

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



ESTUDIO DE LAS VARIANTES GENÉTICAS DE *Diaphorina citri*, VECTOR DE
Candidatus Liberibacter spp. EN CÍTRICOS

Tesis

Que presenta Augusto Gil Ceballos Ceballos
como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

Saltillo, Coahuila

Mayo 2021

**ESTUDIO DE LAS VARIANTES GENÉTICAS DE *Diaphorina citri*, VECTOR DE
Candidatus Liberibacter spp. EN CÍTRICOS**

TESIS

Elaborada por AUGUSTO GIL CEBALLOS CEBALLOS como requisito parcial para
obtener el grado de Maestro en Ciencias en Parasitología Agrícola con la
supervisión y aprobación del Comité de Asesoría

Dr. Ernesto Cerna Chávez
Asesor principal

Dra. Yisa María Ochoa Fuentes
Asesor

Dr. Agustín Hernández Juárez
Asesor

Dr. Mariano Flores Dávila
Asesor

Dr. Marcelino Cabrera de la Fuente
Subdirección de Posgrado
UAAAN

ÍNDICE

RESUMEN	vii
ABSTRACT	ix
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
Justificación	9
Hipótesis	9
Objetivo general	9
Objetivos específicos	9
MATERIALES Y MÉTODOS	10
Sitios y material de colecta	10
Extracción de ADN del Psílido	12
Extracción ADN vegetal	12
Detección de <i>Ca. Liberibacter asiático</i>	12
Detección de <i>Ca. Liberibacter americano</i>	12
Identificación de haplotipos	13
Secuenciación de haplotipos	13
Comparación de haplotipos	13
RESULTADOS	14
Extracción de ADN Psílido	14
Extracción ADN vegetal	14
Identificación de Haplotipos de <i>D. citri</i>	16
DISCUSIÓN	19
CONCLUSIÓN	22
REFERENCIAS	23

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Extracción ADN psílido. Pozos: 1-5 Misantla, Ver., 6-15 Cd. Mante, Tamps., 16-25 Montemorelos, N. L.	14
Figura 2. Extracción ADN vegetal. Pozos: 1-5 Acatlán de Pérez, Oax., 6-10 Huejutla, Hgo.	14
Figura 3. Amplificación de <i>Ca. Liberibacter asiático</i> en psílicos mediante los iniciadores BK-DY2F y BK-DY2R. Pozos: 1 y 15: marcador de peso molecular. Pozos 1-5: Misantla, Ver., 6-10 Montemorelos, N. L., 11-14, 16 y 17 Cd Mante, Tamps., 18 control positivo.	14
Figura 4. Amplificación mediante primer BK-DY1F y BK-DY1R de <i>Ca. Liberibacter americano</i> en psílicos. Pozos: 1, 10 y 11: marcador molecular., 2-9: muestras de Montemorelos, N. L., 12 control positivo.	15
Figura 5. Amplificación de <i>Ca. Liberibacter americano</i> en plantas de cítricos mediante los iniciadores BK-DY1F y BK-DY1R. Pozos: 1, 10, 11 y 20: marcador molecular., 2-5: Hidalgo., 6-9 y 12-15: Cd. Mante; y 18 control positivo.	15
Figura 6. Amplificación mediante DCITRI COI-L y DCITRI COI-R para haplotipos de <i>Diaphorina citri</i> . Pozos: 1. Marcador de peso molecular., 2. Cd. Mante, Tamps., 3-6 Misantla, Ver., 7. Huejutla, Hgo., 8, 9, 10 y 11 Acatlán de Pérez, Oax.	16
Figura 7. Mapa de distribución de haplotipos. 1 Montemorelos, N. L., 2 Ciudad Mante, Tamps., 3 Tantoyuca, Ver., 4 Huejutla, Hgo., 5 Misantla, Ver., 6 Tecomán, Col., 7 Acatlán de Pérez, Oax.	18

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Claves de individuos por sitios de muestreo..... 11

Tabla 2. Diferentes haplotipos identificados, muestras, sitios de colecta diferencia entre nucleótidos..... 17

AGRADECIMIENTOS

Doy gracias a **mi familia** que siempre me ha apoyado en las buenas y las malas, son parte fundamental de mi crecimiento, mi esposa e hija que son el motivo de seguir día a día.

A **mi mamá** que siempre ha creído en mí y siempre me ha ayudado en todo. Gracias por todo mamá.

Al **Doctor Ernesto Cerna** por su apoyo, a la **Dra. Yisa** por siempre estar pendiente de los alumnos, gracias por todas sus atenciones.

Un especial agradecimiento a la **Dra. Yolanda** por sus enseñanzas, por su paciencia y por compartir sus conocimientos en todo momento. Muchas gracias doctora.

Gracias a todas esas personas que me han dejado alguna enseñanza o aprendizaje, me han motivado a ser mejor cada día y me motivan a ayudar a otras personas.

RESUMEN

ESTUDIO DE LAS VARIANTES GENÉTICAS DE *Diaphorina citri*, VECTOR DE
Candidatus Liberibacter spp. EN CÍTRICOS

Por

AUGUSTO GIL CEBALLOS CEBALLOS

MAESTRO EN CIENCIA EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

CALZADA ANTONIO NARRO No. 1923, BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA

MAYO 2021

DR. ERNESTO CERNA CHÁVEZ –ASESOR-

Palabras Clave: *Diaphorina citri*, Psílido, *Candidatus Liberibacter*, haplotipos.

El presente trabajo se basó en técnicas moleculares para la detección de *Candidatus Liberibacter* de las especies americana y asiática, se utilizó la técnica PCR punto final y se aplicó a muestras vegetales y de insectos usando los iniciadores BK-DY2F (5'-CGCGTATGCAATACGAGCGGCA-3') Y BK-DY2R (3'-GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT-5') para la especie asiática y BK-DY1F (5'-AGTCGAGCGAGTACGCAAGTACT-3') y BK-DY1R (3'-CAACTTAATGATGGCAAATATAG-5') para la especie americana. No se detectó presencia de Huanglongbing en ninguno de los casos, se concluyó que esto pudo deberse a que no se eligieron plantas con sintomatología aparente. Se sugiere el uso de PCR Tiempo Real o PCR anidada y se propuso que los muestreos sean basados en plantas con sintomatología aparente.

La técnica que se usó para la identificación de haplotipos del Psílido Asiático de los Cítricos (PAC) fue PCR punto final. La amplificación del ADN se realizó con los iniciadores

específicos DCITRI COI-L y DCITRI COI-R, el producto de la reacción PCR fue secuenciado en el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A. C. (IPICYT), obteniendo 22 secuencias finales que se analizaron con los programas Oligo analyzer y Clustal Omega. Las secuencias obtenidas se compararon con las que se encuentran reportadas en el GenBank y se determinó que existe una línea matriz que corresponde al haplotipo Dcit-1 con número de identificación FJ190306, sin embargo, también existen algunos individuos con diferencias en dos nucleótidos y que corresponden a los sitios de muestreo donde no hay estudios previos. Se identificaron dos nuevos posibles haplotipos a los que se les denominó DcitACC-1 y DcitACC-2. La distribución de las nuevas variantes corresponde a estados que no se han estudiado anteriormente, el haplotipo Dcit-1 ya se ha reportado en Nuevo León (Fuentes *et al.*, 2018). Las nuevas posibles variantes pueden estar relacionadas con las condiciones climáticas a las que habita el PAC. Se sugirió realizar muestreos más amplios en zonas donde el PAC no haya sido estudiado, esto con la finalidad de describir todas las variantes distribuidas en el país.

ABSTRACT

STUDY OF GENETIC VARIANTS OF *Diaphorina citri*, VECTOR OF *Candidatus*
Liberibacter spp. IN CITRUS FRUITS

BY

AUGUSTO GIL CEBALLOS CEBALLOS

MASTER OF SCIENCE IN AGRICULTURAL PARASITOLOGY

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

CALZADA ANTONIO NARRO No. 1923, BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA

MAY 2021

DR. ERNESTO CERNA CHÁVEZ -ADVISOR-

Key words: *Diaphorina citri*, Psyllid, *Candidatus* *Liberibacter*, haplotypes.

The present work was based on molecular techniques for the detection of *Candidatus* *Liberibacter* of the American and Asian species, endpoint PCR technique was used and applied to plant and insect samples using the primers BK-DY2F (5'-CGCGTATGCAATACGAGCGGCA-3') and BK-DY2R (3'-GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT-5') for the Asian species and BK-DY2R for the Asian species. GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT-5') for the Asian species and BK-DY1F (5'-AGTCGAGCGAGCGAGTACGCAAGTACT-3') and BK-DY1R (3'-CAACTTAATGATGGATGGCAAATATATAG-5') for the American species. The presence of Huanglongbing was not detected in any of the cases, it was concluded that this could be due to the fact that plants with apparent symptomatology were not selected. The use of Real Time PCR or nested PCR is suggested and it was proposed that sampling be based on plants with apparent symptomatology.

The technique used for the identification of Asian citrus psyllid (ACP) haplotypes was endpoint PCR. DNA amplification was performed with the specific primers DCITRI COI-L and DCITRI COI-R, the product of the PCR reaction was sequenced at the Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A. C. (IPICYT), obtaining 22 final sequences that were analyzed with the Oligo analyzer and Clustal Omega programs. The sequences obtained were compared with those reported in GenBank and it was determined that there is a parent line that corresponds to the Dcit-1 haplotype with identification number FJ190306, however, there are also some individuals with differences in two nucleotides and that correspond to sampling sites where there are no previous studies. Two new possible haplotypes were identified and named DcitACC-1 and DcitACC-2. The distribution of the new variants corresponds to states that have not been previously studied; the Dcit-1 haplotype has already been reported in Nuevo León (Fuentes et al., 2018). The new possible variants may be related to the climatic conditions at which the CAP inhabits. It was suggested to conduct broader sampling in areas where PAC has not been studied, this with the aim of describing all variants distributed in the country.

INTRODUCCIÓN

La producción de cítricos es una de las actividades con mayor impacto económico en el mundo, cada año se producen aproximadamente 146 millones de toneladas, en más de 9 millones de hectáreas (FAOSTAT, 2017). México ocupa el cuarto lugar a nivel mundial con una producción de 2,982,735 toneladas en 568,188 hectáreas (SIAP, 2017). El Huanglongbing (HLB) o dragón amarillo de los cítricos es una de las enfermedades más severas que afectan a los cítricos, ha causado la muerte de al menos 63 millones de árboles sobre todo en Asia, Sudáfrica y Brasil (Garza-Saldaña *et al.*, 2017). El HLB causa moteados amarillos sin uniformidad, clorosis y amarillamiento o aclarado de las nervaduras; reduce el tamaño y afecta el crecimiento de los frutos y ramas; los frutos son amarillos y tienen un característico sabor amargo (Halbert & Manjunath, 2006). En México el Huanglongbing fue reportado por primera vez en el año 2009 en el estado de Yucatán en árboles de limón; un año después fue reportado en Nayarit y Jalisco, así mismo, se reportó en el mismo año en plantas de limón mexicano en Tecomán, Colima (Robles-González *et al.*, 2013).

Existen diferentes plagas que afectan la producción de los cítricos, algunos son vectores de enfermedades, por lo que son consideradas las de mayor importancia debido al impacto que generan en la propagación de patógenos (Mora *et al.*, 2014). La plaga de mayor importancia en la producción de cítricos es *Diaphorina citri*, también conocida como Psílido Asiático de los Cítricos (PAC) (Martín *et al.*, 2014). El psílido provoca daños significativos, ya que se alimenta de brotes tiernos; introduce su aparato bucal picador-chupador para alimentarse de la sabia que fluye por los tubos cribosos (Bové, 2006).. El PAC es una plaga originaria de Asia que se ha reportado en diferentes países de América, en los que se encuentran: Brasil, Argentina, Estados Unidos y recientemente México, en donde fue reportada por primera vez en el estado de Campeche en el año 2002 (García-Pérez *et al.*, 2013).

Debido a que se trata de una plaga exótica es probable que durante la propagación se genere un proceso conocido como especiación (Clarke & Brown, 2018). Dicho proceso es provocado por las diferentes condiciones climáticas a las que son expuestos los individuos, es decir, la necesidad de adaptarse al medio genera cambios evolutivos a nivel genético; mismos que se manifiestan físicamente de diferentes maneras (Boykin *et al.*, 2007). Algunos

de esos cambios pueden ser: tamaño, color, tiempo de gestación, épocas de reproducción, etc. (Sánchez, 2014).

Actualmente los estudios relacionados al PAC están encaminados a cuestiones evolutivas, ecológicas y biológicas. Es por ello que se han priorizado las investigaciones que ayuden a comprender el comportamiento entre el insecto vector y el patógeno causante del HLB con el fin de encontrar elementos para desarrollar estrategias de control que ayuden a disminuir las pérdidas en la producción de cítricos (García, 2013).

Los estudios moleculares son una herramienta muy útil que nos ayudan a identificar las variantes genéticas, filogenéticas y de dinámica poblacional del PAC. Las técnicas empleadas son con base en el ADN mitocondrial, una vez realizados los estudios moleculares correspondientes podemos conocer la estructura de su genética poblacional, esto nos permite deducir y explicar comportamientos en poblaciones del PAC de diferentes regiones donde se ha reportado (Moncayo *et al.*, 2014). Actualmente los estudios moleculares para la identificación y descripción de variantes genéticas están relacionados con el gen del citocromo oxidasa (COI) (Fuentes *et al.*, 2018). En el COI se encuentran heredadas las características genéticas ascendentes, es por ello que el gen COI resulta ser el mejor objeto de estudio, ya que permite rastrear los ancestros de cualquier individuo (Paternina *et al.*, 2016). El presente trabajo está enfocado en el estudio de las variantes genéticas de *Diaphorina citri* mediante el uso de la técnica PCR punto final. Se muestrearon 6 estados productores de cítricos en el país con un total de 56 muestras de insectos.

ANTECEDENTES

En diferentes partes del mundo se han realizado estudios para detectar las diferentes especies de *Candidatus Liberibacter* o HLB que afectan la producción de cítricos. En África se tomaron muestras de 300 sitios que se concentraban en Etiopia, Uganda y Kenia. Las plantas muestreadas presentaban sintomatología como enverdecimiento, agallas, amarillamiento de nervaduras, etc. Así mismo se colectaron insectos vectores del patógeno, tales como: *T. erytrae* y *D. citri* que se encontraban presentes en las plantaciones de cítricos. Las muestras fueron procesadas por PCR, donde se amplificó un fragmento de 650 pb. Se detectó presencia de HLB en la mayoría de los sitios, así como en los insectos. El HLB fue secuenciado y se definieron las especies de *Ca. Liberibacter* presentes en los individuos de plantas e insectos. Se concluyó que existe un alto porcentaje de diseminación en los sitios de muestreo (Ajene *et al.*, 2020).

En Okinawa, Japón Ukuda-hosokawa *et al.*, (2015) tomaron muestras de árboles que se encontraban con abundante presencia de *D. citri*, estos árboles manifestaban fuertes síntomas de HLB. Mediante un aspirador manual obtuvieron insectos adultos durante 7 días continuos, alcanzando una cantidad de 424 individuos, les aplicaron pruebas PCR para confirmar la presencia del patógeno. Posteriormente, para determinar la movilidad y transmisión del patógeno, dejaron una plántula de limón expuesta a un insecto vector e hicieron repeticiones de todo el proceso varias veces de 6 a 12 meses. Los insectos muestreados fueron disectados y se les realizaron pruebas PCR cuantitativas para determinar los niveles de infección. Los resultados obtenidos muestran que el 99.3 de los insectos estaban infectados con el patógeno. Las partes del cuerpo presentaron infección homogénea, es decir, en todo el cuerpo; sin embargo, se reportó que en el abdomen y la cabeza encontraron más cantidad del patógeno. Las hembras mostraron un mayor índice de infección en otoño, mientras que los machos no presentaron variaciones por estación o tejido. Concluyen que hay épocas del año donde *D. citri* puede transmitir con mayor facilidad el HLB.

Otro estudio realizado fue el de Pietersen *et al.*, (2004) en Sudáfrica donde se muestrearon 57 huertos en 17 distritos. Se muestrearon árboles con sintomatología aparente, algunos sitios presentaron síntomas leves. Cada muestra tuvo 20 hojas con síntomas evidentes. Se analizaron un total de 249 muestras de 57 árboles. Algunas muestras fueron de árboles con

injertos, no se reportó presencia del patógeno en ninguno de estos individuos. Las pruebas PCR no amplificaron en ningún caso fragmentos de 1027 pb. Los amplicones reportados no pudieron ser confirmados mediante electroforesis, por lo que fueron secuenciados. Las secuencias mostraron que la especie de *Ca. Liberibacter africanus* es la liberibacter presente en todos los sitios que fueron muestreados.

En estados unidos Keremane *et al.*, (2015) realizó pruebas PCR en psíldos de plantas infectadas del laboratorio de investigación hortícola de los Estados Unidos. Los iniciadores que usó fueron: F3, F1P(F1c-B2), LF, B3, BIP (B1c-B2) y LB. Obtuvieron como resultados que los insectos estaban infectados con la bacteria y que la población se encontraba con altos niveles del patógeno.

Otro caso es el reportado por Mahrous *et al.*, (2018). En este trabajo recolectaron hojas de árboles de limón que aparentemente presentaban sintomatología similar a la de HLB, se realizó extracción de ADN mediante el método CTAB para posteriormente realizar pruebas PCR. Se utilizaron los primers universales P1/P7 para confirmar la presencia del patógeno, seguido de una PCR anidada con los iniciadores específicos R16F2n y R16R2 para el patógeno causante de la escoba de bruja. Los resultados mostraron que la PCR anidada amplificó un fragmento de 1200 pb, por lo tanto, se confirma la presencia de fitoplasma causante de escoba de bruja y se descarta la presencia de HLB.

En Taiwán se analizaron plantas de cítricos, se tomaron muestras de árboles con sintomatología y también de árboles aparentemente sanos. Las muestras fueron procesadas con pruebas PCR para la búsqueda de diferentes fitoplasmas asociados a los cítricos. Este trabajo se justifica bajo la hipótesis de que se puede confundir la sintomatología de otros fitoplasmas con el causante del HLB, por lo que se utilizaron los iniciadores universales P1 y P7. Una vez identificadas las muestras infectadas con *Ca. Liberibacter*, se les aplicó una PCR anidada para buscar al patógeno causante de la escoba de bruja con los cebadores R16F2n y R16R2, sin embargo, los fragmentos amplificados no corresponden al peso esperado para los fitoplasmas asociados a plantas de cítricos. La prueba PCR anidada con los aplicada nuevamente a 706 muestras de los mismos árboles, mostraron un 89% de incidencia positiva de la enfermedad causante del HLB (Feng *et al.*, 2015).

Otro trabajo es el de Caicedo *et al.*, (2015) en Brasil. El cual consiste en 34 muestras tomadas de plantaciones de cítricos. Las muestras fueron analizadas por PCR para determinar el tipo de liberibacter con la que estaban infectadas, el 60 % de las muestras estaban infectadas, amplificaron un fragmento de 800 pb aproximadamente. El producto de la reacción fue secuenciado y comparado con la base de datos del GenBank, y se encontró que coincidían en un 99% con el patógeno que causa la escoba de bruja. En cuanto a los insectos vectores, se les realizó extracción de ADN y PCR a 129 individuos de diferentes familias colectados de plantas de cítricos. Las secuencias, producto de la PCR mostraron 99% de similitud con los fitoplasmas AF248957 Y HQ423159, el segundo es el agente causal del HLB.

En México se han realizado algunos trabajos para la detección y control de HLB. Uno de los trabajos realizados fue el de Cázares (2014). Se utilizaron los iniciadores OI1 y OI2C para amplificar la región 16S de ARNr para dos muestras de Sinaloa y Colima; una de ADN del psílido y otra de limón persa, sin embargo, no amplificó. Se aplicó otra prueba PCR en dos muestras más con los iniciadores rplJ5 y rplA2 que amplifican la región del operón ribosomal de *Ca. Liberibacter*. El amplicón obtenido fue de 703 pb que corresponde a la especie asiática de HLB. Un tercer par de iniciadores empleados en la búsqueda de HLB fueron GB1 y GB3; estos iniciadores corresponden a la cepa americana, mismos que no presentaron amplificación.

Muestras de cítricos sintomáticos de los estados de Sinaloa, Nayarit y Colima fueron llevadas al CIIDIR-IPN campus Sinaloa, donde se les realizó extracción de ADN. El ADN obtenido se le aplicó una PCR anidada con los iniciadores R16F2n y R16R2 para la búsqueda de fitoplasmas asociados a los cítricos. El resultado de la PCR mostró que, en 86 individuos de plantas, 54 resultaron ser positivas para HLB, mientras que otras 20 estaban infectadas con otros fitoplasmas; 7 presentaron infecciones mixtas y 19 resultaron totalmente negativas. Ambos productos de la PCR fueron secuenciados y anexados en el GenBank (Arratia-Castro *et al.*, 2014).

Los estudios acerca de las variantes genéticas consisten en buscar los orígenes de los individuos, es decir, analizar y comparar a través de estudios moleculares las variantes presentes a lo largo de un determinado espacio y tiempo. Luo & Agnarsson (2018) realizaron un estudio de las variantes genéticas de *Diaphorina citri*, donde colectaron 412 individuos

del PAC de 11 sitios en China. Las muestras fueron procesadas mediante PCR utilizando los Iniciadores “DCITRICOI-L1. 5 y DCITRICOI-R: 5. Adicionalmente compararon secuencias genéticas del GenBank provenientes de Irán, Pakistán, Arabia Saudita, India, Vietnam, Tailandia, Indonesia, Puerto Rico, México, Estados Unidos y Brasil. El resultado fue 44 haplotipos globales; identificaron 2 líneas matrices provenientes del sur-sureste de Asia, y relacionaron su distribución geográfica con las características climáticas de cada sitio.

En Colombia se colectaron individuos adultos en dos zonas, el valle de Cauca y Quindío con 4 sitios de muestreo por zona, haciendo un total de 24 muestras para cada región. Se utilizaron pruebas PCR con los Iniciadores UEA3 y UEA4d. Encontraron que existen 17 líneas matrices en el Valle de Cauca y 14 en Quindío. Los resultados mostraron que los individuos comparten haplotipos entre líneas, esto refleja que no existe una alta variabilidad genética entre poblaciones; también muestra que las poblaciones del PAC al no haber modificado significativamente su genética podrían no transmitir nuevas variantes de la bacteria del HLB (Moncayo *et al.*, 2014).

Otro trabajo se realizó en Brasil entre el año 2005 y 2010, se colectaron insectos adultos en el estado de Sao Paulo. Se utilizaron los Iniciadores DCITRI COI-L y DCITRI COI-R. Los resultados demostraron que hay 47 haplotipos definidos en total en esa región, es decir, una amplia variedad genética entre individuos. Se observó que el 70% de los haplotipos se concentran en una sola zona, mientras que el 30% restante están distribuidos en más de una localidad. El haplotipo H1 fue el más común con un 34% de presencia, el H2 con un 11% y el H3 en el 7% del territorio. La distribución de las poblaciones de *D. citri* no son uniformes teniendo en cuenta la distribución de los haplotipos, sin embargo, su estructura poblacional puede variar a lo largo del tiempo (Guidolin *et al.*, 2014).

Clarke & Brown (2018) encontraron 23 haplotipos globales, de los cuales 12 son de Jamaica, Dominicana, San Vicente y las Granadas, Islas caimán, Antigua y Bermuda, y Santa lucía; mismos que son encontrados solo en el caribe, mientras que los 11 restantes representan las secuencias de referencia ya antes reportadas. Los haplotipos dominantes en el caribe son H2 y H7. H2 representa el 57% de las 46 muestras tomadas en los seis países muestreados, mientras que el resto corresponde en su mayoría a H7 que representa el 22% del total de las muestras. El análisis de los resultados demuestra que los haplotipos H2 y H7 son líneas

matrices de las que se derivan algunos haplotipos raros como son: H1 (L1) y H11 (L114); lo que sugiere que debido al cambio climático y a las diferencias de condiciones climáticas, el PAC se ha adaptado genéticamente para soportar dichas condiciones.

Existe otro trabajo realizado por De León *et al.*, (2011), en el que se describen 23 haplotipos. Las muestras fueron tomadas de diferentes países del continente americano y fueron procesadas por PCR, en la cual usaron los Iniciadores C1-J-1718 y C1-N-2191, con estos cebadores se logra amplificar una región de 812 pb. El 17% de los individuos no eran similares al resto. Los resultados arrojaron que los haplotipos 1-8 se encontraron en poblaciones de américa del sur; los haplotipos de 9 a 19 se registraron en américa el norte; del 20 al 23 en poblaciones de Hawái. Lo que sugiere que las poblaciones están ampliamente distribuidas a lo largo del continente sin haber características significativas entre líneas matrices. Los autores lo atribuyen a la variación en las temperaturas a lo largo del continente.

En el año, 2013 Lashkari *et al.*, (2014) realizaron una comparación de los individuos del PAC que se encuentran en estados unidos, Irán y Pakistán. Utilizaron los Iniciadores DCITRI COI-L y DCITRI COI-R, así mismo buscaron en el GenBank datos de secuencias de países como China, México y Brasil para compararlos e identificar diferencias. Encontraron que las secuencias de los individuos presentes en Pakistán e Irán son similares a las de China, esto quiere decir que las poblaciones comparten el mismo origen. También mencionan que las secuencias descritas en Estados Unidos tienen similitudes con las poblaciones reportadas al suroeste de Asia, por lo que sugieren se deben tomar en cuenta para el desarrollo de futuras estrategias de control del PAC.

Actualmente existen estudios que se han desarrollado con el propósito de identificar los genes que generan resistencia en insectos, estos genes están relacionados con adaptaciones al medio en el que se distribuyen. Los genes de resistencia son activados genéticamente por la exposición prolongada a situaciones de estrés, las condiciones bióticas y abióticas que generan presión en la ecología del insecto. En su trabajo Boykin *et al.*, (2012), mencionan que en poblaciones de PAC colectadas en diferentes continentes como: África, Asia y América, las poblaciones presentan genes de resistencia que se relacionan con las altas temperaturas en las que normalmente el insecto habita. Esto sugiere que las poblaciones de

PAC que se han establecido en zonas más templadas no tienen las condiciones para activar dichos genes.

En la India se estudió un pequeño grupo de poblaciones del PAC, donde se encontraron 10 especímenes, este trabajo constó solo en la cuantificación de especímenes y no en la descripción e identificación, por lo que solo se menciona el código con el que se marcaron para posteriores consultas. Los Iniciadores utilizados fueron DCITRI COI-L y DCITRI COI-R, donde se amplificaron 791 pb. El trabajo es la parte inicial para la descripción e identificación de las variantes genéticas en las poblaciones (Chaitanya *et al.*, 2016).

En México algunos institutos y universidades han comenzado con el estudio de las variantes genéticas de *D. citri*. Uno de los estudios realizados es el de Sánchez (2014), el cual consiste en un muestreo de 188 individuos adultos provenientes del estado de Veracruz del municipio de Cazonas a los cuales se les aplicó prueba PCR utilizando los Iniciadores DCITRI COI-L y DCITRI COI-R. Después de analizar las secuencias de los individuos, se concluyó que hay cuatro haplotipos presentes en la zona (H1, H2, H3 y H4). El análisis morfológico de los individuos confirma la relación que existe entre las variantes genéticas y las variantes de forma, se puede asegurar que los individuos han evolucionado para adaptarse a las diferentes condiciones a las que son expuestos.

Otro trabajo hecho en México es el de García (2013) en el que se utilizaron 68 ejemplares adultos de *D. citri*, de los cuales 48 fueron colectados en la localidad de Cazonas en el estado de Veracruz; el resto fueron tomados de colectas en Nuevo León, Michoacán, Veracruz y Yucatán. Se utilizó la técnica PCR punto final con los Iniciadores CI-J-1718 y CI-N-2191. En este caso no se encontraron variantes genéticas entre poblaciones, solo reportaron la presencia del haplotipo H1. Los resultados muestran que las poblaciones de la zona son homogéneas, aunque hay que destacar que la secuencia amplificada es más pequeña que en otros trabajos realizados en la misma zona.

Justificación

Para comprender las adaptaciones de *Diaphorina citri* en el medio, es necesario conocer la distribución genética en México; en las principales zonas citrícolas del país, y en específico, en los puntos con un grado más alto de riesgo fitosanitario.

Hipótesis

Se confirmará la existencia de diferentes haplotipos de *Diaphorina citri*, así como las diferentes especies de *Candidatus Liberibacter* en las principales zonas citrícolas del país.

Objetivo general

Detectar haplotipos de *Diaphorina citri*, así como la presencia de *Candidatus Liberibacter* en tejido vegetal e insecto.

Objetivos específicos

- Identificar los haplotipos de *D. citri* presentes en las principales zonas productoras de cítricos en México.
- Detectar la presencia de *Ca. Liberibacter* en *D. citri*.
- Detectar la presencia de *Ca. Liberibacter* en tejido vegetal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitios y material de colecta

Se colectaron insectos adultos en seis estados de la república: Ciudad Mante, Tamaulipas; Montemorelos, Nuevo León; Tecomán, Colima; Misantla, Veracruz; Tantoyuca, Veracruz; Huejutla, Hidalgo y Acatlán de Pérez Figueroa, Oaxaca. Se utilizaron 60 individuos adultos colectados en los seis estados, extraídos de huertas comerciales que no presentaban sintomatología aparente. Los criterios para la selección de huertas fueron: Plantas de hasta 10 años, huertas que se encuentren junto a cuerpos de agua y centros de acopio de cítricos como empacadoras y enceradoras. Los insectos se colectaron con ayuda de un aspirador manual y se transportaron en frascos viales con alcohol al 96%.

Se seleccionaron un total de 36 ramas colectadas de los seis estados muestreados, con brotes tiernos que tuvieran hojas y peciolo completos donde hubiera presencia del Psílido Asiático de los Cítricos (PAC), se transportaron en hieleras con gel refrigerante, al llegar al laboratorio de toxicología del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro se conservaron en el congelador a una temperatura de -20° C. Es importante mencionar que las plantas no presentaban sintomatología aparente.

Tabla 1. Claves de individuos por sitios de muestreo.

Sitio de colecta	Clave asignada	Sitio de colecta	Clave asignada	
Ciudad Mante, Tamps.	A1	Monte Morelos, N. L.	A7	
	A2		A8	
	A11		A9	
	A12		A10	
	A13		A39	
	A14		A40	
	A15		A41	
	A16		A42	
	A17		A43	
	A29		A44	
	A30		Huejutla, Hgo.	A17
	A50			A18
	A51			A19
	A52			A31
	A53			A32
A54	A33			
A55	Acatlán de Pérez, Oax.	A20		
A56		A21		
Misantla, Ver.	A3	Tecomán, Col.	A22	
	A4		A23	
	A5		A24	
	A6		A25	
Tantoyuca, Ver.	A34		A26	
	A35		A27	
	A36		A28	
	A37		A47	
	A38		A48	
			A49	
	A56			

Extracción de ADN del Psílido

La extracción se realizó siguiendo el método CTAB modificado por Almeyda y Rocha (2001). Se utilizó 1 psílido por cada extracción.

Extracción ADN vegetal

En la extracción de ADN vegetal se siguió la metodología de Doyle & Doyle (1988), sin utilizar el β -mercaptoetanol; donde se pesaron 100 mg de tejido vegetal fresco tomado del limbo y nervaduras laterales de la hoja.

Detección de *Ca. Liberibacter asiático*

Los iniciadores utilizados para la detección de la especie asiática en muestras vegetales y de insectos fueron: BK-DY2F (5'-CGCGTATGCAATACGAGCGGCA-3') Y BK-DY2R (3'-GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT-5') (Arredondo *et al.*, 2016). Se usó cinco muestras de ADN de insecto y cinco de plantas por sitio, y cada ciclo de reacción estuvo acompañado de un control positivo proporcionado por el ENECUSAV-SENASICA, en Querétaro. El programa empleado en el termociclador fue: temperatura de predesnaturalización a 94° C durante 4 minutos, 44 ciclos con temperaturas de desnaturalización a 94° C durante 1 minuto, alineación a 62° C por 1 minuto, una extensión a 72° C durante 2 minutos y por último una extensión final de 10 minutos a 72° C. El amplicón esperado fue de 683 Pb, visualizado con la ayuda de un transluminador en un gel de agarosa al 1.5 % con un marcador de peso molecular de 100 bp marca invitrogen. Este programa e iniciadores fueron utilizados para las muestras vegetales y de insectos.

Detección de *Ca. Liberibacter americano*

Se utilizó un termociclador punto final marca Select Bioproducts. Los iniciadores utilizados para la reacción fueron BK-DY1F (5'-AGTCGAGCGAGTACGCAAGTACT-3') y BK-DY1R (3'-CAACTTAATGATGGCAAATATAG-5') (Arredondo *et al.*, 2016). Se utilizaron en total cinco muestras de ADN vegetal y cinco de insecto por sitio, procesadas individualmente para la detección de *Ca. Liberibacter americano*; y adicionalmente se procesó ADN-control positivo que proveyó el ENECUSAV-SENASICA, en Querétaro. El programa utilizado para la reacción fue: temperatura de predesnaturalización a 94° C durante 5 minutos, 39 ciclos con temperaturas de desnaturalización a 94° C durante 40 segundos, alineación a 56° C por 40 segundos y extensión a 70° C durante 1 minuto y una extensión

final de 10 min a 72° C. Los Iniciadores utilizados amplificaron un fragmento de 1026 Pb. Se visualizaron con un transluminador en un gel de agarosa al 1.5%. Este programa e iniciadores fueron utilizados para las muestras vegetales y de insectos.

Identificación de haplotipos

Se utilizó un termociclador punto final marca Select Bioproducts. Se procesó el ADN de insectos individualmente, para un total de cinco individuos por cada sitio de muestreo, de igual manera se usó ADN-control positivo que proveyó el ENECUSAV-SENASICA, en Querétaro. Los Iniciadores utilizados fueron: DCITRI COI-L (AGGAGGTGGAGACCCAATCT) y DCITRI COI-R (TCAATTGGGGGAGAGTTTTG) (Clarke & Brown, 2018). Las condiciones de amplificación fueron: temperatura de predesnaturalización 94° C durante 4 minutos, 40 ciclos con temperaturas desnaturalización a 94° C por 40 segundos, alineación a 58° durante 40 segundos, con una extensión de 1 minuto a 72° y una extensión final a 72° C durante 10 minutos. El marcador de peso molecular utilizado fue de 100 bp marca invitrogen para un fragmento de 812 pb, mismos que fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.5% mediante un transluminador.

La extracción de ADN de los insectos y el material vegetal, así como las pruebas PCR, fueron procesadas en el laboratorio de Toxicología del departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Secuenciación de haplotipos

El ADN obtenido de los insectos para la descripción de haplotipos fue enviado al Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA) del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A. C. (IPICYT). Se secuenciaron 23 cadenas.

Comparación de haplotipos

Las secuencias obtenidas, se compararon contra las secuencias ya reportadas en el GenBank usando los programas OligoAnalyzer para invertir las cadenas y Clúster Omega para comparar las secuencias reportadas por Fuentes *et al.*, (2018) para posteriormente determinar los haplotipos presentes.

RESULTADOS

Extracción de ADN Psílido

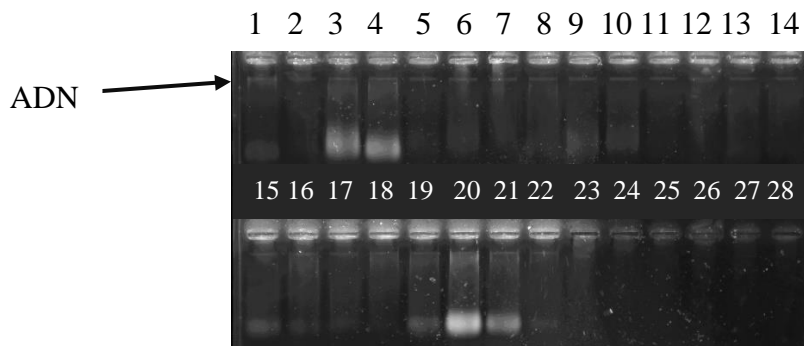


Figura 1. Extracción ADN psílido. Pozos: 1-5 Misantla, Ver., 6-15 Cd. Mante, Tamps., 16-25 Montemorelos, N. L.

Extracción ADN vegetal



Figura 2. Extracción ADN vegetal. Pozos: 1-5 Acatlán de Pérez, Oax., 6-10 Huejutla, Hgo.

No se detectó *Ca. Liberibacter asiático* en ninguna de las 36 muestras vegetales amplificadas por PCR punto final. Al visualizar el gel en el transluminador, se puede constatar que el control positivo si amplificó al peso molecular esperado, mientras que las muestras no amplificaron en ninguno de los casos como se muestra en la figura 3.

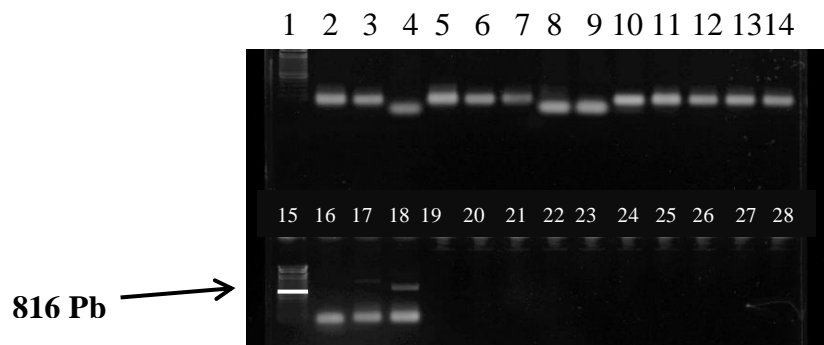


Figura 3. Amplificación de *Ca. Liberibacter asiático* en psílidos mediante los iniciadores BK-DY2F y BK-DY2R. Pozos: 1 y 15: marcador de peso molecular. Pozos 1-5: Misantla, Ver., 6-10 Montemorelos, N. L., 11-14, 16 y 17 Cd Mante, Tamps., 18 control positivo.

En la detección de *Ca. Liberibacter americano* en material vegetal, las 36 muestras sometidas a PCR punto final no mostraron amplificación, el ADN utilizado como control positivo si amplificó a 1026 Pb bajo las condiciones y programa de reacción, así como se muestra en la figura 4. Las 56 muestras del PAC tampoco amplificaron en ninguno de los casos.

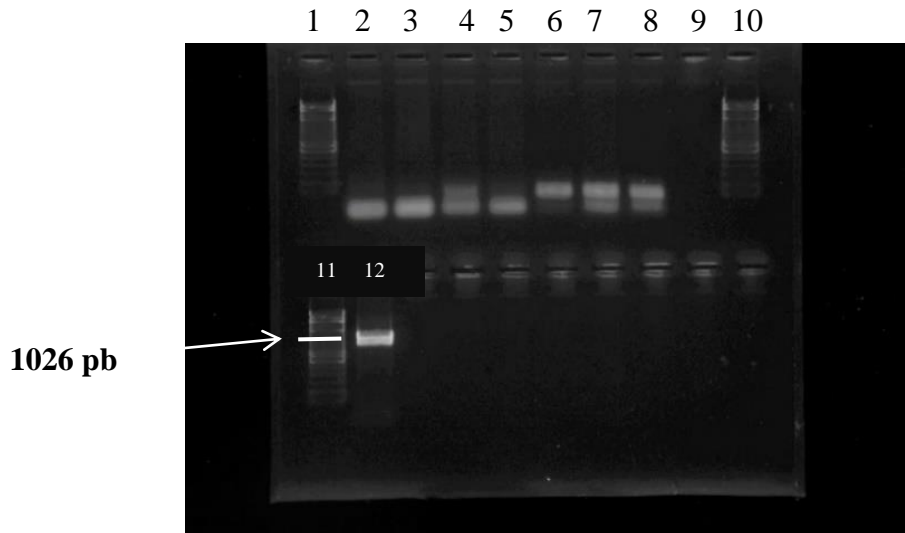


Figura 4. Amplificación mediante primer BK-DY1F y BK-DY1R de *Ca. Liberibacter americano* en psílidos. Pozos: 1, 10 y 11: marcador molecular., 2-9: muestras de Montemorelos, N. L., 12 control positivo.

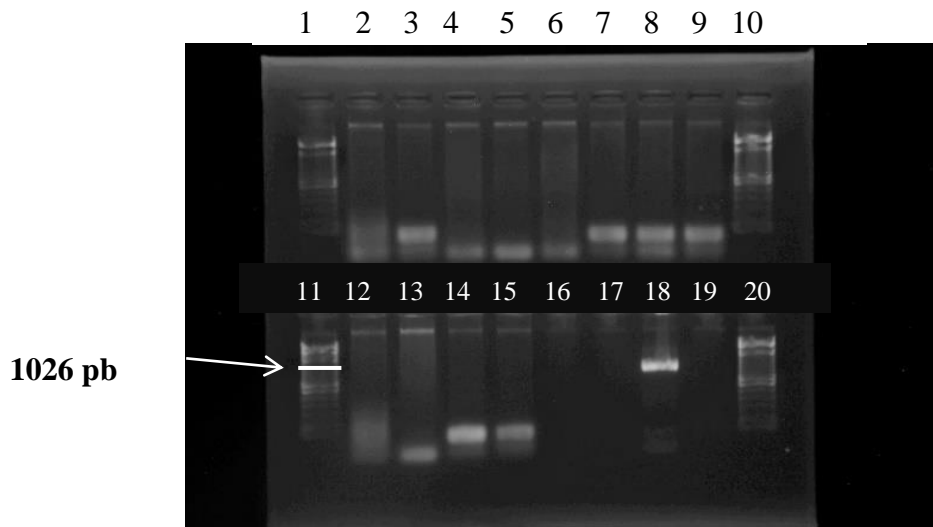


Figura 5. Amplificación de *Ca. Liberibacter americano* en plantas de cítricos mediante los iniciadores BK-DY1F y BK-DY1R. Pozos: 1, 10, 11 y 20: marcador molecular., 2-5: Hidalgo., 6-9 y 12-15: Cd. Mante; y 18 control positivo.

Identificación de Haplotipos de *D. citri*

Se observó amplificación con los iniciadores DCITRI COI-L y DCITRI COI-R, para mandar a secuenciar e identificar haplotipos de *D. citri*. La amplificación se ubica en el peso molecular esperado que es de 683 Pb como se muestra en la figura 7. En total fueron 22 muestras que se enviaron a secuenciar de un total de 56 individuos, ya que el resto no amplificó, probablemente porque el ADN no era de óptima calidad.

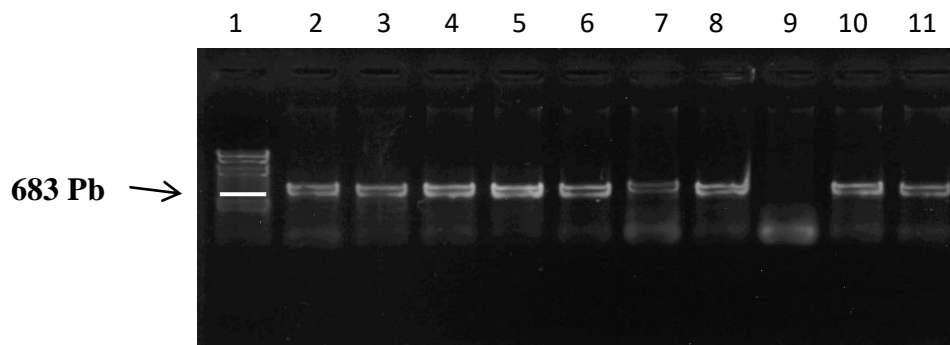


Figura 6. Amplificación mediante DCITRI COI-L y DCITRI COI-R para haplotipos de *Diaphorina citri*. Pozos: 1. Marcador de peso molecular., 2. Cd. Mante, Tamps., 3-6 Misantla, Ver., 7. Huejutla, Hgo., 8, 9, 10 y 11 Acatlán de Pérez, Oax.

En la comparación de las secuencias obtenidas se pudo observar que algunas de ellas son iguales al haplotipo Dcit-1 (no. acceso FJ190306) (Fuentes *et al.*, 2018). Se detectaron dos patrones de secuencias que no están reportadas en la bibliografía y son levemente diferentes al haplotipo Dcit-1, las cuales se han denominado DcitACC-1 y DcitACC-2. Las secuencias con los nucleótidos donde existe esta diferencia se presentan en la Tabla 2. De los 24 individuos seleccionados en los seis estados, 11 son iguales al haplotipo Dcit-1, 7 al DcitACC-1 y 6 al haplotipo DcitACC-2 (Tabla 2).

Tabla 2. Diferentes haplotipos identificados, muestras, sitios de colecta diferencia entre nucleótidos.

Haplotipo	Muestra	Sitio de colecta	Nucleótidos	
			61	253
Dcit-1 (Fuentes <i>et al.</i> , 2018)	A1	Cd. Mante, Tamps.		
	A18	Huejutla, Hgo.		
	A24	Acatlán de Pérez, Oax.		
	A31	Huejutla, Hgo.		
	A32	Huejutla, Hgo.		
	A40	Montemorelos, N. L.	T	T
	A42	Montemorelos, N. L.	T	T
	A45	Montemorelos, N. L.		
	A48	Tecomán, Col.		
	A15	Cd. Mante, Tamps.		
A8	Montemorelos, N. L.			
DcitACC-1	A25	Tecomán, Col.		
	A34	Tantoyuca, Ver.		
	A33	Huejutla, Hgo.		
	A51	Cd. Mante, Tamps.	G	C
	A5	Misantla, Ver.	G	C
	A6	Misantla, Ver.	G	C
	A23	Acatlán de Pérez, Oax.		
DcitACC-2	A36	Tantoyuca, Ver.		
	A35	Tantoyuca, Ver.		
	A43	Montemorelos, N. L.	G	T
	A3	Misantla, Ver.	G	T
	A4	Misantla, Ver.	G	T
	A22	Acatlán de Pérez, Oax.		



Figura 7. Mapa de distribución de haplotipos. 1 Montemorelos, N. L., 2 Ciudad Mante, Tamps., 3 Tantoyuca, Ver., 4 Huejutla, Hgo., 5 Misantla, Ver., 6 Tecmán, Col., 7 Acatlán de Pérez, Oax.

DISCUSIÓN

El resultado de que no se haya detectado HLB mediante la técnica PCR punto final en las muestras de insectos y plantas procesadas puede tener varias razones. La primera es que no exista infección en los sitios de muestreo. Los trabajos realizados por Ajene *et al.*, (2020) establecen un muestreo en zonas con sintomatología evidente, mientras que en las huertas muestreadas para este trabajo no había sintomatología aparente. Otra puede ser el uso de los iniciadores, en Estados Unidos se han diversificado el uso de iniciadores, por lo que podría ser que para la detección del patógeno se necesite ampliar el abanico para tener mayor certeza (Keremane *et al.*, 2015). También se debe mencionar que el presente trabajo estuvo basado en la detección de HLB de las especies americana y asiática, donde sabemos que la sintomatología se puede confundir con otros patógenos como el causante de la escoba de bruja, es por ello que a pesar de visualizar poca sintomatología aparente, el patógeno presente podría ser otro, así como lo reportado por Feng *et al.*, (2015), en la que la sintomatología apuntaba a ser HLB; pero los resultados mostraron la presencia de escoba de bruja, aunque este patógeno aún no se encuentra reportado en México. La detección del patógeno causante del HLB puede ser variable debido a diversos factores, entre ellos se encuentra los estadios de desarrollo del insecto y las épocas del año. Los muestreos para este trabajo fueron realizados en los meses de agosto a febrero, es decir, en época invernal, al término e inicio de su ciclo reproductivo; lo que sugiere, de acuerdo a lo reportado por Ukuda-hosokawa *et al.*, (2015) que la transmisión del patógeno puede variar debido a la distribución del mismo en el vector, en algunas etapas de su ciclo de vida puede no estar presente en lugares clave para la diseminación, así mismo, reportó que incluso puede variar la transmisión de acuerdo al sexo del individuo, siendo las hembras más propicias para la transmisión.

Los iniciadores empleados en este trabajo amplifican la región 16s del ARNr, normalmente es la región más estudiada para la detección del HLB, sin embargo, hay casos en los que resulta ser no detectable debido a la poca presencia del patógeno, por lo que se emplean otras técnicas como PCR anidada o PCR tiempo real. Ese es otro punto por el cual probablemente no se detectó al patógeno en las muestras. Cázares, (2014), no detectó HLB mediante PCR punto final, por lo que como alternativa empleó una PCR anidada y de este modo si se detectó la presencia del agente causal del HLB. Este mismo procedimiento fue aplicado en la

investigación de Arratia-Castro *et al.*, (2014), confirmando así la presencia del patógeno haciendo uso de la PCR anidada (Ángel *et al.*, 2014).

Las variantes genéticas de *Diaphorina citri* han sido ampliamente estudiadas, se utilizan técnicas PCR para su identificación, determinar las variantes genéticas también nos ayuda a conocer su distribución. En este trabajo se detectaron tres patrones de secuenciación, uno fue el Dcit-1 ya reportado en la bibliografía y otros dos nuevos. De acuerdo con lo reportado por Luo & Agnarsson, (2018), pueden haber más líneas matrices identificadas debido a la distribución de los sitios muestreados que corresponden a países con condiciones climáticas diferentes a las de México. Un punto importante es que las secuencias reportadas en México de este mismo estudio corresponden solo a un punto geográfico del país, donde la movilidad de las poblaciones puede verse limitada por factores como: trazabilidad de los cítricos y condiciones climáticas que no se encuentran en otros puntos del país; esto sugiere que los muestreos son limitados y por ello no se han identificado más haplotipos o líneas matrices. Las poblaciones del PAC están relacionadas con las diferentes condiciones climáticas a las que son expuestas. El presente trabajo identificó posibles nuevas variantes genéticas del PAC colectadas de diferentes puntos del país, lo que podría sugerir una diversidad más amplia en las poblaciones. Este punto se puede contrastar con el trabajo de Guidolin *et al.*, (2014) donde reporta una amplia distribución de las variantes genéticas y las relaciona con la localización de los puntos de muestreo. Existen algunas coincidencias con lo reportado por Clarke & Brown, (2018), donde relacionan la distribución y variedad de las poblaciones del PAC con el cambio climático y los rangos de temperatura a los que son expuestos los individuos. Los rangos de temperatura para el desarrollo óptimo del PAC son de 25°C a 28°C; sin embargo, existen reportes donde se menciona que sobrevive a temperaturas de -7°C hasta 48°C (Aurambout *et al.*, 2009). Las posibles variantes encontradas en este trabajo pueden estar relacionadas con las condiciones climáticas en las que habitan las poblaciones, donde la temperatura máxima promedio que reporta Díaz-Padilla *et al.*, (2018) es de 26°C a 30°C y las mínimas son 18°C a 21°C, mientras que 22°C a 25°C es el rango de temperatura promedio más constante.

En México existen pocos reportes acerca de las variantes genéticas del PAC, trabajos como el de Sánchez (2014), limitan los muestreos solo a las principales zonas productoras de

cítricos del país, mientras que este trabajo tuvo muestras provenientes de zonas que no han sido muestreadas o reportadas anteriormente. Por esta razón podría haber diferencias significativas en las secuencias obtenidas, ya que el haplotipo Dcit-1 reportado para México corresponde al estado de Nuevo León (Fuentes *et al.*, 2018). Los individuos colectados en este trabajo son de algunos estados donde la actividad citrícola no es la principal, y también es importante mencionar que en algunas huertas las poblaciones del PAC eran muy bajas debido al control que se le realiza por tratarse de una plaga de mucha importancia. Los sitios de colecta puede ser la principal razón de que se hayan identificado diferencias en las secuencias obtenidas con los trabajos de García (2013), donde se limita solo a cuatro estados, mismos que son sitios donde se han realizado diversos trabajos y que han complementado sus investigaciones con análisis morfológicos.

CONCLUSIÓN

- La PCR en punto final puede no ser suficientemente sensible para la detección del HLB, en comparación con la PCR anidada o PCR tiempo real. Se sugiere usar estas técnicas de detección en trabajos posteriores.
- Se identificaron dos secuencias diferentes a los haplotipos de *Diaphorina citri* reportados hasta el momento, que podrían ser nuevos haplotipos del Psílido Asiático de los Cítricos, a los que se les ha denominado como DcitACC-1 y DcitACC-2.
- En el presente trabajo se han reportado los nuevos haplotipos DcitACC-1 y DcitACC-2 para los estados de Oaxaca y la zona centro de Veracruz, donde no hay reportes de presencia del haplotipo Dcit-1.
- Se confirma la presencia del haplotipo Dcit-1 en los estados de Colima, Nuevo León, Hidalgo y Tamaulipas, y se reportan por primera vez las nuevas variantes DcitACC-1 y DcitACC-2.

REFERENCIAS

- Ajene, I. J., Khamis, F. M., Asch, B. Van, Pietersen, G., Seid, N., Rwomushana, I., Ombura, F. L. O., Momanyi, G., Finyange, P., Rasowo, B. A., Tanga, C. M., & Mohammed, S. (2020). *Distribution of Candidatus Liberibacter species in Eastern Africa, and the First Report of Candidatus Liberibacter asiaticus in Kenya*. 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60712-0>
- Ángel, J. E., Hernández, E. G., Herrera, N. A., Gómez, L. Y., Castro, Á. P., Sepúlveda, A. M., & Ebratt, E. E. (2014). Citrus huanglongbing: Validation of real-time PCR (qPCR) for the detection of Candidatus Liberibacter asiaticus and Candidatus Liberibacter americanus in Colombia. *Agronomía Colombiana*, 32(3), 377–389. <https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v32n3.44069>
- Arratia-Castro, A. A., Santos-Cervantes, M. E., Fernández-Herrera, E., Chávez-Medina, J. A., Flores-Zamora, G. L., Camacho-Beltrán, E., Méndez-Lozano, J., & Leyva-López, N. E. (2014). Occurrence of “Candidatus Phytoplasma asteris” in citrus showing Huanglongbing symptoms in Mexico. *Crop Protection*, 62, 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.04.020>
- Arredondo, R. V., Ortiz, J. C. D., Beache, M. B., Cabello, J. A., Chávez, E. C., Pagaza, Y. R., & Ochoa Fuentes, Y. M. (2016). A review of techniques for detecting huanglongbing (Greening) in citrus. *Canadian Journal of Microbiology*, 62(10), 803–811. <https://doi.org/10.1139/cjm-2016-0022>
- Aurambout, J. P., Finlay, K. J., Luck, J., & Beattie, G. A. C. (2009). A concept model to estimate the potential distribution of the Asiatic citrus psyllid (*Diaphorina citri* Kuwayama) in Australia under climate change—A means for assessing biosecurity risk. *Ecological Modelling*, 220(19), 2512–2524. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2009.05.010>
- Bové, J. M. (2006). Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*, 88(1), 7–37. <https://doi.org/10.4454/jpp.v88i1.828>
- Boykin, L. M., De Barro, P., Hall, D. G., Hunter, W. B., McKenzie, C. L., Powell, C. A., & Shatters, R. G. (2012). Overview of worldwide diversity of *Diaphorina citri* Kuwayama mitochondrial cytochrome oxidase 1 haplotypes: Two Old World lineages and a New World invasion. *Bulletin of Entomological Research*, 102(5), 573–582. <https://doi.org/10.1017/S0007485312000181>
- Boykin, Laura M., Bagnall, R. A., Frohlich, D. R., Hall, D. G., Hunter, W. B., Katsar, C. S., McKenzie, C. L., Rosell, R. C., & Shatters, R. G. (2007). Twelve polymorphic microsatellite loci from the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama, the vector for citrus greening disease, huanglongbing. *Molecular Ecology Notes*, 7(6), 1202–1204. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01831.x>
- Caicedo, J. D., Rivera-Vargas, L. I., Segarra, A. E., & Davis, R. E. (2015). Detection and molecular characterisation of a group 16SrIX phytoplasma infecting citrus (*Citrus sinensis* and *C. limon*), coffee (*Coffea arabica*), periwinkle (*Catharanthus roseus*), and tabebuia (*Tabebuia heterophylla*) in Puerto Rico. *Australasian Plant Disease Notes*,

10(1). <https://doi.org/10.1007/s13314-015-0178-x>

- Cázares, N. P. (2014). Estrategias biotecnológicas para el control de *Diaphorina citri* vector de la bacteria *Candidatus liberibacter asiaticus*, agente causal del Huanglongbing. *Universidad Autónoma De Nuevo León*, 1–77. <http://eprints.uanl.mx/4010/1/1080253538.pdf>
- Chaitanya, B. N., Asokan, R., Rebijith, K. B., Rao, C. N., Kumar, P. R., & Kumar, N. K. K. (2016). Molecular identification and diversity of Asian Citrus Psyllids using mtCoI gene sequences. September 2020.
- Clarke, S. V., & Brown, S. E. (2018). Identification and Distribution of Haplotypes of *Diaphorina citri* (Hemiptera : Liviidae) in Jamaica and the Caribbean Identification and Distribution of Haplotypes of *Diaphorina citri* (Hemiptera : Liviidae) in Jamaica and the Caribbean. September. <https://doi.org/10.1093/jee/toy194>
- De León, J. H., Sétamou, M., Gastaminza, G. A., Buenahora, J., Cáceres, S., Yamamoto, P. T., Bouvet, J. P., & Logarzo, G. A. (2011). Two separate introductions of Asian citrus psyllid populations found in the American continents. *Annals of the Entomological Society of America*, 104(6), 1392–1398. <https://doi.org/10.1603/AN11086>
- Díaz-Padilla, G., López-Arroyo, J. I., Sánchez-Cohen, I., Guajardo-Panes, R. A., Mora-Aguilera, G., & Quijano-Carranza, J. Á. (2018). Áreas de abundancia potencial en México del vector del Huanglongbing, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5(7), 1137. <https://doi.org/10.29312/remexca.v5i7.836>
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1988). Isolación of plant DNA from fresh tissue. *Fucos*, 12.(13), 12–15.
- FAOSTAT. (2017). <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>
- Feng, Y. C., Hung, T. H., & Su, H. J. (2015). Detection and inoculation of peanut witches' broom phytoplasma (16SrII-A) and periwinkle leaf yellowing phytoplasma (16SrI-B) in citrus cultivars in Taiwan. *Journal of Phytopathology*, 163(5), 364–376. <https://doi.org/10.1111/jph.12331>
- Fuentes, A., Braswell, W. E., Ruiz-Arce, R., & Racelis, A. (2018). Genetic variation and population structure of *Diaphorina citri* using cytochrome oxidase I sequencing. *PLoS ONE*, 13(6), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198399>
- García-Pérez, F., Ortega-Arenas, L. D., López-Arroyo, J. I., González-Hernández, A., Lomeli-Flores, J. R., & Romero-Nápoles, J. (2013). Morphometry of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) on six rutaceae from Veracruz, Mexico. *Florida Entomologist*, 96(2), 529–537. <https://doi.org/10.1653/024.096.0218>
- García, F. (2013). Caracterización morfométrica y genética de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) de rutáceas en Czones, Veracruz, México. 1–89.
- Garza-Saldaña, J. J., Varela-Fuentes, S., & Gómez-Flores, W. (2017). Métodos para la detección presuntiva de Huanglongbing (HLB) en cítricos. *CienciaUAT*, 11(2), 93. <https://doi.org/10.29059/cienciauat.v11i2.783>

- Guidolin, A. S., Fresia, P., & Cónsoli, F. L. (2014). The genetic structure of an invasive pest, the Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). *PLoS ONE*, 9(12), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115749>
- Halbert, S. E., & Manjunath, K. L. (2006). Asian Citrus Psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and Greening Disease of Citrus: a Literature Review and Assessment of Risk in Florida. *Florida Entomologist*, 87(3), 330–353. [https://doi.org/10.1653/0015-4040\(2004\)087\[0330:acpspa\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1653/0015-4040(2004)087[0330:acpspa]2.0.co;2)
- Isidro Humberto Almeyda-León y Mario Alberto Rocha Peña. (2001, January). The Use of Polymerase Chain Reaction and Molecular Hybridization for Detection of Phytoplasmas in Different Plant Species in Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 10.
- Keremane, M. L., Ramadugu, C., Rodriguez, E., Kubota, R., Shibata, S., Hall, D. G., Roose, M. L., Jenkins, D., & Lee, R. F. (2015). A rapid field detection system for citrus huanglongbing associated ‘ Candidatus Liberibacter asiaticus ’ from the psyllid vector , *Diaphorina citri* Kuwayama and its implications in disease management. *Crop Protection*, 68, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.10.026>
- Lashkari, M., Manzari, S., Sahragard, A., Malagnini, V., Boykin, L. M., & Hosseini, R. (2014). Global genetic variation in the Asian citrus psyllid, *Diaphorinacitri* (Hemiptera: Liviidae) and the endosymbiont *Wolbachia*: Links between Iran and the USA detected. *Pest Management Science*, 70(7), 1033–1040. <https://doi.org/10.1002/ps.3643>
- Luo, Y., & Agnarsson, I. (2018). Global mtDNA genetic structure and hypothesized invasion history of a major pest of citrus, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). *Ecology and Evolution*, 8(1), 257–265. <https://doi.org/10.1002/ece3.3680>
- Mahrous, R. M., El-Attar, A. K., AlWtban, A., EL-Afifi, S., & Aref, N. M. (2018). Biological and Molecular Characterizations for Identification of a Phytoplasma Associated With Lemon Witches’-Broom in Egypt. *J. of Virol. Sci.*, 3, 1–12. <https://doi.org/ISSN:1685-168>
- Martín, L., Fuentes, H., Alfonso, M., López, U., Jaimes, R. G., Arroyo, J. I. L., Joaquín, J., Monreal, V., Santos, O., Enrique, L. I. C., & Martínez, M. Y. (2014). El huanglongbing y su vector *Diaphorina citri* en limón persa en nayarit: recomendaciones para su manejo (1st ed.).
- Moncayo, M., Almanza, M., & Caicedo, A. (2014). Diversidad genética de *diaphorina citri* en cultivos cítricos del valle del cauca y quindío (colombia) Genetic *diaphorina citri* diversity on citrus crops of the valle del cauca and quindío (colombia) diversidade genética de *Diaphorina citri* NA CULTURA. 12(2), 106–114.
- Mora-Aguilera, Robles-García., López-Arroyo, J., Flores-Sánchez., A.-S., & Domínguez-Monge., Gutierrez-Espinosa A., y L.-K. E. (2014). Situación Actual y Perspectivas del Manejo del HLB de los Cítricos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 32(2), 108–119.
- Paternina, L. E., Verbel-Vergara, D., & Bejarano, E. E. (2016). Comparación y utilidad de las regiones mitocondriales de los genes 16S y COX1 para los análisis genéticos en garrapatas (acari: Ixodidae). *Biomedica*, 36(2), 295–302.

<https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.3116>

- Pietersen, G., Africa, S., Box, P. O., Roux, H. F., Grange, H., Box, P. O., Lopes, S. A., Meyer, J. B., Pretorius, M. C., Schwerdtfeger, M., Vuuren, S. P. Van, & Yamamoto, P. (2004). A Survey for ‘ *Candidatus Liberibacter* ’ Species in South Africa Confirms the Presence of Only ‘ *Ca . L . africanus* ’ in Commercial Citrus. *94*(2).
- Robles-González, M. M., Velázquez-Monreal, J. J., Manzanilla-Ramirez, M. Á., Orozco-Santos, M., Medina-Urrutia, V. M., López-Arroyo, J. I., & Flores-Virgen, R. (2013). Síntomas Del Huanglongbing (HLB) en Árboles de Limón Mexicano [*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle] y su Dispersión en el Estado de Colima, México. *Revista Chapingo, Serie Horticultura*, *19*(1), 15–31. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2012.01.005>
- Sánchez, V. I. C. (2014). Variación morfométrica y genética de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) en rutáceas de Veracruz, México. 41. http://www.biblio.colpos.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/10521/2346/Cuellar_Sanchez_VI_MC_Entomologia_Acarologia_2014.pdf?sequence=1
- SIAP. (2017). *Avance Mensual programa*. http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalSinPrograma.do
- Ukuda-hosokawa, R., Sadoyama, Y., Kishaba, M., Kuriwada, T., & Anbutsu, H. (2015). Infection Density Dynamics of the Citrus Greening Bacterium “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” in Field Populations of the Psyllid *Diaphorina citri* and Its Relevance to the Efficiency of Pathogen. *81*(11), 3728–3736. <https://doi.org/10.1128/AEM.00707-15>