-15, ninfas 48 h; 16-17, hembras adultas 48 h.; 18-20, larvas 72 h; 21-23, ninfas 72 h; 24, hembras adultas 72 h.; 25, positivo (OFV-citrus); 26, ácaros libres de virus; 27, blanco agua. MM (Gen ruler 100bp Plus Lader, Thermo Scientific).

E. Pruebas de inoculación de CiLV-C y OFV-citrus

En plantas de *A. thaliana* y *P. vulgaris* que se inocularon con ninfas y hembras de la población aberrante de *B. californicus* alimentadas previamente sobre hojas de naranja agria infectadas con OFV-citrus, no se observaron síntomas de clorosis o necrosis, similares a los descritos por Kondo *et al.* (2003) y Ramos-González *et al.* (2017), 20 días después de la infestación. Estos resultados se confirmaron mediante una prueba de RT-PCR a dichas plantas (Figuras 16 y 17).

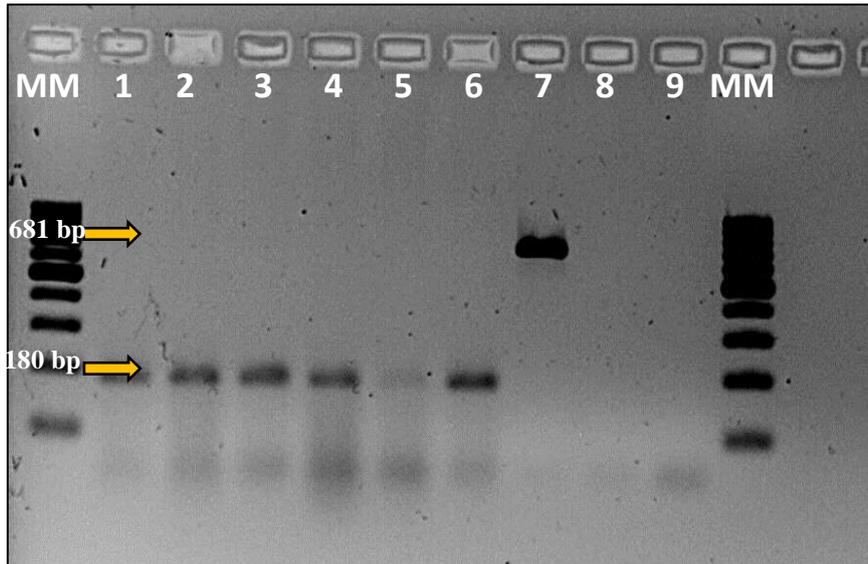


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, para la detección de OFV-citrus usando los iniciadores CiLV-N-NPF/CiLV-N-NPR (681 pb.); MM, marcador de peso molecular 1 kb; tejido vegetal de *Phaseolus vulgaris*; carriles 1-3, hembras adultas 48 h (éste y los demás representan el tiempo del que dispusieron los ácaros para adquirir el virus); 4-6, ninfas 48 h.; 7, positivo (OFV-citrus); 8, testigo sin ácaros; 9, blanco agua. MM (Gen ruler 100bp Plus Lader, Thermo Scientific).

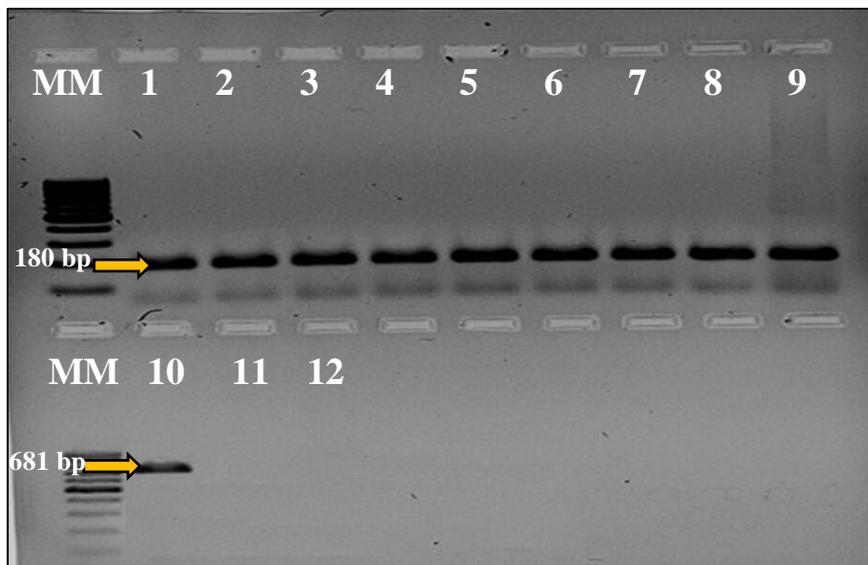


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, para la detección de OFV-citrus usando los iniciadores CiLV-N-NPF/CiLV-N-NPR (681 pb.); MM, marcador de peso molecular 1 kb; tejido vegetal de *Arabidopsis thaliana*; carriles 1-5, hembras adultas 48 h (éste y los demás representan el tiempo del que dispusieron los ácaros para adquirir el virus); 6-9, ninfas 48 h.; 10, positivo (OFV-citrus); 11, testigo sin ácaros; 12, blanco agua. MM (Gen ruler 100bp Plus Lader, Thermo Scientific).

De los ensayos realizados en campo para inoculación del CiLV-C, en ninguna de las evaluaciones (20, 42 y 84 días) y tratamientos utilizados se observó la presencia de sintomatología asociada a leprosis de los cítricos; dichos resultados se corroboraron con la prueba de RT-PCR (Figura 18). En las plantas ubicadas en Tolimán, Querétaro, donde se probó la inoculación de OFV-citrus, se observaron síntomas similares a leprosis desde la segunda evaluación (57 días después inoculación, DDI), en dos repeticiones del tratamiento de ninfas (Figura 19) y en una de las repeticiones de larvas (Figura 20). En una de las repeticiones de plantas infestadas por ninfas y adultos de *B. californicus* (Texcoco), previamente alimentados con hojas infectadas con OFV-cítricos, aparecieron síntomas de leprosis y se confirmaron que estaban infectadas por dicho virus, mediante RT-PCR (Figura 21).

En el material restante procesado mediante RT-PCR no se detectó al virus (Figura 21). A los 126 días después de la inoculación en las plantas de *C. sinensis* var. Valencia, las lesiones provocadas por la alimentación de los ácaros eran muy pequeñas, no se reconocieron visualmente como típicas de leprosis tipo nuclear y resultaron negativas a OFV-citrus por RT-PCR. Estas muestras fueron revisadas por medio de un microscopio estereoscópico, pero a los 126 días de la inoculación no se logró recuperar ácaros (ningún estado de desarrollo) de las hojas.

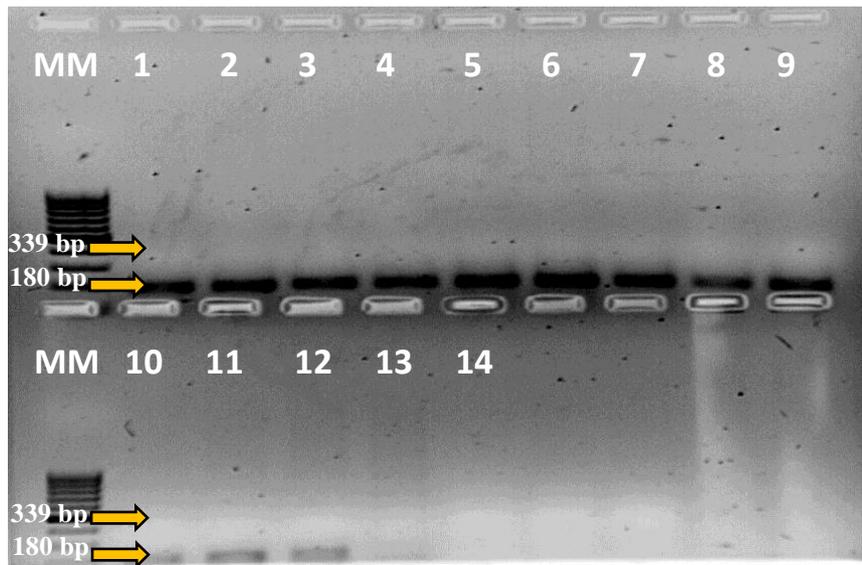


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, para la detección de CiLV-C en la población aberrante de *Brevipalpus californicus* [*Brevipalpus* sp. (Tetipac)] usando los iniciadores MPF/MPR (339 pb); MM, marcador de peso molecular 1 kb; carril 1, larvas R1; 2, larvas R2; 3, larvas R3; 4, larvas R4; 5, ninfas R1; 6, ninfas R2; 7, ninfas R3; 8, ninfas R4; 9, hembras adultas R1; 10, hembras adultas R2; 11, hembras adultas R3; 12, hembras adultas R4; 13, ácaros libres de virus; 14, blanco agua. MM (Gen ruler 100bp Plus Lader, Thermo Scientific).

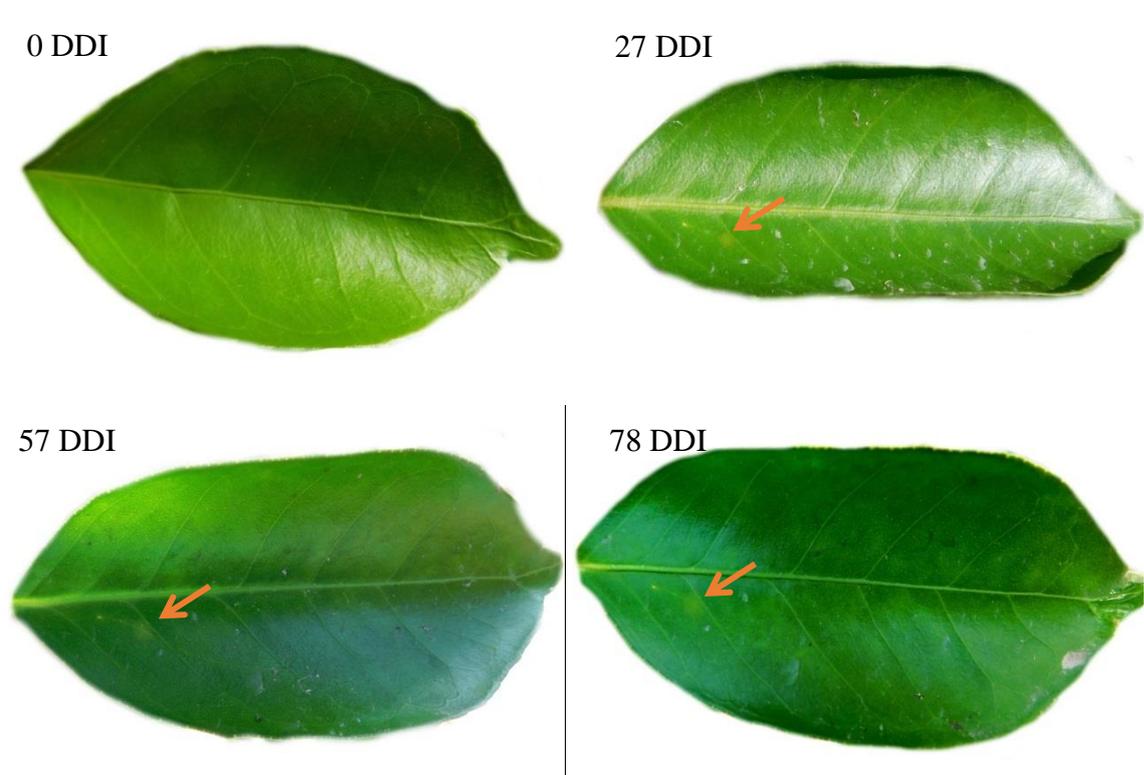


Figura 19. Hojas con síntomas típicos de leprosis tipo nuclear (OFV-citrus) para plantas inoculadas con ninfas en la población aberrante *B. californicus* [*Brevipalpus* sp. (Tetipac)], alimentadas durante cinco días en hojas con OFV-citrus. DDI= días después de inoculación.

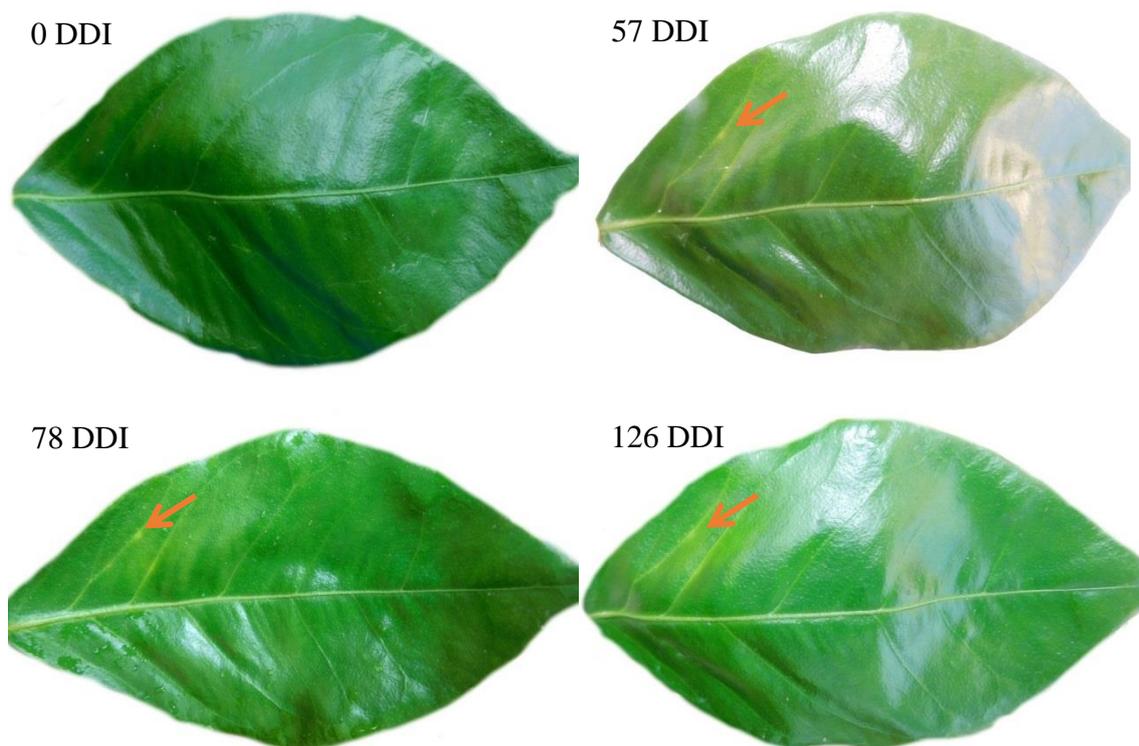


Figura 20. Hojas con síntomas típicos de leprosis tipo nuclear (OFV-citrus) para plantas inoculadas con larvas en la población aberrante *B. californicus* alimentadas durante 5 días en hojas con OFV-citrus. DDI= días después de inoculación.

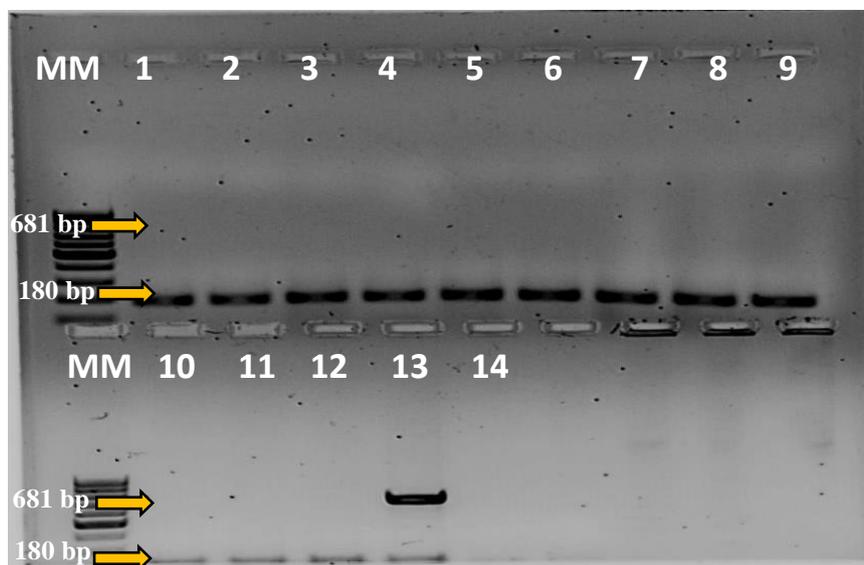


Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, para la detección de OFV-citrus usando los iniciadores CiLV-N-NPF/CiLV-N-NPR (681 pb.); MM, marcador de peso molecular 1 kb; carriles 1, larvas R1; 2, larvas R2; 3, larvas R3; 4, ninfas R1; 5, ninfas R2; 6, ninfas R3; 7, hembras adultas R1; 8, hembras adultas R2; 9, hembras adultas R3; 10, ácaros libres de virus; 11, testigo absoluto; 12, negativo; 13, positivo de OFV-citrus (*B. californicus*); 14, blanco agua. MM (Gen ruler 100bp Plus Lader, Thermo Scientific).

DISCUSIÓN

El comportamiento de la colonia de *Brevipalpus* sp. (Tetipac), luego reconocido como una población aberrante de *B. californicus*, fue estable durante todo el tiempo que se mantuvo su cría. Chiavegato (1986) observó un mejor desarrollo de *B. phoenicis* sobre frutos de naranja, donde pueden pasar de huevos a adultos en 14 días. Por otra parte, Chiavegato y Kharfan (1993) mencionan que los frutos de naranja favorecen el desarrollo adecuado de los ácaros y son un sustrato eficiente para su establecimiento. Estos resultados concuerdan con los del presente estudio donde se llegaron a tener hasta 500 ácaros por naranja utilizada.

En la determinación de la identidad de la especie de interés, ahora designada como una población aberrante *B. californicus*, se tomaron en cuenta en principio características morfológicas presentadas en claves taxonómicas, así como en descripciones originales y redescrpciones, cuando las primeras eran muy breves o incompletas. Por el número de solenidios en los tarsos de las patas II, entre otras características, los ejemplares en estudio corresponderían a *B. lewisi*; sin embargo, desde la descripción original de esta especie (McGregor, 1949) y varias redescrpciones (Baker, 1949; Meyer y Ryke, 1959), se resaltó que tiene ornamentaciones (areolas) en la parte centrolateral del propodosoma mucho más largas que anchas, carácter que no presentaban los ejemplares de la población aberrante *B. californicus*, en los que las areolas se semejaban más a las de *B. californicus*, donde son aproximadamente redondas o poligonales (Figura 6 A-D). Este hecho se confirmó cuando se midió el grado de redondez de dichas estructuras (Cuadro 1).

Pese a la larga historia del uso del número de solenidios en claves taxonómicas (Baker, 1949; Pritchard y Baker, 1958; Flat Mites of the World) y formación de grupos de especies con ese criterio (Meyer, 1979; Baker y Tuttle, 1987), varios autores, como de León (1961) y Baker y Tuttle (1964) han observado que este carácter es inestable; incluso algunos ejemplares pueden tener un solenidio en un tarso y dos en otro (Kitajima *et al.*, 2010; Navia *et al.*, 2013). Por ello, en este estudio se confrontaron los datos de morfometría con el análisis de fragmentos de secuencias genómicas, luego de lo cual los ácaros de interés resultaron coespecíficos con *B. californicus*, las cuales tuvieron 100% de similitud en un marcador del gen COI con ejemplares que tenían dos solenidios en los tarsos II (No. de acceso KX100319 y KX100321, Salinas-Vargas *et al.* 2016). De lo anterior resalta que pueden haber

identificaciones erróneas y que los datos de distribución, gama de hospedantes, etc., asignados a *B. lewisi* y *B. californicus*, deben revisarse o simplemente no son válidos.

Aunque el análisis univariado de las series tipo de *B. californicus* y *B. lewisi* consideró como entidades separadas, en el análisis multivariado no se reconocieron claramente grupos y ejemplares de ambas series tipo se agruparon con los ahora designados *B. californicus* (Texcoco) y la población aberrante *B. californicus* (Figuras 8 y 10). Los ejemplares 51 [*B. lewisi* (tipo)] y 56 [*B. californicus* (tipo)] se apartaron por sus dimensiones, uno por ser particularmente grande y otro por ser muy pequeño (Figura 8). Se observó variación en ambas series tipo y al parecer en ambas hay heterogeneidad, con la presencia de morfotipos que ameritan una cuidadosa revisión. Colectar ácaros de ambas especies en su localidad típica y la designación de neotipos puede ser una tarea de gran ayuda para definir la posición taxonómica de *B. californicus* y *B. lewisi*.

Lamentablemente no se cuenta con muestras de ADN que pudieran servir para confrontar datos morfológicos con moleculares en las dos series tipo estudiadas. Con la colecta de nuevos ejemplares en la localidad típica ese problema podría resolverse. Sin embargo, debe destacarse que *B. lewisi* parece mucho más cercana a especies ubicadas en el grupo *californicus* que a otras del grupo *cuneatus* (según la clasificación de Baker y Tuttle, 1987).

Al revisar ejemplares de especies del grupo *cuneatus* depositados en el Systematic Entomology Laboratory, Beltsville Agricultural Research Station, así como las ilustraciones de Baker y Tuttle (1987), puede verse que la mayor parte de las especies ubicadas en el grupo *cuneatus* tienen ornamentaciones tipo “rugulose-lacunose”, al menos en parte del dorso, mientras que en *B. californicus* y *B. lewisi* son de tipo “areolate” (Harris, 1979). Asimismo, las espermatecas de la población aberrante de *B. californicus*, (Texcoco) y (tipo), así como las de *B. lewisi* (tipo) son todas similares (Figura 7 A-D), lo que sugiere mayor cercanía taxonómica. En lo anterior coinciden Welbourn *et al.* (2003) y Hao *et al.* (2016), quienes observaron que la quetotaxia de las patas de *B. lewisi* es prácticamente idéntica a la de *B. californicus*, donde la única diferencia apreciable es el número de solenidios en los tarsos II.

La presencia de diferentes patrones en las microplacas que cubren el cuerpo de los tenuipálpidos puede convertirse en un carácter útil para la separación de especies (Beard *et*

al., 2015), caso que no sucedió en este estudio, dado que las microplacas de la población aberrante de *B. californicus* y *B. californicus* (Texcoco) fueron prácticamente iguales. No obstante, este criterio es nuevo y requiere de equipo que posea gran aumento para adecuada observación; por ejemplo, microscopia de electrónica de barrido (SEM), la cual puede no ser accesible para todos los investigadores.

En el manejo y prevención de plagas se debe identificar con total certeza la especie con la que se trabaja, más en el caso del género *Brevipalpus*, dada la presencia de diferentes especies crípticas (Childers y Rodrigues, 2011; Navia *et al.*, 2013; Beard *et al.*, 2015). Cada especie de ácaros puede presentar distintas adaptaciones a condiciones climáticas, hospederos y enemigos naturales (Navia *et al.*, 2013); por ello la identificación correcta de los especímenes es vital.

Por lo anterior es fundamental contrastar el análisis morfológico con el molecular para definir la identidad de especies. Navia *et al.* (2013) hacen referencia a la importancia de la combinación de ambas técnicas de identificación, en el caso de *Brevipalpus*, para revelar la aparición de especies crípticas y evitar incongruencias en la identidad de las mismas. Consecuentemente, en el presente estudio se ubicó a la población aberrante de *B. californicus* en el grupo *californicus* y no en *cuneatus*, si sólo se hubieran usado las claves taxonómicas.

Las variaciones morfológicas podrían deberse al proceso de reproducción del grupo, dado que en *Brevipalpus* la partenogénesis es telitoquia (Weeks *et al.*, 2001), donde la bacteria simbiote *Cardinium* es la responsable de producir la feminización de los huevos sin fertilizar (Kitajima *et al.* 2007). Este simbiote podría estar provocando cierta hibridación en los ácaros (Navia *et al.*, 2013), caso similar por el que pasan los biotipos de moscas blancas (Thierry *et al.*, 2011), con lo que estarían dando cambios fenotípicos y de adaptación para el *B. californicus* aberrante en comparación a las demás especies del grupo.

En esta investigación, se realizó el reporte donde la población aberrante de *B. californicus* posee la capacidad de adquirir el CiLV-C y el OFV-citrus, con mucha más eficiencia para este último. García-Escamilla *et al.* (2017) comprobaron la capacidad de *B. yothersi* para adquirir CiLV-C por *B. yothersi* y de *B. californicus* para adquirir OFV-citrus por *B. californicus*, pero ninguna de estas dos especies fue capaz de adquirir ambos virus de forma conjunta. En contraste, *B. papayensis* sí posee la capacidad de adquirir dos distintos virus,

CiLV-C y CoRSV (*Coffee ringspot virus*) (Nunes et al., 2018); estos datos comprueban la habilidad que poseen los ácaros de este género de ser vectores de varios virus de plantas, como sucedió en la presente investigación.

Arabidopsis thaliana es una especie muy utilizada para observar las interacciones planta-patógeno, por mostrar síntomas de infección viral en pocos días, aunque éstos no necesariamente son iguales a los que se presentan en los hospedantes originales (Nishimura & Dangl, 2010). Por ejemplo, Arena *et al.* (2016) tuvieron éxito en la transmisión de CoRSV y CICSV (*Clerodendrum chlorotic spot virus*) (posibles miembros del género *Dichorhavirus*), por *B. yothersi* a *A. thaliana*. Similarmente, Ramos-González *et al.* (2017) demostraron la capacidad de *B. phoenicis* sensu stricto de transmitir CiLV-N a *A. thaliana*. Estos resultados contrastan con los obtenidos en la presente investigación, dado que no se presentaron síntomas visibles en *A. thaliana* luego de 25 días de alimentación con la población aberrante de *B. californicus* putativamente infectados con OFV-citrus.

El frijol también ha mostrado su utilidad como planta indicadora de virus, específicamente causantes de leprosis. Garita *et al.* (2014) tuvieron éxito en la transmisión de CiLV-C a frijol por medio de *B. yothersi*, mientras que Kondo *et al.* (2003) transmitieron el OFV de orquídeas a frijol por *B. californicus*. En contraste, cuando se utilizó esta planta indicadora para probar la transmisión del OFV-citrus por ninfas, larvas y hembras adultas de la población aberrante de *B. californicus*, no se presentaron síntomas ni se detectó al virus por RT-PCR en ningún caso.

En las pruebas de inoculación de OFV-citrus a naranja dulce, se observaron síntomas parecidos a los de leprosis a partir de los 27 y hasta los 128 días posteriores a la alimentación de los ácaros infectados (OFV-citrus) consistentes en lesiones muy pequeñas que fueron progresando en el tiempo. Estas lesiones se debían observar con detenimiento dado que eran pequeñas. De acuerdo con Duran-Trujillo (2017), en el caso de naranja dulce las lesiones de tipo nuclear en estados tempranos son casi imperceptibles, pero mantienen bordes con un halo verduzco hasta que a los ocho meses se pueden observar con claridad estas lesiones en *Citrus sinensis* var. Valencia. Sin embargo, en la presente investigación, 126 días después de la infestación con la población aberrante de *B. californicus* potencialmente virulíferos, las muestras con síntomas que se procesaron por RT-PCR resultaron negativas.

En la prueba de inoculación del CiLV-C llevada a cabo en Cárdenas, Tabasco, no se desarrollaron síntomas de leprosis y todas las muestras de tejido asintomático analizadas por RT-PCR resultaron negativas. Este fue un resultado esperado porque en las pruebas de adquisición del CiLV-C por parte de la población aberrante de *B. californicus* sólo se encontraron dos casos positivos en 180 repeticiones, lo que sugiere una baja, casi nula, capacidad para adquirir el virus, o un proceso enzimático de degradación del virus, que no permite su detección por RT-PCR. En este resultado se coincide con García-Escamilla *et al.* (2017), quienes observaron transmisión del CiLV-C sólo por *B. yothersi*.

Los ejemplares de *B. californicus* usados por García-Escamilla *et al.* (2017) con los que se demostró la capacidad de esta especie para adquirir e inocular el OFV-citrus fueron tomados de la misma colonia uniparental que se usó en el presente estudio y que aquí se denominaron *B. californicus* (Texcoco). Por la cercanía taxonómica de estos ácaros con la población aberrante de *B. californicus*, se esperaba que esta especie tuviera un comportamiento similar; de hecho, lo tuvo en parte, ya que fue capaz de adquirir OFV-citrus. Ali *et al.* (2017) mostraron que individuos de *Brevipalpus oncidii* colectados en campo de plantas infectadas con OFV portaban dicho virus, pero una vez que se dejó a estos ácaros incubando sin alimentarse por 48 horas, el OFV ya no era detectable por RT-PCR. Lo anterior fue similar a lo observado en esta investigación, donde la población aberrante de *B. californicus* pudo adquirir OFV-citrus pero no inocularlo a plantas sanas y tampoco fue detectado por RT-PCR. Lo anterior sugiere que puede haber acción enzimática contra el virus en las membranas del intestino o en glándulas salivales que no permite la correcta transferencia del patógeno a tejido susceptible (Kondo *et al.*, 2017).

Dado que en el epitelio del intestino medio de *B. californicus* se genera un sincitio consistente en células polinucleares debido a la infección con *Dichorhavirus* (OFV, CiLV-N, CICSV y CoRSV)(Kitajima *et al.*, 2003; Kondo *et al.*, 2003; Dietzgen *et al.*, 2018) y que las larvas poseen la capacidad de tener en su cuerpo a las partículas virales hasta su etapa adulta, el modo de transmisión se considera persistente, circulativo y replicativo (Dietzgen *et al.*, 2018). Este hecho refuerza la idea de que la población aberrante de *B. californicus* no es un vector eficiente de OFV-citrus, a pesar de ser una especie emparentada con *B. californicus*. Sin embargo, es necesario realizar mayor cantidad de estudios para corroborar y entender los mecanismos que no le permiten ser vector de este virus.

Por todo lo anteriormente expuesto, se postula que la población aberrante de *B. californicus*, aunque morfológica y molecularmente es muy cercano a las poblaciones de *B. californicus* que portan dos solenidios en los tarsos II, es un biotipo incapaz de transmitir el OFV-citrus, o su eficiencia es tan baja que no pudo ser comprobada con los métodos empleados.

CONCLUSIONES

- Se identificó a *Brevipalpus* sp. (Tetipac) como una población aberrante de *B. californicus* por medio de características morfométricas y moleculares, que puede identificarse erróneamente si se usa la clasificación tradicional empleada para el género *Brevipalpus*.
- La población aberrante de *B. californicus* adquiere con facilidad el OFV-citrus después de 24 horas (82 de 90 casos) de alimentarse en tejidos con síntomas de la enfermedad; en contraste, puede adquirir el CiLV-C pero en una baja proporción (2 de 90 casos).
- La población aberrante de *B. californicus* no puede inocular el CiLV-C o el OFV-citrus en plantas indicadoras (*A. thaliana* y *P. vulgaris*) ni en plantas de *C. sinensis* var. Valencia.
- La población aberrante de *B. californicus* no puede ser vector de la leprosis de los cítricos tipo citoplasmático (CiLV-C) y nuclear (OFV-citrus) en *Citrus sinensis* var. Valencia.
- Para la correcta identificación de las diferentes especies de *Brevipalpus* es necesaria la utilización de características morfométricas y moleculares.

LITERATURA CITADA

- Ali, R.; Davies, J.; Wilson, A.; Wilson, C. 2016. *Brevipalpus oncidii*, a new record for Australia is not a vector of *Orchid fleck virus*. International Journal of Acarology, DOI: 10.1080/01647954.2016.1232310.
- Arena, G.; Ramos-González, P.; Nunes, M.; Ribeiro-Alves, M.; Camargo, L.; Kitajima, E.; Machado, M.; Freitas-Astúa, J. 2016. *Citrus leprosis virus C* infection results in hypersensitive-like response, suppression of the JA/ET plant defense pathway and promotion of the colonization of its mite vector. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1-17. doi: 10.3389/fpls.2016.01757.
- Baker, E. & Tuttle, D. 1964. The false spider mites of Arizona (Acarina: Tenuipalpidae). Technical Bulletin 163 Agricultural Experimental Station, University of Arizona, Tucson: 80 pp.
- Baker, E. & Tuttle, D. 1987. The False Spider Mites of Mexico. United States Department of Agriculture, Technical Bulletin No. 1706, 137 pp.
- Baker, E. 1949. The genus *Brevipalpus* (Acarina: Pseudoleptidae). *American Midland Naturalist*, 42 (2): 350-402.
- Bastianel, M.; Novelli, V.; Kitajima, E.; Kubo, K.; Bassanezi, R.; Machado, M.; Freitas, J. 2010. Citrus leprosis: centennial of an unusual mite virus pathosystem. *Plant Disease*, 94 (3): 284-292.
- Beard, J.; Ochoa, R.; Braswell, W.; Bauchan, G. 2015. *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) species complex (Acari: Tenuipalpidae)—a closer look. *Zootaxa*, 3944 (1): 001-067. doi: 10.11646/zootaxa.3944.1.1.
- Bickford, D.; Lohman, D.; Sodhi, N.; K.L.Ng, P.; Meier, R.; Winker, K.; Ingram, K.; Das, I. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 22 (3): 148-155. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.11.004>.
- Chiavegato, L. & Kharfan, P. 1993. Comportamento do ácaro da leprose *Brevipalpus phoenicis* (G.) (Acari: Tenuipalpidae) em citros. *An. Soc. Entomol. Brasil*, 22 (2): 355-359.
- Chiavegato, L. 1986. Biologia do ácaro *Brevipalpus phoenicis* em citros. *Pesq. Agropec. Brasil*, 21 (8): 813-816.
- Childers, C. & Rodrigues, J. 2011. An overview of *Brevipalpus* mites (Acari: Tenuipalpidae) and the plant viruses they transmit. *Zoosymposia*, 6: 180-192. <dx.doi.org/10.11646/zoosymposia.6.1.28>.

- Childers, C.; Rodrigues, J.; Grafton-Cardwell, E.; Morse, J. 2013. Final Research Report: Part II – *Brevipalpus* mites in California citrus. Citrograph. 52-58 pp.
- Darriba, D.; Taboada, G.; Doallo, R.; Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nat Methods, 9 (8): 772. Doi: 10.1038/nmeth.2109.
- De Leon D. 1961. The genus *Brevipalpus* in Mexico, Part II (Acarina: Tenuipalpidae). The Florida Entomologist, 44(1): 41-52.
- Dietzgen, R.; Freitas-Astúa, J.; Chabi-Jesus, C.; Ramos-González, P.; Goodin, M.; Kondo, H.; Tassi, A.; Kitajima, E.W. 2018. Dichorhavirus in their host plants and mite vectors. Advances in Virus Research, 102: 119-148. doi.org/10.1016/bs.aivir.2018.06.001.
- Domínguez, F. S.; Bernal, A.; Childers, C. C.; Kitajima, E. W. 2001. First report of *Citrus leprosis* on Panamá. Plant Disease, 85: 228. doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.2.228A.
- Duran-Trujillo, Y. 2017. Presencia de leprosis de tipo citoplasmático y nuclear en México a lo largo de gradientes altitudinales y su caracterización morfológica en cítricos susceptibles. Tesis doctoral, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Edo. de México. 68 pp.
- Folmer, O.; Black, M.; Hoeh, W.; Lutz, R.; Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular Marine Biology and Biotechnology 3(5):294-9.
- Franco, C.; Casarin, N.; Domínguez, F.; Otomo, 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. dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2007000400015.
- García-Escamilla, P.; Duran-Trujillo, Y.; Otero-Colina, G.; Valdovinos-Ponce, G.; Santillán-Galicia, M.; Ortiz-García, C.; Velázquez-Monreal, J.; Sánchez-Soto, S. 2017. Transmission of viruses associated with cytoplasmic and nuclear leprosis symptoms by *Brevipalpus yothersi* and *B. californicus*. Tropical Plant Pathology, 1-9. doi.org/10.1007/s40858-017-0195-8.
- Garita, L.; Tassi, A.; Calegario, R.; Freitas-Astúa, J.; Salaroli, R.; Romão, G.; Kitajima, E. W. 2014. Experimental host range of Citrus leprosis virus C (CiLV-C). Tropical Plant Pathology, 39 (1): 43-55.
- Hao, D. J.; Su, P.; Pfammatter, J.; Liu, Q.; Qi Fan, B.; Wang, Y.; Zi Gu, T. 2015. Morphological and genetic characteristics of *Brevipalpus lewisi* (Acari:

- Tenuipalpidae) and comparison with other three *Brevipalpus* species. International Journal of Acarology, 42 (1): 34-40. doi.org/10.1080/01647954.2015.1114022.
- Harris, R.A. 1979. A glossary of surface sculpturing. Occasional Papers in Entomology No. 28, California Department of Food and Agriculture, Bureau of Entomology. 32 pp.
- Hartung, J.; Roy, A.; Fu, S.; Shao, J.; Schneider, W. L.; Brlansky, R. H. 2015. History and diversity of *Citrus leprosis virus* recorded in herbarium specimens. Phytopathology, 105: 1277.1284. doi: 10.1094/PHYTO-03-15-0064-R.
- Izquierdo, I.; Zermeño, L.; Méndez, W.; Otero-Colina, G.; Freítas, J.; Locali, E.; De Moraes, G.; Calegario, R.; Tassi, A.; Kitajima, E. 2011. Confirmation of the presence of the *Citrus leprosis virus* C (CiLV-C) in Southern Mexico. Tropical Plant Pathology, 36 (6): 400-403. dx.doi.org/10.1590/S1982-56762011000600009
- Kerns, D.; Wright, G.; Loghry, J. 2011. Citrus arthropod pest management in Arizona: citrus flat mite (*Brevipalpus lewisi*). The University of Arizona. (En línea). Consultado el 16 de setiembre del 2018. Disponible en <http://cals.arizona.edu/crops/citrus/insects/citrusinsect.html>.
- Kimura, M. 1981. Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences. Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A, 78: 454–458.
- Kitajima, E. W.; Chagas, C. M.; Rodrigues, J. C. V. 2003. *Brevipalpus*-transmitted plant virus and virus-like diseases: cytopathology and some recent cases. Experimental and Applied Acarology, 30: 135–160.
- Kitajima, E. W.; Rodrigues, J. C.; Freitas-Astúa, J. 2010. An annotated list of ornamentals naturally found infected by *Brevipalpus* mite-transmitted viruses. Scientia Agricola, 67, 348–371.
- Kitajima, E. W.; Groot, T. V.; Novelli, V. M.; Freitas-Astua, J.; Alberti, G.; de Moraes, G. J. 2007. In situ observation of the *Cardinium* symbionts of *Brevipalpus* (Acari: Tenuipalpidae) by electron microscopy. Experimental and Applied Acarology, 42: 263–271.
- Klimov, P. & OConnor, B. M. 2008. Origin and higher-level relationships of psoroptidian mites (Acari: Astigmata: Psoroptidia): Evidence from three nuclear genes. Molecular Phylogenetics and Evolution, 47: 1135-1156. doi:10.1016/j.ympev.2007.12.025.
- Kondo, H.; Maeda, T.; Tamada, T. 2003. Orchid Fleck Virus: *Brevipalpus californicus* mite transmission, biological properties and genome structure. Experimental and Applied Acarology, 30 (1-2): 215-223.

- Krantz, G.; Walter, D. 2009. A Manual of Acarology. Third Edition. Texas Tech University Press; Lubbock, Texas, 807 pp
- Locali, E.; Freitas-Astua, J.; Alves de Souza, A.; Aurélio, M.; Astua-Monge, G.; Antonioli, R.; Kitajima, E.; Machado, M. 2003. Development of a molecular tool for the diagnosis of leprosis, a major threat to citrus production in the Americas. *Plant Disease*, 87(11): 1317-1321.
- McGregor, E.A. 1949. Nearctic mites of the family Pseudoleptidae. *Memoirs of the Southern California Academy of Sciences*, 111(2): 1-45.
- Mesa, N.; Ochoa, R.; Welbourn, W.; Evans, G.; De Moraes, G. 2009. A catalog of the Tenuipalpidae (Acari) of the World with a key to genera. *Zootaxa*, 2098: 1-185.
- Meyer, M.K.P.S. The Tenuipalpidae (Acari) of Africa with keys to the world fauna. Entomology Memoir Department of Agricultural Technical Services Republic of South Africa No. 50: 135 pp.
- Meyer, M.K.P. & Ryke, P. 1959. A revision of the spider mites (Acarina: Tetranychidae) of South Africa, with descriptions of a new genus and new species. *Journal of the Entomological Society of Southern Africa*, 22: 330-366.
- NAPPO. 2014. Informe de plaga: Leprosis de los cítricos. (En línea). Consultado el 16 de setiembre del 2018. Disponible en: http://nappo.org/index.php/download_file/view/91/261/.
- Navajas, M.; Gutiérrez, J.; Lagnel, J.; Boursot, P. 1996. 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: 407-417. doi.org/10.1017/S0007485300034994.
- Navia, D.; Mendonça, R.; Ferragut, F.; Miranda, L.; Trincado, R.; Michaux, J.; Navajas, M. 2013. Cryptic diversity in *Brevipalpus* mites (Tenuipalpidae). *Zoologica Scripta*, 42 (1): 406-426. doi.org/10.1111/zsc.12013.
- Nishimura, M. T. & Dangl, J. L. 2010. Arabidopsis and the plant immune system. *The Plant Journal*, 61: 1053-1066. doi 10.1111/j.1365-313X.2010.04131.x.
- Nunes, M. A.; de Carvalho-Mineiro, J. L.; Rogerio, L. A.; Ferreira, L. M.; Tassi, A.; Novelli, V. M.; Kitajima, E. W.; Freitas-Astúa, J. 2018. First report of *Brevipalpus papayensis* as vector of *Coffee ringspot virus* and *Citrus leprosis virus C*. *Plant disease*, 102 (5): 1046. doi.org/10.1094/PDIS-07-17-1000-PDN.
- Ochoa, R.; Aguilar, H.; Vargas, C. 1991. Ácaros fitófagos de América Central: una guía ilustrada. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 251 p.

- Ochoa, R.; Beard, J.; Welbourn, C.; Hammond, J.; Otero-Colina, G.; Pooley, C.; Bauchan, G. 2016b. Estudiando la diversidad de Acari por medio del microscopio criogénico. Proceedings II Congreso Latinoamericano de Acarología - IICLAc. Vol. 1. Sociedad Latinoamericana de Acarología, Montenegro, Quindío, Colombia, 27 a 31 de mayo de 2016. 2 p.
- Ochoa, R.; Otero-Colina, G.; Beard, J.; Mineiro, J.; Kitajima, E.; Regonat, M.; Navia, D.; Rodrigues, J.; Bauchan, G. 2016a. Avances sobre ácaros *Brevipalpus* asociados a los cítricos en las Américas. Proceedings II Congreso Latinoamericano de Acarología - IICLAc. Vol. 1. Sociedad Latinoamericana de Acarología, Montenegro, Quindío, Colombia, 27 a 31 de mayo de 2016. 97 p.
- Oliveira, Í. C. 2014. Sistemática molecular para ácaros planos do gênero *Brevipalpus* Donnadieu (Acari: Tenuipalpidae): utilização de marcadores moleculares mitocondriais e nucleares. Dissertação (mestrado)-Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Zoologia. 107 pp. Recuperado 2019-01-30, de <http://repositorio.unb.br/handle/10482/17778>.
- Park, J. & Foighil, D. 2000. Sphaeriid and Corbiculid clams represent separate heterodont bivalve radiations into freshwater environments. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 14 (1): 75-88. Doi: <https://doi.org/10.1006/mpev.1999.0691>.
- Pritchard, A. E. & E.W. Baker. 1958. The false spider mites (Acarina: Tenuipalpidae). *University of California Publications in Entomology*, 14(3): 175-274.
- Ramos-González, P.L.; Chabi-Jesus, C.; Guerra-Peraza O.; Tassi, A.D.; Kitajima, E.W.; Harakava, R.; Salaroli, R.B.; Freitas-Astúa, J. 2017. Citrus leprosis virus N: A New Dichorhavirus Causing Citrus Leprosis Disease. *Phytopathology* doi: 10.1094/PHYTO-02-17-0042-R.
- Rodrigues, C. & Childers, C. 2013. *Brevipalpus* mites (Acari: Tenuipalpidae): vectors of invasive, non-systemic cytoplasmic and nuclear viruses in plants. *Experimental and Applied Acarology*, 59 (1): 165-175. doi: 10.1007/s10493-012-9632-z.
- Rodrigues, J. C.; Gallo-Meagher, M.; Ochoa, R.; Childers, C.C.; Adams, B.J. 2004. Mitochondrial DNA and RAPD polymorphisms in the haploid mite *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae). *Experimental Applied Acarology*, 34 (3-4): 275-290.
- Roy, A.; Hartung, J.S.; Schneider, W.; Shao, J.; León, G.; Melzer, M.J.; Beard, J.J.; Otero-Colina, G.; Bauchan, G.R.; Ochoa, R.; Brlansky, R.H. 2015a. Role bending: complex

- relationship between viruses, hosts and vectors related to citrus leprosis, an emerging disease. *Phytopathology*, 105, 1013–1025.
- Roy, A.; Stone, A.; Shao, J.; Otero-Colina, G.; Wei, G.; Choudhary, N.; Achor, D.; Levy, L.; Nakhla, M.; Hartung, J.; Schneider, W.; Brlansky, R. 2015b. Identification and molecular characterization of nuclear *Citrus leprosis virus*, a member of the proposed *Dichorhavirus* genus infecting multiple *Citrus* species in Mexico. *Phytopathology*, 105: 564-575. doi: 10.1094/PHYTO-09-14-0245-R.
- Saccaggi, D.L.; Ueckermann, E.A.; du Toit, I.; Ngubane-Ndhlovu, N.P. 2017. First records of *Brevipalpus lewisi* McGregor (Acari: Trombidiformes: Tenuipalpidae) in South Africa, with notes on distribution and field ecology. *African Entomology* 25 (2): 523-528. DOI: 10.4001/003.025.0523.
- Salinas-Vargas, D.; Santillan-Galicia, M. T.; Guzman-Franco, A. W.; Hernández-López, A., Ortega-Arenas, L. D.; Mora-Aguilera, G. 2016. Analysis of genetic variation in *Brevipalpus yothersi* (Acari: Tenuipalpidae) populations from four species of *Citrus* host plants. *Journal Plos One*, 11 (10), E0164552.
- SAS Institute Inc. 2018. SAS/STAT® 15.1 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- SENASICA. 2013. Leprosis de los cítricos: *Citrus leprosis virus* C. Ficha técnica N° 35. 27 pp.
- SENASICA. 2016. Manual operativo de la campaña contra la leprosis de los cítricos (CiLV). Dirección de Protección Fitosanitaria. Versión 1. 1-20 pp. Disponibles desde https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/176138/Manual_de_la_campa_a_Leprosis_CiLV.pdf.
- Tamura, K. & Nei, M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10: 512–526.
- Tamura, K.; Dudley, J; Nei, M.; Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596-1599.
- Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipinski, A.; Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30 (12): 2725–2729.
- Tassi, A. D. 2018. Diversidade morfológica e genética de diferentes espécies de *Brevipalpus* (Acari: Tenuipalpidae) e suas competências como vetores de vírus. Tesis Doctoral, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidad de São Paulo,

- Piracicaba. doi:10.11606/T.11.2018.tde-17072018-160552. Recuperado 2019-01-30, de www.teses.usp.br.
- Tassi, A.; Garita-Salazar, L.; Amorim, L.; Novelli, V.; Freitas-Astúa, J.; Childers, C.; Kitajima, E.W. 2017. Virus-vector relationship in the Citrus leprosis pathosystem. *Experimental Applied Acarology*, 71 (3): 227-241.
- Thierry, M.; Becker, N.; Hajri, A.; Reynaud, B.; Lett, J.; Delatte, H. 2011. Symbiont diversity and non-random hybridization among indigenous (Ms) and invasive (B) biotypes of *Bemisia tabaci*. *Molecular Ecology*, 20: 2172-2187. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05087.x>.
- Van Leeuwen, T.; Vanholme, B.; Van Pottelberge, S.; Van Nieuwenhuyse, P.; Nauen, R.; Tirry, L.; Denholm, I. 2008. Mitochondrial heteroplasmy and the evolution of insecticide resistance: non-Mendelian inheritance in action. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 105 (16): 5980-5985.
- Weeks, A. R.; Marec, F.; Breeuwer, J. 2001. A mite species that consists entirely of haploid females. *Science*, 292: 2479-2482. DOI: 10.1126/science.1060411.
- Welbourn, W.; Ochoa, R.; Kane, E.; Erbe, E. 2003. Morphological observations on *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) including comparisons with *B. californicus* and *B. obovatus*. *Experimental Applied Acarology*, 30 (1-3): 107-33.