



Universidad Autónoma de Sinaloa
Facultad de Ciencias Químico Biológicas
Programa Regional de Posgrado en Biotecnología
Maestría en Ciencias con Orientación en Biotecnología

Relación Filogeográfica entre Haplotipos de
Bactericera cockerelli* Sulc y *Candidatus
***Liberibacter solanacearum* en los Estados de**
Guanajuato y Sinaloa

T E S I S

que presenta

Jesús Isaías Soto Plata

como requisito para obtener

el grado de

Maestría en Ciencias
con Orientación en
Biotecnología Agroalimentaria

Director de Tesis

Dr José Antonio Garzón Tiznado

Culiacán Rosales, Sinaloa, México

Julio 2016

PRESENTACIÓN

La presente investigación, titulada Relación filogeográfica entre haplotipos de *Bactericera cockerelli* Sulc y *Candidatus Liberibacter solanacearum* en los estados de Guanajuato y Sinaloa, se llevó a cabo en el laboratorio de Patología, Biología Celular y Molecular, ubicado en la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa. Como Asesores Académicos participaron: Dr José Ángel López Valenzuela, Dra Claudia León Sicaños y Dr José Antonio Garzón Tiznado (Director de Tesis), además se recibió apoyo por parte del Dr Ramón Pacheco Arjona, catedrático de CONACyT, en la parte correspondiente a la bioinformática. Para la realización del proyecto se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) teniendo el número de registro: 592103.

AGRADECIMIENTOS

Expreso mis más profundos agradecimientos a:

A Dios por permitirme cumplir un propósito más en la vida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el sustento económico durante el periodo comprendido de los estudios de postgrado.

Al doctor José Antonio Garzón Tiznado, por brindarme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo, asesoramiento y apoyo durante el desarrollo del proyecto de investigación.

A mis compañeros y amigos que siempre estuvieron pendientes de la evolución del proyecto, aconsejándome y brindándome su apoyo en todo el proceso de postgrado. En especial a los futuros doctores Claudia Melgoza y Luis Hernández, por su gran amabilidad y siempre disponibilidad de apoyo y asesoramiento en cualquier problema presentado durante el desarrollo del proyecto de investigación, sin duda alguna grandes personas siempre dispuestas a compartir conocimiento y experiencia.

Al doctor Ramón Pacheco Arjona, catedrático de CONACyT, por su gran ayuda referente a la parte bioinformática del proyecto, gracias por brindarme un valioso asesoramiento.

A mis padres, siempre orgulloso de ellos y agradecido infinitamente por todo el apoyo y amor que me han brindado desde que tengo uso de razón, personas maravillosas a quienes les debo todo lo que soy y he logrado, mil gracias por brindarme esta formación y educación a pesar de los grandes sacrificios que han hecho. ¡Dios los bendiga siempre señores de oro!

A mi esposa Sindi Acosta, gracias por hacerme el hombre más feliz del mundo entero, por ese ser tan amado que esperamos con ansias, gracias por tu amor, comprensión y toda la paciencia, eres una excelente compañera de vida, ¡un millón de gracias y que Dios te bendiga siempre!

INDICE GENERAL

	Pág.
INDICE DE FIGURAS	vii
INDICE DE CUADROS	viii
I RESUMEN	1
ABSTRACT	3
II INTRODUCCION	5
III REVISION DE LITERATURA	7
A. TAXONOMÍA DE <i>B. cockerelli</i>	7
B. MORFOLOGÍA DE <i>B. cockerelli</i>	7
1. Huevecillos	7
2. Ninfas	7
3. Adultos	8
C. CICLO BIOLÓGICO DE <i>B. cockerelli</i>	12
D. <i>B. cockerelli</i> COMO VECTOR DE <i>C. Liberibacter solanacearum</i>	14
E. HOSPEDANTES DE <i>B. cockerelli</i>	14
F. VARIACIÓN GENÉTICA EN <i>B. cockerelli</i>	14
G. BACTERIAS DEL GENERO <i>Candidatus Liberibacter</i>	15
1. <i>C. Liberibacter solanacearum</i>	16
H. DAÑOS CAUSADOS POR <i>Bactericera cockerelli</i> sulc	19
I. ENFERMEDADES ASOCIADAS A <i>C. Liberibacter solanacearum</i> y <i>B. cockerelli</i> COMO VECTOR	19
1. Permanente del tomate	19
2. Punta morada de la papa-manchado (zebra chip) del tubérculo	22
J. SECUENCIACIÓN DE ADN EN LA DETECCIÓN DE ORGANISMOS	25
K. COMPONENTES DE LA VARIACIÓN GENÉTICA	25
1. Diversidad genética	26
2. Diferenciación genética	26
3. Distancia genética	26
L. FILOGEOGRAFÍA	27
1. Marcadores utilizados en estudios filogeográficos	28

M. ADN MITOCONDRIAL (ADNmt)	29
1. Secuencias de ADN mitocondrial	31
N. GEN CITOCROMO OXIDASA I (COI)	32
O. ANÁLISIS DEL GEN RIBOSOMAL 16S	33
P. FILOGENÉTICA COMPUTACIONAL	34
Q. ÁRBOLES FILOGENÉTICOS	35
1. Tipos de árboles filogenéticos	35
2. Soportes de árboles filogenéticos	36
a. Soporte de Bremer o decay index	37
b. Bootstrap	37
c. Jackknife	37
d. aLRT	38
R. CÁLCULO DE LAS DISTANCIAS GENÉTICAS	38
1. Métodos basados en distancias genéticas	38
S. MÁXIMA PARSIMONIA	40
T. MÁXIMA VEROSIMILITUD	41
U. PRUEBAS DE NEUTRALIDAD	43
IV OBJETIVOS	44
A. OBJETIVO GENERAL	46
B. OBJETIVOS ESPECIFICOS	46
V MATERIALES Y METODOS	45
A. COLECTA DE <i>B. cockerelli</i> Y <i>C. Liberibacter solanacearum</i>	47
B. EXTRACCIÓN DE ADN DE <i>B. cockerelli</i> Y <i>C. Liberibacter solanacearum</i>	55
C. ANÁLISIS POR PCR PUNTO FINAL DE GENES DE INTERÉS	56
1. Gen Citocromo Oxidasa I para la detección de <i>B. cockerelli</i>	56
2. Gen 16S para la detección de <i>C. Liberibacter solanacearum</i>	57
D. ELECTROFORESIS Y DETECCIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR	57
E. PURIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR	58
F. ALINEAMIENTO Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE SECUENCIAS	58
VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
A. COLECTA DE <i>B. cockerelli</i> Y <i>C. Liberibacter solanacearum</i>	60

B. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR	63
1. Amplificación de COI en <i>B. cockerelli</i>	63
2. Amplificación del Gen 16S de <i>C. Liberibacter solanacearum</i> en <i>B. cockerelli</i>	63
C. ALINEAMIENTO Y ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS COI DE <i>B. cockerelli</i> Y 16S DE <i>C. Liberibacter solanacearum</i>	64
1. Secuencias correspondientes a COI	66
a. Alineamiento	66
b. Determinación de haplotipos de <i>B. cockerelli</i> con base en las secuencias obtenidas de Citocromo Oxidasa I	68
c. Determinación de la filogenia de <i>B. cockerelli</i> en base a su gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I	73
2. Secuencias correspondientes a la región 16S de <i>C. Liberibacter solanacearum</i> en <i>B. cockerelli</i>	76
a. Alineamiento	76
b. Determinación de haplotipos de <i>C. Liberibacter solanacearum</i> en base a las secuencias obtenidas de la región 16S	78
c. Determinación de la filogenia de <i>C. Liberibacter solanacearum</i> en base a la región 16S	84
VII CONCLUSIONES	87
VIII BIBLIOGRAFIA	88
Glosario y abreviaturas	93

INDICE DE FIGURAS

Fig.	Descripción	Pág.
1	Huevos (A), Ninfas (B) y Adulto (C) de <i>B. cockerelli</i>	11
2	Síntomas del permanente del tomate	21
3	Planta de papa con síntomas de punta morada	23
4	Síntomas del “Manchado del tubérculo” en papa	24
5	Organización de genes del ADN mitocondrial	30
6	Comportamiento de la temperatura anual en el estado de Sinaloa	48
7	Comportamiento de la temperatura anual en el estado de Guanajuato	49
8	Comparativo de temperatura promedio entre los estados de Sinaloa y Durango	50
9	Ubicación geográfica y distancia entre los sitios de muestreo, Sinaloa y Guanajuato	51
10	Ninfas de <i>B. cockerelli</i>	61
11	<i>B. cockerelli</i> en estado adulto	62
12	Productos de amplificación por PCR de la región mitocondrial citocromo oxidasa subunidad I (COI) en <i>B. cockerelli</i>	64
13	Productos de amplificación por PCR de la región 16S de <i>C. Liberibacter solanacearum</i> en <i>B. cockerelli</i>	65
14	Alineamiento y comparación de las secuencias obtenidas para Citocromo Oxidasa I entre los sitios de muestreo y accesiones registradas en GenBank	67
15	Árbol consenso en neighbor-joining para <i>B. cockerelli</i>	74
16	Árbol consenso en Máxima Verosimilitud para <i>B. cockerelli</i>	75
17	Alineamiento y comparación de las secuencias obtenidas para 16S entre los sitios de muestreo y accesiones registradas en GenBank	77
18	Árbol consenso en neighbor-joining para <i>C. Liberibacter solanacearum</i> en <i>B. cockerelli</i>	85
19	Árbol consenso en Máxima Verosimilitud para <i>C. Liberibacter solanacearum</i> en <i>B. cockerelli</i>	86

INDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Pág.
1	Dimensiones (en micras) de los estados biológicos de <i>B. cockerelli</i>	10
2	Ciclo biológico del insecto vector en función de unidades calor requeridas	13
3	Coordenadas geográficas de los sitios de recolecta de <i>B. cockerelli</i> en México.	52
4	Características físicas de los sitios de recolecta	53
5	Análisis de divergencia de ADN entre poblaciones en base al gen mitocondrial COI, empleando el programa DNAsp	70
6	Análisis de divergencia de ADN y pruebas "TajimaD" y "Fu and Li" para las 15 secuencias utilizadas de la fracción del gen mitocondrial COI, empleando el programa DNAsp	71
7	Representación del número de sitios variables para COI; "S".	72
8	Análisis de divergencia de ADN entre poblaciones en base a la región 16S, empleando el programa DNAsp	80
9	Análisis de divergencia de ADN y pruebas "TajimaD" y "Fu and Li" para las 31 secuencias utilizadas de la fracción de la región 16S, empleando el programa DNAsp	82
10	Representación del número de sitios variables para 16S; "S"	83

I RESUMEN

Bactericera cockerelli sulc es un insecto migratorio, siendo la temperatura un factor crítico en el desarrollo, crecimiento poblacional y rangos de distribución del mismo. Este insecto fue descubierto en 1909 en el estado de Colorado, E.U.A por Cockerell, posteriormente y a manera de reconocimiento el doctor Sulc lo bautizo científicamente como *Trioza cockerelli*, aunque más tarde se le cambio el nombre a *Paratrioza cockerelli*, provoca dos tipos de daños a la planta: el toxínifero o directo y el indirecto como trasmisor de una bacteria identificada como *Candidatus Liberibacter solanacearum*. La toxina de *B. cockerelli* daña a las células que producen clorofila en las hojas de las plantas lo que hace que se vean amarillentas y raquíticas, por contraparte, la bacteria es la causante verdadera del daño a las plantas infectadas. Estudios a nivel mundial dirigidos hacia el insecto y la bacteria han logrado identificar haplotipos existentes para *B. cockerelli* y *C. Liberibacter* en base a estudios efectuados en el gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI) para el caso del insecto y en la región 16S para la bacteria. Para *B. cockerelli* los haplotipos identificados fueron nombrados como "Central", "Oeste", "Noroeste" y "Suroeste" mientras que para el caso de la bacteria fueron nombrados como "A", "B" y "C". El objetivo del presente estudio se centró en establecer una relación filogeográfica entre los haplotipos reportados y anteriormente nombrados, previamente identificando y analizando la filogenia de ambos organismos colectados en los estados de Sinaloa y Guanajuato, se eligieron estos estados debido a reportes de presencia del insecto plaga, las diferencias geográficas y medio ambientales tan marcadas como son altitud, temperatura y tipo de vegetación además de que entre ambos estados se tiene una diferencia en tiempo de detección de 18 años, identificándose en Guanajuato en 1984 y en Sinaloa a partir del año 2002. Mediante la técnica de PCR punto final se lograron amplificar secciones de genes para la identificación tanto del insecto como de la bacteria, se trabajó con oligos específicos para una sección del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I para la identificación de *B. cockerelli* y la región 16S para la identificación de *C. Liberibacter Solanacearum*, se colectaron muestras de diferentes regiones de los estados de Guanajuato y Sinaloa a las cuales se logró amplificar los fragmentos de interés, estos se purificaron, secuenciaron y se sometieron a análisis bioinformáticos empleando los software DNAsp y MEGA6. Los resultados obtenidos muestran la presencia de un haplotipo para el insecto y uno para la bacteria en ambos estados de estudio, estos haplotipos coinciden con el haplotipo reportado como "Central" para el insecto y haplotipo "B" para la bacteria. Los comparativos de los valores de diversidad nucleotídica expresado como π arrojaron que la menor diversidad entre los haplotipos existentes para *B. cockerelli* se encuentra entre los haplotipos "Central", encontrado en este estudio, y "Oeste" con un valor de 0.00079 teniendo un único sitio variable en la secuencia de nucleótidos en la posición número 51 (T-C), mientras que para el caso de *C. Liberibacter solanacearum*, en nuestro estudio se encontró asociada al haplotipo "B", el comparativo de π entre los haplotipos "A" y "B" es igual a 0.00092, con sitios variables en las posiciones 167 (G-T) y 540 (C-T), mientras que entre "B" y "C" π es igual a 0.0011 con sitios variables en las posiciones 167 (G-T), 540 (C-T) y 998 (A-G). Estos resultados sugieren que existe una relación de afinidad filogenética o asociación entre el haplotipo "Central" de *B. cockerelli* con el haplotipo "B" de *C. Liberibacter solanacearum* y viceversa. En base a lo anterior, para el caso de la relación filogeográfica, los resultados arrojaron resultados similares entre los haplotipos identificados para ambas entidades, lo que nos indica que las diferencias de las características agroclimáticas de los sitios de muestreo en donde se realizó la colecta del insecto y la bacteria en las entidades de Sinaloa y Guanajuato, no han impactado en la variabilidad a nivel genético entre ambos organismos de manera significativa durante el tiempo que tienen de estar interactuando entre sí.

ABSTRACT

Bactericera cockerelli Sulc is a migratory insect, the temperature a critical factor in development, population growth and range of distribution. This insect was discovered in 1909 in the state of Colorado, USA by Cockerell later and by way of recognition Dr. Sulc baptized scientifically as *Trioza cockerelli*, although later changed the name to *Paratrioza cockerelli*, it causes two types of damage in plants: toxicological or direct and indirect as a transmitter of a bacterium identified as *Candidatus Liberibacter solanacearum*. *B. cockerelli*'s toxin damages the cells that produce chlorophyll in the leaves of plants which makes them look yellowed and stunted, by counterparty, the bacteria is the true cause of damage to infected plants. In Mexico, *B. cockerelli* has been linked with two contagious diseases: "permanent tomato" and "purple top potato-stained tuber", and recently with the potato disease known as "zebra chip" which it has related to *C. Liberibacter* as a causative agent, the discovery of this bacteria is relatively new and its peculiarity is that it attacks Solanaceae plants such as tomatoes, potatoes and chili causing significant losses in performance and monetary accordingly. Global studies directed toward the insect and the bacteria have been identified haplotypes exist for *B. cockerelli* and *C. Liberibacter* based on studies in the mitochondrial gene Cytochrome Oxidase I (COI) in the case of the insect and the region 16S for bacteria. For *B. cockerelli* the identified haplotypes were named as "Central", "West", "Northwest" and "Southwest" while for the case of the bacteria were named as "A", "B" and "C". The aim of this study focused on establishing a phylogeographic relationship between haplotypes reported previously, identifying and analyzing the phylogeny of both organisms collected in the states of Sinaloa and Guanajuato, these states were chosen because of reports of presence of insect pest, geographical differences and environmental as marked are as height, temperature and type of vegetation in addition to the two states have a difference in detection time of 18 years identified in Guanajuato in 1984 and Sinaloa from 2002. By PCR endpoint managed amplify sections of genes for identification of both the insect and the bacteria, working with oligos specific for a section of the mitochondrial gene Cytochrome Oxidase I for identification of *B. cockerelli* and 16S region for the identification of *C. Liberibacter solanacearum*, samples from different regions of the states of Guanajuato and Sinaloa, which were amplified fragments of interest were collected, this fragments were purified, sequenced and subjected to bioinformatic analysis using the DNAsp and MEGA6 software. The results show the presence of a haplotype for the insect and one for the bacteria in both states study, these haplotypes match the haplotype reported as "Central" for the insect and haplotype "B" for the bacteria. Comparative values expressed as π nucleotide diversity showed that the lower diversity between existing haplotypes for *B. cockerelli* is among the "Central" haplotypes, found in this study, and "West" with a value of 0.00079 having a single variable site in the nucleotide sequence in the number 51 position (T-C), while for the case of *C. Liberibacter solanacearum* in our study was found associated haplotype "B", the comparison of π between haplotypes "A" and "B" is equal to 0.00092, with variable sites in the 167 positions (G-T) and 540 (C-T), while between "B" and "C" π equals 0.0011 with variable sites in the 167 positions (G-T), 540 (C-T) and 998 (A-G). These results suggest that there is a relationship of phylogenetic affinity or association between the "Central" haplotype of *B. cockerelli* with "B" haplotype of *C. Liberibacter solanacearum* and vice versa. Based on the above mentioned, in the case of the phylogeographic relationship, the results showed similar results among the haplotypes identified for both entities, which indicates that differences in agro-climatic characteristics of the sampling sites where the collection was made of insect and the bacteria in the entities of Sinaloa and Guanajuato, have not impacted the variability at the genetic level between the two agencies significantly during the time they have to be interacting with each other.

II INTRODUCCION

Bactericera cockerelli Sulc es un insecto migratorio, siendo la temperatura un factor crítico en su desarrollo y crecimiento poblacional así como en distribución del mismo. A este insecto se le ha identificado como vector de una bacteria no cultivable con efectos patógenos a las plantas huésped, es denominada *Candidatus Liberibacter solanacearum*, el descubrimiento de esta bacteria es relativamente nuevo y su particularidad es que ataca a las plantas solanáceas como el tomate, papa y chile ocasionando pérdidas significativas en rendimiento de los cultivos. Dentro del grupo de los psílidos, tanto los insectos adultos como las ninfas se alimentan de la planta, dos de estos ejemplos los tenemos con *Cacopsylla pyricola*, transmisor de la enfermedad conocida como tristeza del peral o marchitez del peral en E.U.A y *B. cockerelli*, vector de *C. Liberibacter solanacearum* que ocasionan enfermedades severas en papa, tomates y chile. Comúnmente se le conoce como psílido de la papa o “pulgón saltador”, presenta un aparato bucal tipo picador-chupador, se alimenta de los tejidos del floema, exclusivamente de la savia de las plantas, a las cuales puede inyectar una toxina que causa daños temporales o también puede ser vector de patógenos causantes de enfermedades. En el valle de Culiacán, se han detectado principalmente los estados inmaduros de *B. cockerelli* sulc (Garzón-Tiznado *et al*, 2010). Aunque es una plaga predominante de los cultivos de papa y tomate posee un amplio rango de hospedantes alternos tales como los cultivos de berenjena, chile, tabaco y tomate de cascara y especies comunes de maleza: toloache (*Datura stramonium* L.), tomatillo (*Physalis ixocarpa* Brot.), hierba mora (*Solanum nigrum* L.) y mala mujer (*Solanum rostratum* L.). *B. cockerelli* se constituyó por primera vez como plaga de importancia en el estado de Guanajuato (Garzón-Tiznado *et al*, 1984) y posteriormente en otras regiones como Villa de Arista, San Luis Potosí y la región de Comarca Lagunera durante la temporada agrícola de 1997 (Vega *et al*, 2008). En esta temporada todos los plantíos de tomate fueron severamente afectados por esta plaga presentándose niveles de incidencias por arriba del 50% de plantas dañadas. En el valle de Culiacán, Sinaloa, se detectó por primera vez en altas infestaciones en el campo Estrella, en el cultivo de berenjena a principios de enero de 2002 y durante el mes de febrero del mismo año en tomate tipo Grape, causando el síntoma de amarillamiento del psílido; durante este mismo periodo también se encontró en los campos el Vergel y Paralelo 38 causando daños de importancia en chile bell pepper (López *et al*, 2003). Según

reportes, se estimaron las pérdidas directas en la producción de frutos ocasionadas por el psílido en tomate tipo Grape, encontrando que éstas fueron de 33 y 55% en cultivos establecidos durante la primera y segunda etapa, respectivamente (López *et al*, 2003). En el Ciclo agrícola 2007-2008 en el Valle de La Cruz de Eto, se detectó hasta un 90% de plantas infectadas por el permanente del tomate en el mes de Abril, lo que ocasionó que la temporada se terminara antes del mes de mayo, que es lo normal, lo anterior indica la peligrosidad de esta enfermedad, que además ya fue detectada en cultivos en el estado de Sonora (Garzón-Tiznado *et al*, 2010).

Se tienen identificados cuatro haplotipos para *B. cockerelli* denominados como "Central", "Oeste", "Noroeste" y "Suroeste" (Swisher *et al*, 2014) y tres haplotipos identificados para *C. Liberibacter solanacearum* que son transmitidos por el psílido de la papa, denominados como "A", "B" y "C" (Nelson *et al*, 2011) pero no se tienen estudios que relacionen filogeográficamente a esta bacteria con su antes mencionado vector y viceversa, por ello la importancia de realizar estudios dirigidos hacia la identificación tanto del vector como de la bacteria tomando en cuenta las condiciones físicas del entorno geográfico en donde se encuentren, en específico variaciones genéticas del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I para el caso del insecto y de la región 16S para la bacteria ya que se tiene como hipótesis que dependiendo de la región, sometidos a diferentes condiciones de temperatura, humedad, tipo de suelo, entre otras variables físicas, las características a nivel molecular tanto del insecto vector como del agente patógeno cambian, con ello se tiene como objetivo general de identificar haplotipos de *B. cockerelli* y haplotipos de *C. Liberibacter Solanacearum* para establecer su relación filogeográfica.

III REVISION DE LITERATURA

A. TAXONOMÍA DE *B. cockerelli*

Los psílidos o piojos saltadores en plantas son un grupo pequeño de insectos que se alimentan de la savia de estas. Junto con afidos, escama y mosquitas blancas pertenecen al grupo de insectos conocidos como Sternorrhyncha. Este nombre se deriva del griego sternon –pecho o seno- y rhynchos –nariz, hocico-, lo cual se refiere a la localización ventral de las partes bucales de estos insectos.

B. cockerelli es un insecto que pertenece al Orden Hemiptera; Sub-orden Sternorrhyncha; Superfamilia Psylloidea y la Familia Psyllidae, por lo que se le conoce también con el nombre de psílido. Algunas especies de esta familia junto con la Cicadellidae y Fulgoridae, se han descrito como vectores de procariones (Garzón-Tiznado *et al*, 2010).

B. MORFOLOGÍA DE *B. cockerelli*

1. Huevecillos

Estos son de forma ovoide, color anaranjado amarillento brillante, presentan en uno de sus extremos una coloración naranja y en este un pedicelo con el cual se adhieren a las hojas.

2. Ninfas

Las ninfas de los psílidos presentan un aspecto aplanado dorso-ventral, son menos móviles que los adultos y generalmente se encuentran congregadas. Las ninfas de algunas especies de psílidos estas cubiertas con secreciones de cera blanca y otras son formadoras de agallas. En el mundo existen más de 3000 especies de psílidos descritas que en su mayoría se alimentan de plantas dicotiledóneas (Garzón-Tiznado *et al*, 2010).

- **Primer instar.** Son de color naranja, presentan antenas con los segmentos basales cortos y gruesos, los cuales se adelgazan hasta finalizar en un pequeño segmento con dos setas sensores; los ojos son de color rojo o naranja. Durante este instar no se observan paquetes alares; las patas presentan una segmentación poco visible al igual que el abdomen.
- **Segundo instar.** Se observa claramente la constricción entre el cuerpo, cabeza y abdomen. La cabeza es de color amarillento, las antenas son filiformes con un par de setas sensores en la parte apical, los ojos son de color anaranjado oscuro, el tórax es de color verde amarillento, se observan los paquetes alares, se presenta la segmentación en las patas.

Tanto tórax y abdomen son de mayor tamaño así como las estructuras en cada uno de ellos. El abdomen es de color amarillo y presenta un par de espiráculos en los cuatro primeros segmentos.

- **Tercer Instar.** Se definen perfectamente las constricciones del cuerpo, la cabeza es de color amarillo, las antenas se adelgazan en la parte media para terminar con dos setas sensoras; la coloración de los ojos es rojiza, se observa en el tórax con mucha facilidad los dos pares de alas en el mesotórax y metatórax; este es de color verde amarillento, el abdomen es de color amarillo y es más redondo inmediatamente abajo del segundo par de alas.
- **Cuarto Instar.** La cabeza es de color amarillo, los ojos son de color rojo oscuro, las antenas continúan con las mismas características, la segmentación de las patas se encontró tan definida que se puede apreciar en la parte terminal de las tibiae posteriores tres espuelas, así como dos segmentos tarsales y un par de uñas.
- **Quinto Instar.** La cabeza y abdomen son de color verde claro, el tórax con una tonalidad más oscura, las antenas están divididas en dos partes por una hendidura muy marcada la parte basal es gruesa y la apical es filiforme. Presenta seis placoides sencillas muy visibles; los ojos se tornan de color guinda, presentan tres espuelas en la parte terminal de las tibiae posteriores y dos segmentos dorsales y un par de uñas, el abdomen es de forma semicircular (Garzón-Tiznado *et al*, 2010).

3. Adultos

Las formas adultas presentan dos pares de alas con venación reducida y su capacidad de vuelo no es muy buena, sin embargo han desarrollado patas fuertes que les permiten saltar, por esta característica se deriva su nombre común de piojos saltadores (Garzón-Tiznado *et al*, 2010). Estos son de un color gris oscuro parecidos a los pulgones como anteriormente se mencionó. Tienen un aparato bucal picador-chupador el cual está armado con un estilete formado por dos conductos semejantes a un par de “popotes”, uno para la entrada y otro para salida el cual es tan largo como el tamaño de su cuerpo. En la planta, las ninfas o los adultos introducen este par de “popotes” hasta el floema el cual es un conducto por donde fluyen los nutrientes, por un conducto el insecto se alimenta y por el otro conducto inyecta su saliva a la planta (Garzón-Tiznado *et al*, 2010).

En un estudio referente a la estructura externa de *B. cockerelli* se indica que el adulto mide en promedio 1.4 mm de longitud, es de color café y presenta una banda de color blanco en la cabeza y tórax, las antenas miden de 0.52 a 0.70 mm de largo y presentan un órgano sensitivo en el cuarto segmento (Crawford, 1914). Recién emergidos son de color verde amarillento con las alas blancas, permanecen emergidos durante las primeras tres o cuatro horas tornándose las alas durante este tiempo en incoloras o transparentes, la cabeza y tórax cambian de color y son amarillo ámbar, posteriormente a café claro hasta llegar a café oscuro o negro.

Las hembras pueden depositar hasta 510 huevecillos durante su ciclo de vida y pueden vivir tres veces más que los machos. Las hembras y los machos se pueden diferenciar por el ápice en el abdomen, en la hembra el ovopositor es corto, bien redondeado y más grande que el del macho. Los genitales del macho tienen una apariencia más obtusa.

Cuadro 1: Dimensiones (en micras) de los estados biológicos de *B. cockerelli*.

Estado Biológico	Largo	Ancho
Huevecillo	423	210
Ninfa primer instar	400	200
Ninfa segundo instar	500	304
Ninfa tercer instar	725	525
Ninfa cuarto instar	1000	758
Ninfa quinto instar	1533	1033
Adulto	1588	667

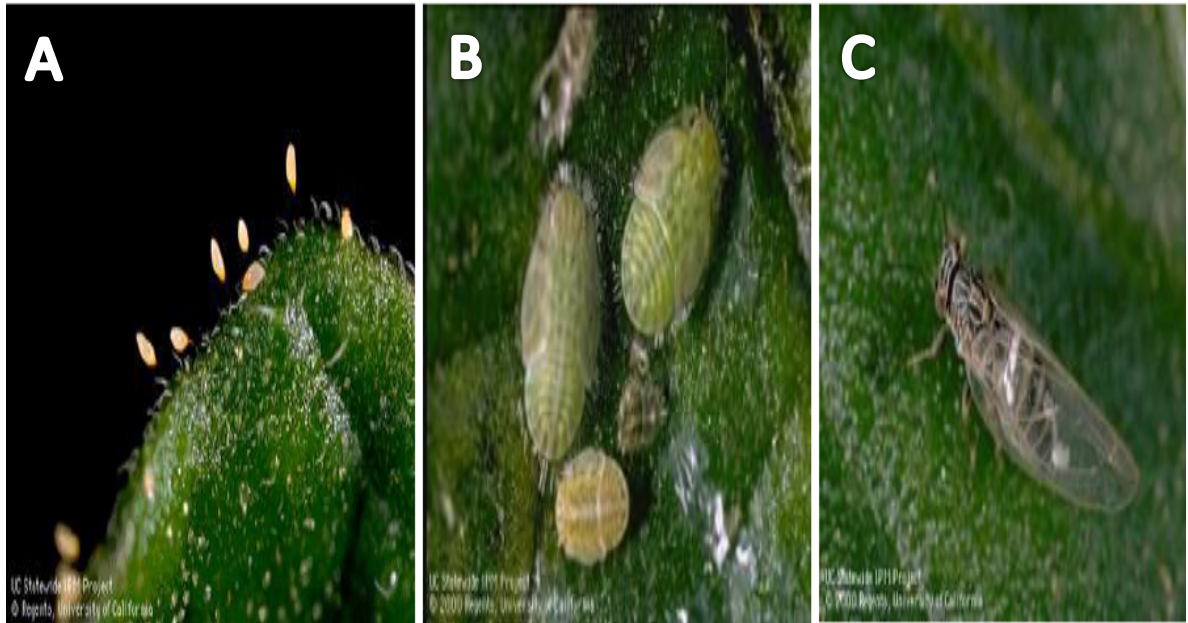


Figura 1: Huevos (A), Ninfas (B) y Adulto (C) de *B. cockerelli*. *B. cockerelli* en sus diferentes estados morfológicos alimentándose de la planta hospedera, los huevecillos (A) presentan un pedicelo o patita con la cual se sostienen y alimentan de la planta hasta pasar a las etapas ninfales (B), estas etapas van desde el primer al quinto instar para finalmente pasar a la etapa adulta (C), en esta etapa el cuerpo del pulgón saltador está perfectamente formado, presentando alas bien definidas y un aparato bucal tipo “picador-chupador” el cual lo emplea para alimentarse del hospedero y de manera indirecta para la transmisión de agentes patógenos a la planta (López *et al*, 2013).

C. CICLO BIOLÓGICO DE *B. cockerelli*

El ciclo biológico de *B. cockerelli* comprende de un periodo de incubación de 3 a 15 días y la totalidad del desarrollo ninfal de 14 a 17 días; después de la eclosión, la ninfa pasa por 5 instares requiriendo de 1 a 5 días, 1 a 4 días, 1 a 5 días y de 3 a 9 días respectivamente. Se necesitó aproximadamente de 30 días desde la copulación hasta el adulto, además en 127 individuos analizados que completaron su desarrollo, 62 fueron machos y 65 hembras dando una proporción aproximada de 1:1 (Knowlton *et al*, 1931).

La relación que existe entre la temperatura y la vida del insecto indica una reproducción óptima a los 26.67 °C, su desarrollo es afectado por temperaturas altas, por encima de 35 °C que ocurran durante 2 o 3 horas por día, a esta temperatura elevada la eclosión de los huevecillos se lleva a cabo de 2 a 3 días. Por otra parte temperaturas por debajo de 15.5 °C también afecta en gran medida el desarrollo del insecto (List, 1939). Sin embargo en otros estudios se ha observado que la temperatura óptima para el desarrollo del insecto oscilaba entre los 20 y 23 °C, con una temperatura crítica inferior de 7 °C, los insectos adultos son más tolerantes a las condiciones no óptimas de temperatura. Se ha mostrado alta mortalidad en huevos y ninfas a una exposición continua por 2 horas a 38°C, a temperaturas mayores de 30°C la ovoposición, incubación y supervivencia de ninfa se ven reducidas (Abdullah, 2008).

Por otra parte como los insectos son poiquiloterms, es decir, que su velocidad de desarrollo está determinada en gran parte por la temperatura, su edad fisiológica debe definirse en base a grados día o unidades de calor. Para este insecto se determinó que la temperatura umbral mínima de desarrollo es de 7 °C y se confirmó que temperaturas superiores a los 35 °C afectan su desarrollo. Su ciclo biológico bajo las condiciones anteriores de desarrollo se completó de huevecillos a adulto en 356 unidades calor ($T^{\circ}\text{C min} + T^{\circ}\text{C max} / 2 - 7^{\circ}\text{C}$).

Cuadro 2: Ciclo biológico del insecto vector en función de unidades calor requeridas.

Estado biológico	UC
Huevecillo – Primer Instar	71.72
Primero – Segundo Instar	53.68
Segundo – Tercer Instar	47.58
Tercero – Cuarto Instar	54.40
Cuarto – Quinto Instar	47.92
Quinto – Adultos	80.51
Total	355.81

D. *B. cockerelli* COMO VECTOR DE *C. Liberibacter solanacearum*

En México se ha relacionado a *B. cockerelli* con dos enfermedades contagiosas: “permanente del tomate” y “punta morada de la papa-manchado del tubérculo”, y recientemente con la enfermedad de la papa denominada “zebra chip” la cual se le ha relacionado a la bacteria *Candidatus Liberibacter solanacearum* como agente causal (Garzón-Tiznado *et al*, 2010).

No obstante el daño que causa en cultivos de papas y tomates no es de gran importancia a nivel nacional, la gravedad radica en el patógeno transmitido por dicho insecto, *C. Liberibacter solanacearum*, anteriormente solo denominado “fitoplasma” y que ha diezmando la producción de tomate en México en un 45% y ha causado un daño similar a cultivos de papa a nivel nacional ocasionando pérdidas mayores a los virus transmitidos por la mosquita blanca.

E. HOSPEDANTES DE *B. cockerelli*

B. cockerelli tiene un amplio rango de hospedantes cultivados y silvestres. Este insecto ataca a las solanáceas, aunque el cultivo de la papa es de los más preferidos por las hembras para depositar los huevecillos. Se considera que el ciclo biológico no se modifica en tanto a los cultivos de papa o tomate, sin embargo el estado ninfal es más prolongado en aquellas especies de plantas que no pertenecen a la familia antes señalada.

F. VARIACIÓN GENÉTICA EN *B. cockerelli*

B. cockerelli es un insecto migratorio que no sobrevive a los inviernos en las Grandes Llanuras de los Estados Unidos sin refugio artificial, particularmente los Altos Llanos ubicados en Nebraska, Colorado, Kansas y Dakota del Sur. La temperatura es un factor crítico en el desarrollo de este insecto pues no toleran altas temperaturas, prefiriendo 26°C. En el sur de México y Centroamérica, no puede sobrevivir a temperaturas de verano por lo que migra al norte por los Grandes Llanos y la costa occidental. Es capaz de sobrevivir un año al sur de Texas y Norte de México donde las temperaturas son óptimas y el alimento está disponible continuamente. El hábito característico, sin embargo, ha sido la migración hacia el norte durante la primavera y el verano, y su dispersión es facilitada enormemente por el viento que le permite ser llevado a grandes distancias (Abernathy, 1991; Knowlton *et al*, 1931).

Este insecto desarrolló grandes poblaciones con migraciones primaverales en el sur de Arizona de enero a mayo sobre plantas silvestres del género *Lycium*. Típicamente, *B. cockerelli*

luego migró a Colorado, Nebraska y otros estados del norte (Romney, 1931). Sin embargo, el origen anual de las poblaciones ocurrió mucho más lejos y migraron del sur de Texas (cerca del Río Grande) o incluso de México que posteriormente migraron a Arizona y Nuevo México (Pletsch, 1947). A partir del 2001 comienza a presentarse esta plaga al sur de California en zonas donde infestaciones de este insecto son históricamente raras. Se plantean dos hipótesis para el origen de estos: 1) que las poblaciones a lo largo de la costa oeste de Norte América pudieron haberse originado en Baja California, México (posiblemente por movimientos de trasplantes de México) o 2) de mucho más lejos, al este cercano al sur de Texas (Liu *et al*, 2006). Estos antecedentes llevaron a investigaciones que tenían por finalidad el determinar si esta nueva presencia era el resultado de un simple rango de expansión en su distribución o la evolución de un nuevo haplotipo de *B. cockerelli*. Esto fue posible utilizando secuencias repetidas de marcadores (ISSR) así como las secuencias del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI), un espaciador interno transcrito (ITS2) y del gen *wsp* (Liu *et al*, 2006) el cual codifica para una proteína de superficie que ha sido utilizado en la caracterización de diferentes líneas de *Wolbachia*, (Van Meer *et al*, 1999) cuyo árbol filogenético derivado de ADN ribosomal 16S-23S concuerda con el filograma derivado del hospedero *B. cockerelli*, demostrando una coespeciación de los endosimbiontes con sus hospederos (Thao *et al*, 2001).

Para ello se estudiaron poblaciones de *B. cockerelli* provenientes de California, Colorado y Nebraska, EUA, así como Baja California y Coahuila, México. Encontrando que las poblaciones de estudio se encuentran divididas en dos grupos, uno formado por las poblaciones del centro de Estados Unidos y este de México y el otro formado por el oeste de Norte América. Con ello, corroboraron su hipótesis inicial que establecía que las nuevas poblaciones del insecto en la parte oeste de Estados Unidos de América corresponden a un nuevo haplotipo el cual tiene sus orígenes en Baja California, México (Liu *et al*, 2006).

G. BACTERIAS DEL GENERO *Candidatus Liberibacter*

A partir del análisis filogenético del gen 16S, el espacio de la región intergénica 16S/23S y el operon *rp/KAJL-rpoBC* se ha demostrado que los organismos tipo bacteria (OTB) son nuevas cepas de *Candidatus Liberibacter*. Estudios realizados con microscopía electrónica y técnicas citoquímicas han demostrado que *C. Liberibacter* está rodeada por una membrana celular

compuesta de peptidoglicano, típica de las bacterias Gram negativas. Además al analizar cortes ultra delgados de tejido de floema de cítricos con HLB observados en microscopio transmisión electrónica se ha observado que estas bacterias miden entre 0.1 μm y 0.3 μm de ancho y de 2 μm a 3 μm de longitud.

Actualmente se conocen cuatro cepas de *C. Liberibacter*, las que causan el HLB de los cítricos: *C. Liberibacter asiaticus*, *C. Liberibacter americanus* y *C. Liberibacter africanus* transmitidas por los insectos vectores *Diaphorina citri* y *Trioza erytreae*; y *C. Liberibacter solanacearum* una nueva cepa asociada a solanáceas como tomate, papa y chile. Aunque las primeras cepas de *C. Liberibacter* se determinaron en cultivares de cítricos, otros hospedantes naturales de la bacteria son árboles de rutáceas ornamentales como *Calodendrum capense* (Castaño del cabo) y *Murraya paniculata* (Azahar de la India) y una amplia gama de plantas de la familia de las solanáceas.

1. C. Liberibacter solanacearum

C. Liberibacter solanacearum es una nueva cepa de *C. Liberibacter* cuyo nombre específico se refiere a la familia de plantas de donde fue aislada. Análisis de microscopía de transmisión electrónica revelaron que miden entre 0.2 μm de ancho y 4 μm de longitud (Liefting *et al*, 2009). Aunque su nombre es reciente, el diagnóstico molecular de las enfermedades causadas por este patógeno no ha resultado sencillo por tratarse de una bacteria no cultivable. Sin embargo, existen varios reportes que de acuerdo con la sintomatología confirman la presencia de la bacteria anteriormente identificada como fitoplasma y OTB en plantas de tomate, papa y recientemente en chile, estudios en los que además se identifica *B. cockerelli* como el vector que la transmite el patógeno. En estudios recientes a partir de SNPs de la región 16S-ISR-23S de RNAr y genes de la proteína 50S ribosomal se describieron tres haplotipos geográficos de la bacteria (Nelson *et al*, 2011), dos asociados a enfermedades en papa y otras solanáceas y un tercer haplotipo asociado a la enfermedad en zanahorias transmitido por *Triosa apicalis*. Aunque no se han realizado estudios sobre el efecto de las condiciones ambientales sobre el desarrollo de la bacteria en el vector y las plantas, se ha demostrado que la temperatura tiene efecto significativo sobre el desarrollo de la bacteria en plantas de papa a diferencia de los *Liberibacter* asociados al HLB en cítricos que son sensibles al calor y no toleran temperaturas arriba de 32°C. Estudios realizados en plantas de papa

con la bacteria como fuente de inóculo, se observó que a temperaturas menores de 17°C se reduce considerablemente el desarrollo de *C. Liberibacter solanacearum* (Lin *et al*, 2011), y que el desarrollo óptimo de la bacteria y los síntomas de la enfermedad se observan en un período de 27 a 32°C; y en períodos de temperatura más elevados, de 32 a 35°C y 35 a 40°C no se identificaron síntomas de la enfermedad ni bacteria en la fuente de inóculo.

En 1993 se reportó por primera vez en México, como el agente causal de la pigmentación morada en las hojas, reducción de tamaño de la planta y necrosis interna de los tubérculos de la papa; posteriormente se detectó esta bacteria en los cultivos de tomate, chile y berenjena. Sin embargo, la distribución de las plantas sintomáticas en el campo no tenía un patrón definido hasta que en 2009 se observó la totalidad de plantas atípicas de chile jalapeño en dos campos de los estados de Nayarit y Jalisco. Las plantas tuvieron una reducción de tamaño en un 30%, hojas con coloración verde pálido y deformación de los frutos en un 100% (Olivares, 2013).

A la enfermedad denominada Zebra Chip presente en papa se le ha identificado como asociada al grupo de las alfaproteobacterias dentro de las cuales se encuentra *C. Liberibacter solanacearum*. La expresión de los síntomas de esta enfermedad se caracteriza por presentar un patrón de bandas oscuras y claras en tubérculos crudos y en papas fritas (Liefting *et al*, 2009).

Las liberibacterias son parásitas obligadas del floema en plantas vasculares, Gram-negativas, no cultivables. Las especies de "*Candidatus Liberibacter*" en imágenes de microscopía electrónica revelan morfología de forma de bacilos. Se transmiten de plantas infectadas a sanas mediante insectos vectores e injertos. Especies de *Candidatus Liberibacter* pertenecen a las Alphaproteobacterias, con sus familiares más cercanos pertenecientes a los generos *Bradyrhizobium*, *Bartonella*, *Agrobacterium*, *Brucella* y *Afipia* (Liefting *et al*, 2009).

Su principal hospedante es *Solanum tuberosum* (papa). Sin embargo también se ha reportado ocasionando daños en cultivos de *Solanum lycopersicum* (tomate), *Capsicum annuum* (chile) bajo invernadero en Nueva Zelanda, y amarillamiento en *Daucus carota* (zanahoria) en Finlandia.

Se ha documentado la asociación de los psílicos: *B. cockerelli* y *Heteropsylla texana*, y las chicharritas: *Aceratagallia* spp y *Empoasca* spp como vectores de la punta morada de la papa en

los estados de Coahuila y Nuevo León, México (Almeyda *et al*, 2008). Sin embargo la asociación de *H. texana* con el cultivo de la papa es considerada como un nuevo registro.

Por otro lado, hay registros de que la enfermedad ocasionada por *C. Liberibacter solanacearum*, se ha asociado con *B. cockerelli* *sulc*, en una forma de transmisión persistente, donde el vector adquiere a la bacteria por la alimentación e incorporación a la microflora del intestino (Hansen *et al*, 2008). También se ha documentado ampliamente el comportamiento de alimentación del psílido de la papa, el daño que ocasionan las ninfas en particular es conocido como “enfermedad causada por psílidos”. Ésta enfermedad resulta en pérdidas de rendimiento que consiste en una gran producción de tubérculos de menor tamaño y de baja calidad. Anormalidades adicionales causadas por la alimentación del psílido de la papa, incluyen necrosis del floema que ocurre en los tallos, estolones, raíces, y raicillas laterales, ésta necrosis es más severa en tallos y estolones.

Otro registro menciona que *C. Liberibacter solanacearum* es una bacteria que infecta a cultivos de solanáceas y causa abatimiento y pérdida de cosechas, especialmente en papa y tomate, se transmite a estos hospedantes por el vector *B. cockerelli* (Swisher *et al*, 2013). Las plantas hospederas de *B. cockerelli* no se limitan a especies cultivadas, sino que también incluyen muchas malezas silvestres solanáceas. Estas hospedantes silvestres pudieran impactar potencialmente la invernación y apareamiento de los psílidos y servir como reservorios para la bacteria. En el Noroeste del Pacífico de los Estados Unidos de América se ha reportado recientemente a *B. cockerelli* invernando en la planta “uva del diablo”, “dulcamara” o “matagallinas” (*Solanum dulcamara* L.). En el estudio mencionado se utilizó un análisis de fusión de alta resolución del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I de *B. cockerelli* para analizar las poblaciones del psílido que se presentan en *S. dulcamara* durante los meses del verano e invierno en Washington, Oregon y Idaho. Se ha utilizado previamente esta técnica para analizar el gen mencionado, y ha identificado cuatro haplotipos del psílido. También se determinó la infección por *C. Liberibacter solanacearum* en psílidos colectados de *S. dulcamara*. Durante los meses de verano e invierno en el Pacífico del Noroeste, el haplotipo del psílido del Noroeste era la población dominante que se encontraba viviendo en *S. dulcamara*. No obstante, también se encontraba, aunque en bajos niveles de la

población, el psílido del Oeste en Washington y Oregon durante el mismo período (Swisher *et al*, 2013).

H. DAÑOS CAUSADOS POR *Bactericera cockerelli* sulc

Este insecto provoca dos tipos de daños a la planta: el toxínifero o directo y el indirecto como trasmisor de *C. Liberibacter solanacearum*. La toxina de *Bactericera cockerelli* Sulc daña a las células que producen clorofila en las hojas de las plantas lo que hace que se vean amarillentas y raquíticas. Por contraparte, la bacteria es quien origina el verdadero daño, de interés y cuidado en la planta. La toxina origina un amarillamiento en el follaje; los síntomas de esta enfermedad incluyen un rizado en las hojas hacia arriba, presentándose con mayor frecuencia en las hojas localizadas en la parte superior de la planta (hojas más jóvenes) cuando la enfermedad se establece este síntoma es más evidente (Garzón-Tiznado *et al*, 2010).

En los cultivos de papa, las plantas infestadas producen pocos tubérculos y las pérdidas en cuestiones de rendimientos van de un 20 a un 50%; además, se ha detectado que los tubérculos cuando se encuentran almacenados brotan prematuramente. Este daño ocurre si la planta es atacada durante las primeras etapas de su desarrollo. Se requieren por lo menos de 3 a 4 ninfas por planta para presentar los síntomas normales, para síntomas más severos se requiere mayor densidad poblacional (Garzón-Tiznado *et al*, 2010).

I. ENFERMEDADES ASOCIADAS A *C. Liberibacter solanacearum* y *B. cockerelli* COMO VECTOR

1. Permanente del tomate

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es la hortaliza más difundida en el mundo, en 170 países se registra su cultivo, su demanda aumenta continuamente y con ella su cultivo, producción y comercio; a nivel mundial se mencionan 4.8 millones de ha/año con una producción de 161 millones de ton/año (FAOSTAT, 2012), una superficie nacional de 52, 374 ha produciendo 2, 875, 164 toneladas, de las cuales Sinaloa sembró 15, 307 ha, aportando 867, 832 toneladas a la producción nacional en el año de 2014 (SIAP-SAGARPA, 2014). Aunado a esto, se presentan también una gran variedad de plagas y enfermedades que afectan la producción del cultivo. En 1984, se reportó la existencia de una enfermedad que causó un 60% de daños en la producción de tomate en Guanajuato, a la que se le denominó “permanente del tomate” (PT), cuyos síntomas son hojas

quebradizas y enrolladas, aborto de flor, sobre brotación de yemas axilares, frutos muy pequeños y por lo tanto no comerciales, achaparramiento y decaimiento general de la planta. Los síntomas en las plantas de tomate inician con una clorosis de los brotes apicales, las hojas inferiores se enrollan tomando la apariencia de “taco” y presentan una textura quebradiza, de manera normal estas hojas son de color verde intenso y brillante debido a una menor presencia de tricomas en la lámina foliar. Posteriormente en las flores se manifiesta una necrosis y son abortadas. La planta es pequeña y de un color verde más intenso que las normales, el agente causal asociado a esta enfermedad se describió recientemente como *C. Liberibacter solanacearum*, una bacteria no cultivable (Garzón-Tiznado *et al*, 2010).

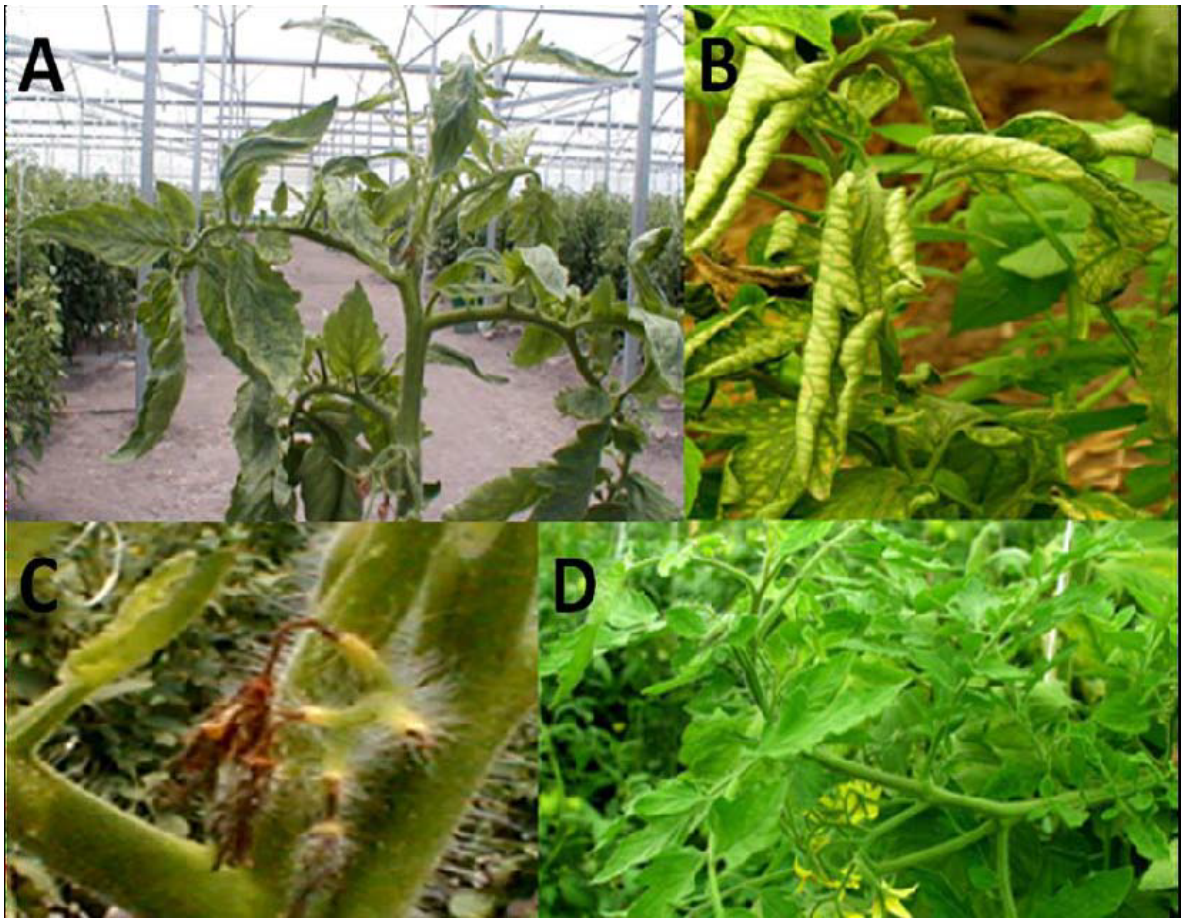


Figura 2: Síntomas del permanente del tomate. Síntomas comunes de la enfermedad de “Permanente de Tomate”, los cuales van desde una planta con decaimiento o achaparramiento (A), presencia de hojas enrolladas con forma de taco (B), necrosis y aborto de flor (C) y una sobre brotación de yemas axilares (D).

2. Punta morada de la papa-manchado (zebra chip) del tubérculo

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es otro de los cultivos importantes en México debido a sus cualidades alimenticias, adaptación climática y altos rendimientos, siendo superado solo por cultivos como el maíz, frijol, trigo y arroz, pero es susceptible a más de 300 enfermedades, aunque no todas causan pérdidas significativas (López *et al*, 2013).

En el 2012, se registró una producción mundial de 19.2 millones de hectáreas, con una producción de 364.8 millones de toneladas (FAOSTAT, 2012), sembrada en 100 países. En México, para ese mismo año se reportó una producción de 1 millón 678 mil 833 toneladas, en una superficie de 61, 454 ha, de las cuales en Sinaloa se cultivaron 11.6 mil ha, con una producción de 295 mil ton (SIAP-SAGARPA, 2014). Actualmente se cultiva en 23 estados de la República Mexicana durante todo el año; sin embargo es afectado por una gran cantidad de factores que limitan su producción y calidad de los tubérculos; entre estos factores sobresalen los insectos, nematodos, maleza y enfermedades de tipo fúngicas, bacterianas, virosas, fitoplasmas u organismos tipo bacteria. Una de las principales enfermedades es conocida como “punta morada de la papa” (PMP) considerada de gran importancia por las pérdidas económicas que ocasiona y la cual se encuentra distribuida en Canadá, E.U.A., Centro, Sudamérica y en México ya como un problema muy serio pues se encuentra presente en la mayoría de las zonas productoras de papa.

El nombre de esta enfermedad hace alusión a la coloración morada que adquieren las hojas apicales, síntoma que está asociado con achaparramiento de la planta, enrollamiento de las hojas, y recientemente se han descritos síntomas adicionales que se caracterizan por una coloración oscura interna de los tubérculos y ausencia de brotación de los mismos. Esta enfermedad, se le conoce como “Zebra chips” y está causando mayores daños que la comúnmente conocida “Punta morada” ya que actualmente está afectando el 50% de la superficie nacional y sobre la cual se ha descrito a *B. cockerelli* como vector (Garzón-Tiznado *et al*, 2010).



Figura 3: Planta de papa con síntomas de punta morada. Entre los síntomas de la enfermedad de punta morada se encuentran el achaparramiento de la planta, el enrollamiento de las hojas y la coloración morada en casi la totalidad de la misma.



Figura 4: Síntomas del “Manchado del tubérculo” en papa. Los síntomas del manchado de tubérculo o “Zebra Chip” denotan una coloración oscura interna de los tubérculos e inclusive la ausencia de brotación de los mismos, la coloración negra aparece una vez que la papa es sometida a cocimiento.

J. SECUENCIACIÓN DE ADN EN LA DETECCIÓN DE ORGANISMOS

La estrategia más directa en la detección de polimorfismos a nivel de ADN es la determinación de la secuencia nucleotídica de una región definida y el alineamiento de dicha secuencia a una región ortóloga en el genoma de otro organismo más o menos relacionado (Weising *et al*, 2005).

Este método incluye cuatro pasos principales (Eguiarte *et al*, 2007):

- 1) identificar secuencias que tengan la variación necesaria
- 2) aislar y purificar un número elevado de la secuencia (ya sea por clonación o amplificación)
- 3) secuenciar
- 4) alinear la secuencia (con algún programa computacional).

Para este efecto se han diseñado pares de iniciadores universales basados en la información de secuencias de partes conservadas del ADN, los cuales son posteriormente utilizados en la PCR, amplificando las regiones blanco que serán secuenciadas directamente o bien después de clonación (Weising *et al*, 2005).

El análisis de secuencias de ADN permite determinar el orden de nucleótidos en un fragmento de ADN. Además de detectar sustituciones nucleotídicas, deleciones y duplicaciones a partir de comparaciones entre los productos amplificados de diferentes muestras. La cantidad de variación detectada y su tipo dependerá de la o las regiones que están siendo muestreadas (Lowe *et al*, 2004).

K. COMPONENTES DE LA VARIACIÓN GENÉTICA

La variación genética constantemente se está creando por mutación, selección y deriva. Dentro de la especie es un concepto fundamental para los ecólogos genetistas teniendo tres componentes principales:

- 1) Diversidad genética: cantidad de variación genética
- 2) Diferenciación genética: distribución de la variación genética entre poblaciones.
- 3) Distancia genética: cantidad de variación genética entre pares de poblaciones.

(Lowe *et al*, 2004).

1. Diversidad genética

La diversidad genética es una expresión comúnmente utilizada para describir la variación heredable encontrada dentro de las entidades biológicas y puede ser medida a nivel individual, poblacional o de especie. Las formas de cuantificar la variación genética pueden dividirse en tres categorías: observaciones, suposiciones y similitudes. Los enfoques basados en observaciones son los métodos más simples en la evaluación de la diversidad y típicamente asociadas con medidas de riqueza alélica. Por otro lado las medidas basadas en suposiciones como el equilibrio de Hardy-Weinberg determinan el total de la diversidad genética dentro de una especie y el grado en que esta se fragmenta dentro y entre poblaciones. Los enfoques de similitud están basados sobre el grado en el que son compartidos los alelos entre poblaciones y usualmente están asociados con el análisis de datos dominantes. Los análisis estadísticos de similitud miden el grado de diferencia entre pares de poblaciones o especies (Lowe *et al*, 2004).

2. Diferenciación genética

La deriva genética, selección natural y cuellos de botella, son fuerzas evolutivas que provocan que las poblaciones se diferencien, mientras que los rangos de migración entre poblaciones prevendrían o disminuirían esta diferenciación. Para conocer acerca de estos factores y su efecto sobre los organismos, es posible calcular como se encuentra particionada la variación dentro y entre poblaciones (Weising *et al*, 2005).

3. Distancia genética

La distancia genética cuantifica el grado de similitud entre dos individuos, o grupos de individuos. Una medida de distancia genética debe ser métrica, es decir: los valores deben ser positivos, simétricos, distintivos y satisfacer la desigualdad triangular. Conceptualmente, la distancia genética mide que tan alejados están dos individuos o poblaciones en un hiperespacio n-dimensional marcado, donde cada eje corresponde a la variación en un marcador individual. Idealmente, el método de distancia genética debe producir valores que varíen entre cero y uno (Lowe *et al*, 2004). Numerosos métodos han sido desarrollados para medir la distancia genética entre población e individuos. Para un mejor entendimiento de dichos métodos estos han sido divididos en dos grupos: aquellos que utilizan datos desordenados y estiman la distancia genética

basados en el criterio de alelos compartidos; y aquellos otros que utilizan datos ordenados (Lowe *et al*, 2004).

Entre los métodos que utilizan datos desordenados se tienen los valores FST (*pairwise*). Este es uno de los métodos más utilizados cuya ventaja es que todos los tipos de datos pueden ser analizados (haploides, codominantes y dominantes) usando la medida de diferenciación apropiada (Weising *et al*, 2005). Sin embargo, uno de los métodos para el cálculo de distancia genética más conocido es el estimador de Nei, el cual se basa en la probabilidad de que al escoger un alelo al azar de cada dos poblaciones, este sea diferente con respecto a la probabilidad de que al escoger dos alelos de una misma población sean diferentes (Weising *et al*, 2005). Para estimar la distancia genética para datos dominantes se puede hacer uso de la medida de similitud de Jaccard (Lowe *et al*, 2004), el cual confía en el número de bandas registradas entre dos individuos, como una proporción del número total de bandas que estos dos individuos demuestran.

$$SJ = nab / na + nb - nab$$

Aquí na y nb representan El número de bandas presentes en las líneas a y b , respectivamente, y nab representa el número de bandas registradas por ambas líneas (Weising *et al*, 2005).

L. FILOGEOGRAFÍA

La filogeografía se define, en sentido estricto, como el análisis espacial de los linajes génicos. Este análisis se aplica a niveles infraespecífico o de especies cercanamente emparentadas y surgió hace poco más de diez años, en virtud del progreso que han tenido dos aspectos de la biología evolutiva moderna: uno tecnológico, gracias al cual se comenzó a disponer de datos de variabilidad intraespecífica en la forma de secuencias de DNA, y otro conceptual o teórico, que implicó la aplicación de la teoría de la coalescencia al estudio de procesos microevolutivos (Lanteri *et al*, 2002).

La filogeografía aplica por primera vez el análisis de genealogías génicas al estudio de la evolución de las poblaciones y permite sacar conclusiones con respecto a las secuencias de colonización, diversificación y extinción de los linajes génicos en determinadas áreas. Además, el estudio comparado de los patrones filogeográficos de varias especies codistribuidas contribuye a plantear hipótesis sobre posibles eventos comunes de varianza o dispersión y a identificar las

causas geológicas, ecológicas o etológicas que pudieran haber influido en ellos (Lanteri *et al*, 2002). En un sentido amplio, la filogeografía comprende los estudios filogenéticos de la distribución espacial de cualquier característica (morfológica, etológica, etc.); sin embargo, en la actualidad la disciplina se basa principalmente en el análisis de DNA mitocondrial (DNAmt). En especies animales, el DNAmt se ha convertido en un instrumento fundamental del análisis filogeográfico, pues además de no recombinar, presenta una tasa de mutación elevada y herencia casi exclusivamente materna.

Los principales aspectos a tener en cuenta en un análisis filogeográfico son los siguientes:

1. Cada haplotipo de una misma especie o de especies próximas, puede interpretarse como una unidad terminal del análisis filogenético.
2. Los datos a analizar son secuencias de genes, como por ejemplo Citocromo Oxidasa I o II (COI o COII) del DNAmt.
3. Las relaciones genealógicas entre haplotipos se representan a través de filogramas.
4. Los algoritmos para obtener filogramas son similares a los que se emplean para reconstruir filogenias de especies o taxones superiores.
5. Los filogramas se superponen a la distribución geográfica a fin de interpretar el proceso evolutivo responsable de la dispersión de la, o las especies en estudio.

1. Marcadores utilizados en estudios filogeográficos

Un requisito fundamental para poder establecer genealogías génicas es el uso de marcadores genéticos o secuencias de DNA que no recombinen. Si se trabaja con muestras de genes nucleares provenientes de individuos entre los cuales existe o existió alguna vez flujo génico, es altamente probable que haya habido recombinación genética durante el apareamiento de cromosomas homólogos en la meiosis. Este proceso puede llegar a desvirtuar profundamente las verdaderas genealogías de las secuencias, motivo por el cual la mayoría de los trabajos de filogeografía utilizan marcadores de herencia citoplasmática no mendeliana, como el DNA de las mitocondrias (DNAmt) y de los cloroplastos (DNAcp), o marcadores nucleares en donde se haya constatado que existe poca o ninguna recombinación genética (Lanteri *et al*, 2002).

En la actualidad la mayor parte de los estudios filogeográficos se basan en el estudio de secuencias de DNA, sin embargo, los primeros trabajos sobre filogeografía llevados a cabo cuando

las técnicas de secuenciación no eran tan accesibles, se realizaron sobre otro tipo de información, por ejemplo la que proveen los fragmentos de restricción. En tal sentido, una de las técnicas más utilizadas ha sido la de RFLP (polimorfismos para la longitud de fragmentos de restricción) sobre DNAm total.

M. ADN MITOCONDRIAL (ADNmt)

El ADN mitocondrial es un material genético circular cerrado de doble cadena que se localiza en el interior de las mitocondrias celulares. Este genoma es de aproximadamente 15 000 a 17 000 pares de bases y codifica una pequeña fracción de las proteínas mitocondriales (Ballard et al. 2004). Las proteínas restantes del ADN mitocondrial son codificadas por el ADN nuclear (nADN). Las dos cadenas del ADN mitocondrial reciben el nombre de cadena L (ligera o light) y cadena H (pesada o heavy) atendiendo a su coeficiente de sedimentación. La mayor parte de las secuencias codificantes (28 genes) se encuentran en la cadena H. Estas secuencias se distribuyen en esta cadena de forma muy compactada, llegando incluso a solaparse. El ADN mitocondrial contiene información de 38 genes: 2rRNA (12S y 16S), 22tRNA y 13 genes estructurales, los cuales codifican diferentes subunidades de los complejos enzimáticos del sistema de fosforilación oxidativa:

- a) Tres subunidades de la citocromo c-oxidasa (*COI, II y III*) (Complejo IV)
 - b) Una subunidad de la *citocromo b* (*cyt b*) óxido-reductasa (complejo III)
 - c) Siete subunidades ND (1, 2, 3, 4, 4L, 5 y 6) del complejo NADH deshidrogenasa
 - d) 2 subunidades (6 y 8) del complejo ATP sintetasa (Complejo V)
- (Ballard *et al*, 2004; Freeland, 2005).

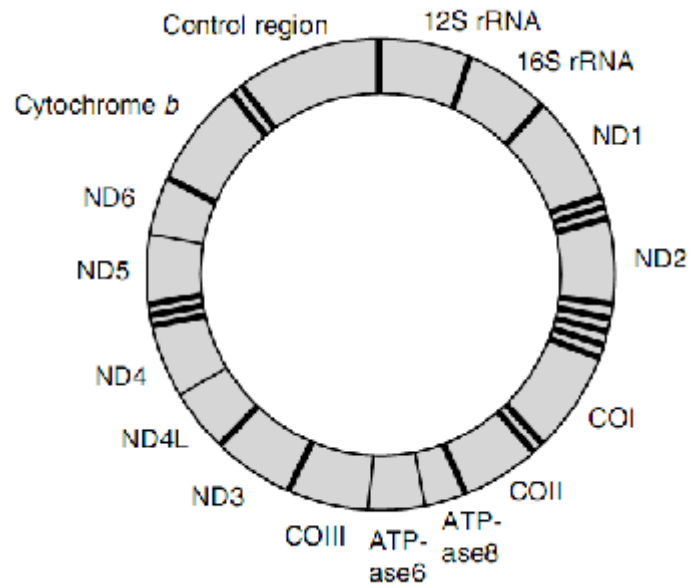


Figura 5: Organización de genes del ADN mitocondrial. Distribución del ADN mitocondrial, contiene información de 38 genes: 2ARNr (12S y 16S), 22ARNt y 13 genes estructurales, codifican diferentes subunidades de los complejos enzimáticos del sistema de fosforilación oxidativa. El genoma mitocondrial se reproduce por sí mismo autónomamente cuando la célula eucariota se divide. Fue descubierto en 1963 por Margit M., K. Nass y Sylvan Nass (Ballard *et al*, 2004).

1. Secuencias de ADN mitocondrial

El ADNmt carece de histonas asociadas. Esta característica sería uno de los factores que favorecen su alta tasa de mutación y justifican su empleo a escala microevolutiva, a diferencia de los genes nucleares. En la mayoría de los animales el ADNmt se hereda por vía materna, pues todas las mitocondrias las aporta la gameta femenina, habiéndose detectado transmisión de DNAm a través del espermatozoides solo en unas pocas especies (Lanteri *et al*, 2002).

Las células somáticas típicas poseen cientos a miles de mitocondrias, cada una con varias copias de ADNmt, sin embargo, en general existe un haplotipo mitocondrial preponderante por cada individuo. Esta característica denominada homoplasmia, resulta fundamental para poder realizar un análisis filogeográfico donde las unidades de estudio son los individuos, y probablemente se debe a que dentro de cada población intracelular de ADNmt, las mutaciones se fijarían en forma rápida por un proceso análogo a la deriva génica.

Algunas de las propiedades que hacen que el ADNmt sea un marcador particularmente útil para estudios filogeográficos a nivel microevolutivo en especies animales, son las siguientes:

1. El ADNmt exhibe un extenso polimorfismo y una alta tasa de mutación, por lo que evoluciona más rápidamente que el ADN nuclear de copia simple.
2. La mayoría de las variantes del ADNmt involucran sustituciones nucleotídicas y son pocos los casos en que se observan cambios de longitud en la molécula.
3. La herencia del ADNmt es casi siempre materna y normalmente no presenta recombinación genética intermolecular.
4. La mayoría de los individuos son homoplásmicos para un ADNmt prevalente.

Para el análisis molecular en estudios de diversidad genética se han utilizado regiones conservadas de ADN nuclear, ADN mitocondrial y ADN ribosomal. El ADN mitocondrial (ADNmt) en particular, ha sido utilizado como una poderosa herramienta en el estudio de estructuras de poblaciones y flujo de genes, hibridación, biogeografía y relaciones filogenéticas (Kambhampati *et al*, 1995).

Esto, debido a que el ADNmt es pequeño comparado con el genoma nuclear, un rango relativamente rápido de cambio evolutivo, es heredado de la madre y tanto el orden como la composición de genes se hayan generalmente conservadas (Day, 1994).

Además el alto número de copias de genes mitocondriales hace mucho más fácil el trabajo a diferencia de las copias individuales de genes nucleares y su herencia materna ha sido particularmente útil a nivel intraespecífico (Cruickshank, 2002).

Los primeros estudios que consideran la variación en el ADNmt empleaban polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP). Estos estudios fueron la base para trabajos posteriores y el instrumento en el desarrollo del ADNmt como una herramienta molecular.

El análisis del genoma mitocondrial de insectos es una poderosa herramienta en el estudio de genética de poblaciones y relaciones filogenéticas. Su característica y rápida evolución sumada a la herencia materna y recombinación limitada, hacen que el ADN mitocondrial sea un marcador ideal para la solución de muchas preguntas a nivel de especie (Salinas, 2010).

Debido a la importancia de las funciones mitocondriales, cambios en la secuencia de ADNmt pueden tener substanciales impactos sobre el estado físico de organelos (dentro de individuos) o incluso sobre el estado del organismo hospedero. El impacto directo de haplotipos mitocondriales sobre la aptitud o el estado físico ha sido medido en copépodos, ratones y moscas del género *Drosophila*. En el caso particular de *Drosophila* se encontró que diferencias en el genoma mitocondrial trae como consecuencia haplotipos que se desarrollan más rápido pero con mayor rango de mortalidad (James et al. 2003). Los efectos en el estado físico debido a diferencias en el genoma mitocondrial pueden depender del ambiente que el organismo encuentra en sí mismo, así como del genotipo nuclear del hospedero (Ballard et al, 2004).

N. GEN CITOCROMO OXIDASA I (COI)

Dentro de las subunidades del ADN mitocondrial, el gen citocromo oxidasa I (COI), posee varias características que lo convierten en uno de los mejores marcadores moleculares disponibles para estudios relacionados con la evolución. Dentro de éstas, se encuentra su tamaño y estructura, las cuales son características conservadas en la mayoría de organismos que se han estudiado empleando como marcador molecular este gen; la longitud del gen que se presenta como la mayor dentro de las tres subunidades del citocromo oxidasa, que permite amplificar y secuenciar muchos más caracteres o nucleótidos; la presencia de extremos altamente conservados que permite el uso de cebadores universales para generar comparaciones y conclusiones robustas en diferentes tipos de análisis. Además de lo anterior, el gen COI posee un rango amplio de señales filogenéticas,

particularmente en la tercera posición de los tripletes de codones, lo que genera que la tasa de evolución molecular sea casi tres veces mayor comparada con otros genes tales como 12S o 16S permitiendo la discriminación no solo de especies cercanamente relacionada, sino además de grupos filogeográficos dentro de una misma especie (Salinas *et al*, 2010).

O. ANÁLISIS DEL GEN RIBOSOMAL 16S

La comparación de las secuencias de los ARNr 16S (o de los genes que los codifican) permite establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos procariotas. Este hecho ha tenido una enorme repercusión en taxonomía bacteriana, dando lugar al sistema de clasificación vigente y permitiendo la identificación rápida y precisa de las bacterias (Rodicio *et al*, 2004). En microbiología clínica la identificación molecular basada en el ARNr 16S se utiliza fundamentalmente para bacterias cuya identificación mediante otro tipo de técnicas resulta imposible, difícil o requiere mucho tiempo. La amplificación del gen, para su posterior secuenciación, parte preferentemente de ADN extraído de un cultivo puro de la bacteria, pero también puede conseguirse directamente de una muestra clínica. Esto último ha conducido al descubrimiento de nuevos agentes patógenos. Teniendo en cuenta su potencialidad, a medida que los recursos técnicos aumenten y el precio se haga más competitivo, la identificación bacteriana basada en el RNAr 16S encontrará probablemente una aplicación más amplia en el laboratorio de microbiología clínica (Herrera *et al*, 2005).

El ARN ribosómico 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas. Su aplicación como cronómetro molecular fue propuesta por Carl Woese (Universidad de Illinois) a principios de la década de 1970. Los estudios de Woese originaron la división de los procariotas en dos grupos o reinos: *Eubacteria* y *Archaeobacteria*, cuya divergencia es tan profunda como la encontrada entre ellos y los eucariotas. Además, permitieron establecer las divisiones mayoritarias y subdivisiones dentro de ambos reinos.

Desde entonces, el análisis de los ARNr 16S se ha utilizado ampliamente para establecer las relaciones filogenéticas dentro del mundo procariota, causando un profundo impacto en nuestra visión de la evolución y, como consecuencia, en la clasificación e identificación bacteriana. La identificación molecular basada en el análisis del ARNr 16S (o del gen que lo codifica) puede

representar una ventaja tanto en tiempo como en precisión, llegando incluso a competir de manera favorable con otras técnicas rápidas y eficaces, como las inmunológicas.

El ARNr 16S es un polirribonucleótido de aproximadamente 1,500 nt, codificado por el gen *rrs*, también denominado ADN ribosomal 16S (ADNr 16S), a partir de cuya secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica (Herrera *et al*, 2005). Como cualquier secuencia de nucleótidos de cadena sencilla, el ARNr 16S se pliega en una estructura secundaria, caracterizada por la presencia de segmentos de doble cadena, alternando con regiones de cadena sencilla. En eucariotas el ARNr 18S es la macromolécula equivalente.

P. FILOGENÉTICA COMPUTACIONAL

La filogenética computacional es la aplicación de algoritmos computacionales, en métodos y programas de análisis filogenético. El objetivo es construir un árbol filogenético que representa una hipótesis evolutiva de un conjunto de genes, especies u otros taxones. La filogenética tradicional usaba datos morfológicos obtenidos mediante la medición y cuantificación de las propiedades fenotípicas de los organismos representativos, mientras que los más recientes campos en filogenética molecular usan secuencias de nucleótidos que codifican genes o secuencias de aminoácidos que forman proteínas como bases de la clasificación. Muchas formas de filogenética molecular están muy relacionadas y hacen un uso extensivo del alineamiento de secuencias en la construcción y redefinición de los árboles filogenéticos usados para la clasificación de las relaciones evolutivas entre los genes homólogos existentes en los genomas de especies divergentes. Los árboles filogenéticos construidos mediante métodos computacionales rara vez reflejan fielmente los árboles filogenéticos que representan las relaciones históricas entre las especies analizadas. El árbol de especies históricas puede diferir del árbol histórico de genes homólogos individuales compartidos por dichas especies (Hodge *et al*, 2000).

Producir un árbol filogenético requiere una cuantificación de las homologías entre las características compartidas por los taxones bajo estudio. En estudios morfológicos, esto requiere hacer supuestos explícitos sobre las características físicas a medir y como usarlos para codificar los distintos estados correspondientes a los taxones de entrada. En los estudios moleculares, uno de los problemas básicos es producir un alineamiento múltiple entre las secuencias de interés. Por fuerza, los métodos de alineamiento progresivo producen un árbol filogenético, porque incorporan

las secuencias nuevas en el alineamiento calculado por orden de distancia genética. Aunque los árboles filogenéticos puedan ser construidos a partir de un alineamiento múltiple, los métodos de inferencia filogenética tales como la máxima parsimonia y máxima verosimilitud no requieren la producción de un alineamiento múltiple inicial.

Q. ÁRBOLES FILOGENÉTICOS

Un árbol filogenético muestra las relaciones evolutivas entre varias especies u otras entidades que se cree que tienen una ascendencia común. Se construyen tomando en cuenta la evolución biológica, basándose en la evidencia de que todos los organismos son descendientes de un ancestro común. Así, todos los organismos, ya sean vivos o extintos, se encuentran emparentados en algún grado.

Un árbol filogenético enraizado es un árbol directo, con un único nódulo que corresponde al ancestro común más reciente de todas las entidades de las hojas del árbol. Los árboles genéticos sin raíz ilustran la relación de los nódulos de las hojas sin hacer asunciones sobre ascendencia. Mientras que los árboles sin raíz siempre pueden ser generados a partir de árboles enraizados omitiendo la raíz, una raíz no puede ser inferida a partir de un árbol sin raíz sin algunos medios para identificar la ascendencia. Esto suele hacerse incluyendo un grupo externo en los datos entrantes o introduciendo asunciones adicionales sobre las tasas relativas de evolución en cada rama (Felsenstein, 2004).

1. Tipos de árboles filogenéticos

- Un dendograma es un término genérico para la representación diagramática de un árbol filogenético.
- Un cladograma es un árbol formado usando métodos cladísticos. Este tipo de árbol sólo representa un patrón de ramificación, es decir, que la longitud de sus ramas no representan el tiempo.
- Un filograma es un árbol filogenético que representa explícitamente un número de cambios de rasgos de carácter a lo largo de la longitud de sus ramas; es el resultado de la aplicación de los principios de la sistemática evolutiva.

- Un fenograma es un dendograma no enraizado en el que se establecen las relaciones de parentesco fenético de los organismos estudiados; surgen de la aplicación de los métodos de taxonomía numérica.
- Un cronograma es un árbol filogenético que representa explícitamente el tiempo evolutivo proporcionalmente a la longitud de sus ramas.

Los árboles filogenéticos generados mediante filogenia computacional pueden ser enraizados o sin raíz, dependiendo de los datos de entrada y el algoritmo usado. Un árbol enraizado es un grafo directo que implícitamente identifica un antecesor común más reciente, usualmente una secuencia imputada que no está representada en la entrada. Las medidas de distancia genética pueden ser usadas para trazar un árbol con las secuencias de entrada como nodos hoja y sus ramas con distancia a las raíces proporcionales a su distancia genética desde el hipotético antecesor común. La identificación de la raíz normalmente requiere la inclusión en los datos de entrada de al menos un grupo externo (en inglés *outgroup*) que esté relacionado solamente de forma distante con las secuencias en estudio. Por el contrario, en los árboles sin raíz se trazan las distancias y relaciones entre las secuencias de entrada sin hacer suposiciones en cuanto a sus antecesores. Un árbol sin raíz siempre se puede producir a partir de un árbol enraizado, pero usualmente no es posible hacerlo a la inversa, a menos que se provea información adicional sobre las tasas de divergencia, como al asumir la hipótesis de un reloj molecular (Felsenstein, 2004).

El conjunto de todos los árboles filogenéticos posibles para un grupo dado de secuencias de entrada puede ser conceptualizado como un "espacio de árboles" discretamente definido y multidimensional, y mediante algoritmos de optimización matemática trazar el árbol adecuado. Aunque contabilizar el número total de árboles para un número no trivial de secuencias de entrada puede ser complicado debido a los distintos tipos de topologías del árbol, es también cierto que el número de árboles enraizados es mayor que el número de árboles posibles sin raíz, para una misma secuencia de entradas y de parámetros (Felsenstein, 2004).

2. Soportes de árboles filogenéticos

Los soportes de árboles filogenéticos son unas medidas que proporcionan fiabilidad y robustez a los árboles creados a partir de los métodos de parsimonia, máxima verosimilitud, mínimas distancias y bayesiano. Los métodos de soporte más utilizados son el Soporte de Bremer

o *decay index*, el *Bootstrap*, el *Jackknife* y el *aLRT (Approximate Likelihood-Ratio Test)*. (Soltis, 2003)

a. Soporte de Bremer o *decay index*

Consiste en comparar el árbol más parsimonioso con el árbol más parsimonioso al que le falte el clado a estudiar; es decir, es el número de pasos necesarios para que una rama se colapse, que esta desaparezca. Hay dos formas de realizar este proceso:

Árboles subóptimos: Consiste en calcular todos los árboles que sean subóptimos del árbol más parsimonioso y utilizar un consenso de todos los árboles hallados para ver en qué grado de suboptimización el clado desaparece.

Reverse constrain: Calcula los árboles más cortos que no contengan la rama que se está estudiando y a continuación se encuentra la longitud de dicha rama.

Con ambos métodos es necesario repetir el proceso varias veces, ya que con el primer método es necesario sacar todos los cladogramas con todos los pasos y con el segundo hay que hacerlo con todas las ramas (Gascuel, 2006).

b. Bootstrap

Bootstrap es el método más utilizado para parsimonia y máxima verosimilitud. Consiste en crear una matriz de datos cuyas columnas se van cambiando de forma aleatoria, e incluso se repiten en una misma matriz, y de cada una de las matrices resultantes crear un árbol filogenético, contando al final en cuántos de ellos aparece el clado a estudiar. Este proceso se repite varias veces, siendo lo más común repetirlo 1000 veces. Al final se indica el porcentaje de veces en que cada nodo del árbol se presentó en las matrices remuestreadas. Al final todos estos árboles se representan en uno consenso donde aparecen los porcentajes de la proporción de cada réplica. Así, si una rama presenta más del 50% quiere decir que ésta es fiable.

c. Jackknife

El método *Jackknife* se puede usar en parsimonia, mínimas distancias y máxima verosimilitud. La premisa de este método es la ausencia de inconsistencias dentro de la base de datos a estudiar, de forma que la extracción de un taxón no debe modificar la topografía del árbol. Consiste en la generación de matrices pseudoreplicativas de modo que cada una de ellas carezca

de un taxón determinado a partir de las cuales se generan los árboles, realizando de todos ellos uno consenso.

d. aLRT

El método *aLRT* (siglas en inglés de *Approximate Likelihood-Ratio Test*) es un análisis alternativo al *bootstrap* mucho más rápido y se basa en que las ramas inferidas tienen longitud cero. Midiendo los valores de máximo logaritmo de verosimilitud correspondientes al mejor árbol y el mejor reordenamiento alrededor de la rama de interés. Utiliza las fórmulas $2l_1 - l_0$ donde l_1 es la verosimilitud del mejor árbol y l_0 es la verosimilitud del árbol donde la rama a estudiar no existe; y $2l_1 - l_2$ donde l_2 es la verosimilitud del segundo mejor árbol (Gascuel, 2006).

R. CÁLCULO DE LAS DISTANCIAS GENÉTICAS

La distancia entre dos secuencias (*p-distance*) se obtiene como la fracción de posiciones en las que existe una diferencia de nucleótidos o aminoácidos. Los gaps pueden ignorarse o contarse como diferencias. Sin embargo, es posible que en una misma posición se hayan producido varias sustituciones a lo largo del tiempo evolutivo, por lo que la distancia observada puede no corresponderse con la distancia real. También existe la posibilidad de que en una posición ocurra la reversión al estado ancestral o que se dé la misma mutación en las dos secuencias comparadas; en ambos casos se supondría una ausencia de cambio. Cuanto menos relacionadas filogenéticamente estén las secuencias, más probabilidad existirá de que hayan ocurrido eventos de sustitución múltiple, ya que han contado con más tiempo para acumular cambios. Otro problema que entorpece la estima de las distancias genéticas es la diferente velocidad de evolución que se observa en los distintos linajes (Lemey *et al*, 2009).

1. Métodos basados en distancias genéticas

Los métodos de reconstrucción filogenética pueden clasificarse en dos tipos según su forma de proceder. Los primeros son los llamados algorítmicos, que agrupan las secuencias según distintos criterios, creando un nuevo nodo en cada paso, y finalmente obtienen un árbol único, que se considera el más ajustado a los datos. Los segundos son los basados en un criterio de optimización en la búsqueda de árboles, y funcionan generando todos los árboles posibles y eligiendo luego los más adecuados según los datos y otros parámetros previamente establecidos.

a. UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic)

Es un método que procede por agrupación de las secuencias que presentan la menor distancia genética. La agrupación de las dos secuencias más relacionadas produce el primer nodo, que se incorpora a una nueva matriz en la que se calcula su distancia a cada una de las secuencias restantes como la media aritmética de las distancias de las dos secuencias componentes del nodo. El proceso se repite hasta que todas las secuencias quedan agrupadas y unidas por nodos internos (Lemey *et al*, 2009).

Con este método se obtiene un árbol enraizado y ultramétrico, en el que todas las secuencias presentan la misma distancia al punto de origen, ya que se asume la existencia de un reloj molecular evolutivo. La hipótesis del reloj molecular postula la velocidad constante del cambio evolutivo, reflejada en secuencias genómicas con una tasa de cambio constante, en las que la divergencia a partir de una secuencia ancestral debería ser la misma para todas las secuencias derivadas. Sin embargo, está demostrado que este reloj molecular no existe en la mayoría de los casos, ya que el ritmo de cambio es distinto entre especies y entre las diferentes regiones del genoma.

b. Neighbor-joining

Es un método basado en el criterio de mínima evolución (BME: *balanced minimum evolution*), en el que el mejor árbol es aquel que minimiza la longitud de las ramas internas. Para ello, a partir de un árbol en estrella, se determina la pareja de secuencias más cercanas y se unen mediante un nodo interno. Este proceso se repite con el resto de secuencias hasta que quedan todas unidas por nodos internos que minimizan la longitud de cada una de las ramas internas, aunque no se asegura una longitud mínima global (Lemey *et al*, 2009).

Con este método se obtiene un árbol no enraizado y aditivo, en el que la longitud de sus ramas indica cambio evolutivo. Las ramas presentan diferentes distancias al punto de origen porque no asume la existencia de un reloj molecular, y por lo tanto la tasa de cambio varía entre distintos linajes y secuencias. Con estas premisas, el método de *Neighbor-joining* representa mejor la situación real que el UPGMA, por lo que en la actualidad se utiliza más.

c. Fitch-Margoliash

El método de Fitch-Margoliash emplea cuadrados mínimos ponderados para el agrupamiento basado en distancia genética (Fitch *et al*, 1967). A las secuencias relacionadas de manera más estrecha se les asigna una mayor valoración en el proceso de construcción del árbol para contrapesar el aumento de la inexactitud al medir distancias entre secuencias relacionadas de forma distante.

S. MÁXIMA PARSIMONIA

El método de máxima parsimonia (MP) es un método de gran utilidad en diversos campos de la ciencia y uno de los métodos más utilizados en la reconstrucción de árboles filogenéticos, basado en el principio de parsimonia. Este método en la reconstrucción filogenética tiene como objetivo la búsqueda e identificación de un posible árbol filogenético que requiera el menor número de eventos evolutivos (mínimo de cambios evolutivos o pasos de un estado a otro) para dar explicación a los procesos o fenómenos observados. Esta idea fue extraída de la argumentación filosófica de la navaja de Ockham de Guillermo de Ockham en la que defiende que si se parte de dos o más hipótesis que dan lugar a explicaciones igual de válidas para un acontecimiento dado, la hipótesis más simple tiene mayor probabilidad de ser la correcta para explicar el fenómeno. Aunque en la actualidad se utilizan otros métodos con mayor frecuencia tales como el método de máxima verosimilitud (ML), inferencia bayesiana (IB), método de matriz de distancias, entre otros; el método de máxima parsimonia sigue siendo de gran utilidad y de suma importancia en el campo de estudio de filogenias moleculares, a pesar de presentar ciertas limitaciones.

Los datos que se utilizan para la realización de filogenias moleculares se recogen en una matriz que puede estar formada por secuencias de ADN previamente alineadas, siendo los estados los cuatro diferentes nucleótidos (A, T, C, G) o en una matriz compuesta por secuencias proteicas que recoge los diferentes 20 aminoácidos; es en la matriz donde se asigna uno o varios caracteres a cada taxón (Hudson *et al*, 2011).

Una vez obtenidas las diferentes topologías, se le asigna a cada una de ellas un coste, y es el árbol con la topología de menor coste el que se elige como árbol más parsimonioso. Esta forma de búsqueda del árbol más parsimonioso solamente es posible cuando se obtienen un número

relativamente pequeño de topologías. El número de topologías posibles depende del número de taxones (nodos terminales) y si el árbol está enraizado o no (Salemi *et al*, 2009).

T. MÁXIMA VEROSIMILITUD

Es uno de los métodos basados en caracteres empleados para realizar inferencias filogenéticas, a través del cual se busca determinar la organización de las ramas de un árbol filogenético y su longitud, para evaluar las hipótesis evolutivas de un grupo de taxones, o OTUS como también suelen ser denominados los extremos de las ramas. Este método usa técnicas estadísticas estándar para inferir la distribución de probabilidad, al asignar probabilidades a posibles árboles. Actualmente la máxima verosimilitud se emplea para analizar secuencias alineadas de nucleótidos, aminoácidos y proteínas. Una de las características principales del método, es que requiere un modelo de sustitución de bases, o modelo evolutivo para establecer la probabilidad de cada tipo de mutación en las secuencias; en términos generales se puede decir que un árbol que requiere más mutaciones en sus nodos internos, para explicar los datos observados, es menos verosímil. Este hecho hasta cierto punto es similar a la máxima parsimonia, pero difiere en que la máxima verosimilitud tiene mayor flexibilidad estadística, permite diferentes tasas de evolución tanto en los linajes como en los sitios de las secuencias, así como también presenta bajas varianzas con respecto a otros métodos. Mientras al obtener una probabilidad alta, dará lugar al estado actual de las relaciones entre los OTUS y esta será una hipótesis más veraz que una con una baja probabilidad de alcanzar el estado de las relaciones de los datos observados. (Schmidt *et al*, 2009)

Algunas de las principales ventajas de este método es que todos los sitios de las secuencias son informativos y permite estudiar la información que mejor se ajuste a los datos observados. Además, debido a que requiere que la evolución de diferentes sitios y entre distintos linajes sea estadísticamente independiente, es apropiado para el análisis de secuencias relacionadas de forma distante; en adición resiste las tasas de heterogeneidad y sustitución, así como también tiene menos efectos por errores de muestreo. No obstante presenta ciertas limitaciones con respecto a los demás métodos; ya que dependiendo del número de secuencias que se deseen analizar, generalmente si son más de 10 taxones u OTUS, los requerimientos computacionales se incrementan y puede ser un proceso demasiado lento, puesto que estimar las numerosas hipótesis

alternativas, resulta ser una tarea dispendiosa. Otra limitante que presenta es que no se pueden incluir datos morfológicos, los cuales en muchos casos son de utilidad en la reconstrucción filogenética de un grupo, y contribuiría a dar más soporte a la elección de la mejor hipótesis; así como también, tiende a presentar inconvenientes cuando taxones muy cercanos presentan ramas de gran longitud. (Schmidt *et al*, 2009)

Por otra parte, el método es robusto debido a que las topologías generadas necesitan de un modelo evolutivo particular, ya que el modelo se obtiene por la observación de las secuencias y la probabilidad de los datos bajo el modelo elegido; así en algunos casos los modelos suelen asumir hechos que pueden ser desatinados, puesto que muchos interpretan distribuciones idénticas en algunos lugares, incluso si no lo son, debido a que estos se basan en las características de los lugares donde se tiene la certeza del proceso de sustitución, y asumen sustituciones en otros lugares que tienen elementos en común, incluso si no son totalmente idénticos (Swofford *et al*, 1996) Por ello los componentes que determinan la evolución de secuencias puede estar regido bajo pocos parámetros; sin embargo, si la elección del modelo es incorrecto, el árbol generado también lo será.

El cálculo de verosimilitud es una probabilidad condicional de obtener una hipótesis verdadera a partir de los datos observados, así para evaluar la verosimilitud de un árbol, se estima la probabilidad de que este pueda haber generado los datos obtenidos bajo el modelo elegido. Por otra parte, la verosimilitud del árbol es independiente de la localización de la raíz, así si los sitios de los nucleótidos evolucionan independientemente, se puede calcular la verosimilitud de cada sitio y combinar las verosimilitudes parciales en un valor total. Para calcular una posición se deben considerar todos los posibles escenarios, y cada uno tiene una probabilidad de generar un patrón de nucleótidos observado, así el nodo de la raíz puede presentarse en cualquier posición. Una vez calculada la verosimilitud de cada lugar, se une a la probabilidad que el árbol y el modelo genera sobre todos los sitios, y es computado como el producto de las verosimilitudes individuales. Debido a que la probabilidad de alguna observación es pequeña en número, esta se expresa siempre en términos de logaritmo, así la verosimilitud es calculada como la suma de los logaritmos. (De Luna *et al*, 2005)

Para reducir el espacio de búsqueda mediante el cálculo eficiente de la verosimilitud de los subárboles, se emplea un algoritmo "de poda", una variante de la programación dinámica. (Felsenstein *et al*, 2004) El método calcula la verosimilitud de cada sitio de forma "lineal", empezando en un nodo cuyos únicos descendientes son hojas, es decir, las ramas terminales de un árbol; y trabajando hacia atrás, hacia los nodos más cercanos a la raíz, en conjuntos anidados. Sin embargo, los árboles producidos por el método solo se enraízan si el modelo de sustitución es irreversible, lo cual no es generalmente verdadero para los sistemas biológicos. La búsqueda de los árboles con máxima verosimilitud contiene un componente de optimización de la longitud de las ramas que es difícil de mejorar mediante algoritmos; y a veces se usan herramientas genéricas de optimización global, como el método de Newton-Raphson. La búsqueda de topologías de árboles por máxima verosimilitud no se ha probado que sea completa (Felsenstein *et al*, 2004), pero sigue siendo extremadamente difícil pues el buscarlas por ramificación y acotamiento todavía no es efectivo para árboles definidos de este modo. Las desventajas de este método es que puede ser un proceso demorado, en función de la profundidad de la búsqueda y de la capacidad de los equipos computacionales de los cuales se disponga.

U. PRUEBAS DE NEUTRALIDAD

El estadístico Tajima's D compara dos estimas de la cantidad de variación genética (θ y π) de un grupo de secuencias. La primera es obtenida a partir del número total de sitios polimórficos en la muestra de secuencias y la segunda como la proporción de diferencias nucleotídicas entre las secuencias comparadas dos a dos (Tajima, 1989). Ambas estimas deben ser iguales bajo una situación de evolución neutral (no selección, no recombinación, no subdivisión poblacional, no cambios en el tamaño poblacional). D se basa en la diferencia entre ambas estimas y tiene media cero y desviación 1. Si se detectan desviaciones significativas, éstas son indicadoras de no neutralidad, pero el factor concreto que las explica puede ser difícil de distinguir. Así, por ejemplo, valores positivos de D pueden indicar selección positiva, selección equilibradora o bien una reducción del tamaño poblacional. El test de Fu y Li (Fu *et al*, 1993) es parecido al anterior en que también calcula un estadístico D como la diferencia de dos estimas de diversidad genética. Este test está basado en que diferentes tipos de mutaciones se acumulan de forma diferente en una filogenia. Así, las mutaciones puramente neutrales pueden acumularse a lo largo de toda la

filogenia, pero las mutaciones ligeramente deletéreas lo harán únicamente en las ramas externas, o lo que es lo mismo, son más recientes, puesto que la selección habrá tenido más tiempo para eliminar las mutaciones deletéreas que aparecieron hace más tiempo. (Bromham *et al*, 2003)

La finalidad de la prueba de Tajima es identificar secuencias que no encajan en el modelo de la teoría neutral en el equilibrio entre la mutación y la deriva genética. Con el fin de realizar la prueba en una secuencia de DNA o gen, la estadística de Tajima calcula una medida normalizada de la cantidad total de separación de los sitios (estos son sitios de DNA que son polimórficos) en el DNA de muestra y el número medio de mutaciones entre pares en la muestra. Las dos cantidades cuyos valores se comparan son tanto el método de momentos estimaciones de la población genética, y así se espera que sea igual al mismo valor. Si estos dos números sólo se diferencian por tanto como uno podría esperar razonablemente por casualidad, entonces la hipótesis nula de la neutralidad no puede ser rechazada. De lo contrario, se rechaza la hipótesis nula de neutralidad. (Tajima, 1989).

Bajo el modelo de la teoría neutral, para una población de tamaño constante en el equilibrio:

$$E[\pi]=\theta= E \left[\frac{S}{\sum_{i=1}^{n-1} \frac{1}{i}} \right] = 4N\mu \quad \text{Para el ADN diploide y}$$

$$E[\pi]=\theta= E \left[\frac{S}{\sum_{i=1}^{n-1} \frac{1}{i}} \right] = 2N\mu \quad \text{Para el ADN haploide}$$

En las fórmulas anteriores, S es el número de sitios de segregación, n es el número de muestras, N es el tamaño efectivo de la población, μ es la tasa de mutación en el locus genómico examinado, y i es el índice de la suma. Pero la selección, las fluctuaciones demográficas y otras violaciones del modelo neutral van a cambiar los valores esperados de S y π , de modo que ya no se espera que sean iguales. La diferencia en las expectativas para estas dos variables (que puede ser positivo o negativo) es la esencia de la estadística de prueba D de Tajima.

D se calcula tomando la diferencia entre las dos estimaciones del parámetro de la genética de poblaciones θ . Esta diferencia se denomina d , y D se calcula dividiendo d por la raíz cuadrada de su varianza $\sqrt{V(d)}$ (su desviación estándar, por definición).

$$D = \frac{d}{\sqrt{V(d)}}$$

IV OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL

Determinar la relación filogeográfica entre haplotipos de *Bactericera cockerelli* sulc y haplotipos de *Candidatus Liberibacter solanacearum* de los estados de Guanajuato y Sinaloa.

B. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Identificar haplotipos de *Bactericera cockerelli* Sulc con base en el gen citocromo oxidasa I en hembras y machos del psílido colectados en Guanajuato y Sinaloa.
2. Identificar haplotipos de la bacteria *Candidatus Liberibacter solanacearum* con base en su secuencia parcial del gen 16S a partir de muestras extraídas de *Bactericera cockerelli* Sulc colectada en Guanajuato y Sinaloa.
3. Analizar la filogenia entre haplotipos de *Bactericera cockerelli* Sulc con base en las secuencias nucleotídicas del gen Citocromo Oxidasa I.
4. Analizar la filogenia entre haplotipos de *Candidatus Liberibacter solanacearum* con base en las secuencias nucleotídicas de la región 16S.
5. Establecer la relación filogeográfica entre haplotipos de *Candidatus Liberibacter solanacearum* y haplotipos de *Bactericera cockerelli* Sulc de Guanajuato y Sinaloa.

V MATERIALES Y METODOS

A. COLECTA DE *B. cockerelli* Y *C. Liberibacter solanacearum*

La recolecta del insecto *B. cockerelli* se realizó en los estados de Sinaloa y Guanajuato al tomar en cuenta que están a una distancia considerable (760.26 km en línea recta) y existir entre ambos diferencias en tipo de clima, temperatura (Figura 6 a 8) suelo, altitud, humedad, entre otros, para la realización de un estudio filogeográfico. Además, existe una diferencia de 18 años en cuanto a la detección del insecto entre estos dos puntos de muestreo, ya que en Guanajuato se detectó desde 1984 (Garzón-Tiznado *et al*, 1984) y en Sinaloa fue en 2002 (López *et al*, 2003). Una de las muestras de Sinaloa se obtuvo originalmente de plantas cultivadas de papa cuya semilla procedía del estado de Guanajuato (Información de este mismo estudio) cuyo número de acceso en GenBank es KF776422.1 perteneciente a La Cruz de Elota.

El nombre de la localidad y las coordenadas geográficas de cada sitio de colecta se muestran en el Cuadro 3; mientras que en el Cuadro 4 se muestra una breve descripción de algunos factores físicos y ambientales de los mismos.

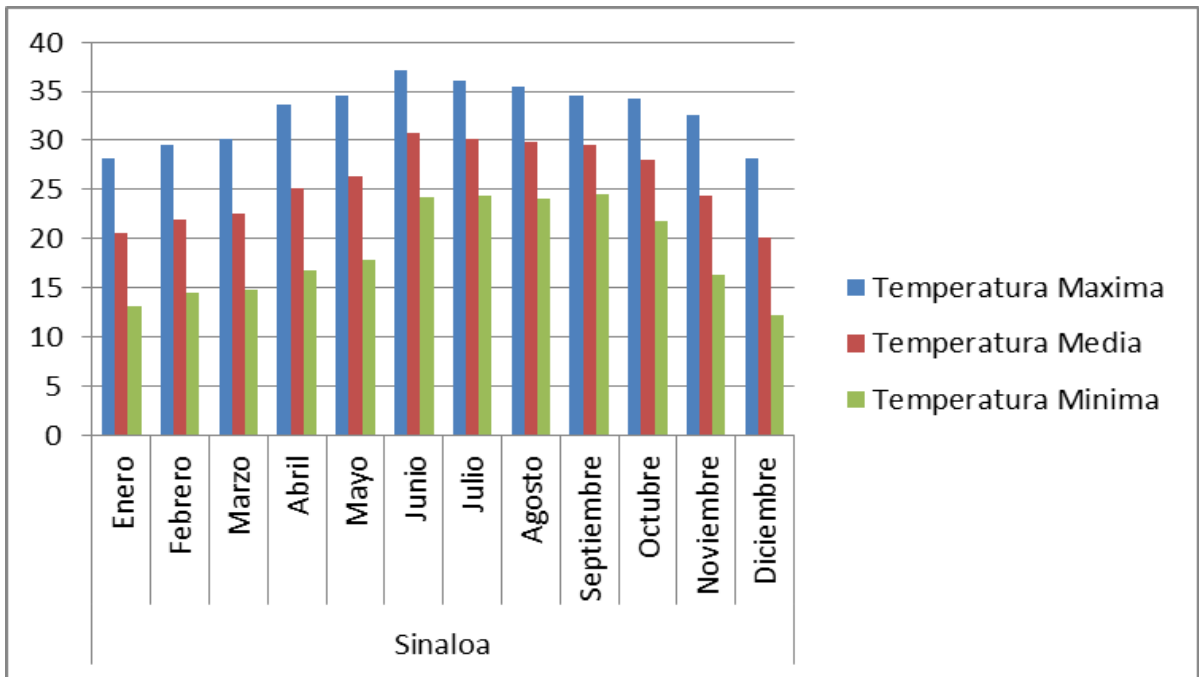


Figura 6: Comportamiento de la temperatura anual en el estado de Sinaloa. Descripción del comportamiento de temperatura por mes expresada en °C, cabe mencionar que en este estado el ciclo agrícola inicia en Septiembre y finaliza en Mayo (CONAGUA, 2015).

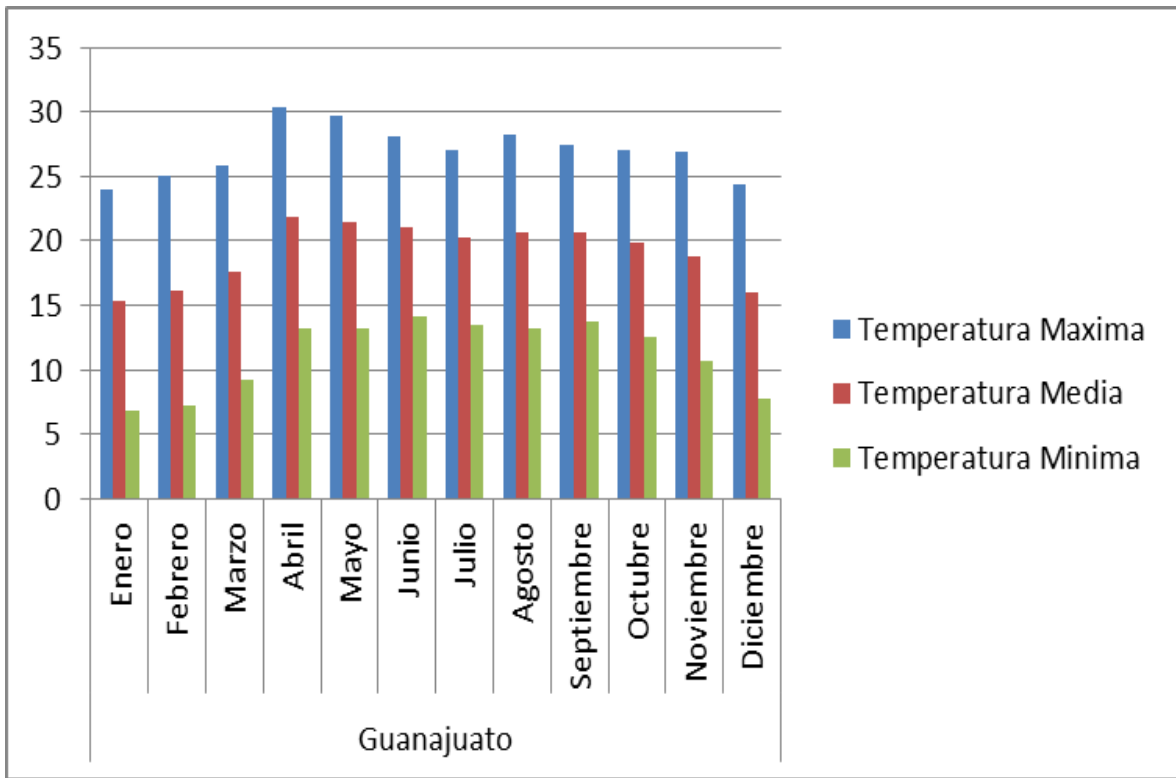


Figura 7: Comportamiento de la temperatura anual en el estado de Guanajuato. Descripción del comportamiento de temperatura por mes expresada en °C, cabe mencionar que en este estado el ciclo agrícola inicia en Febrero y finaliza en Septiembre (CONAGUA, 2015).

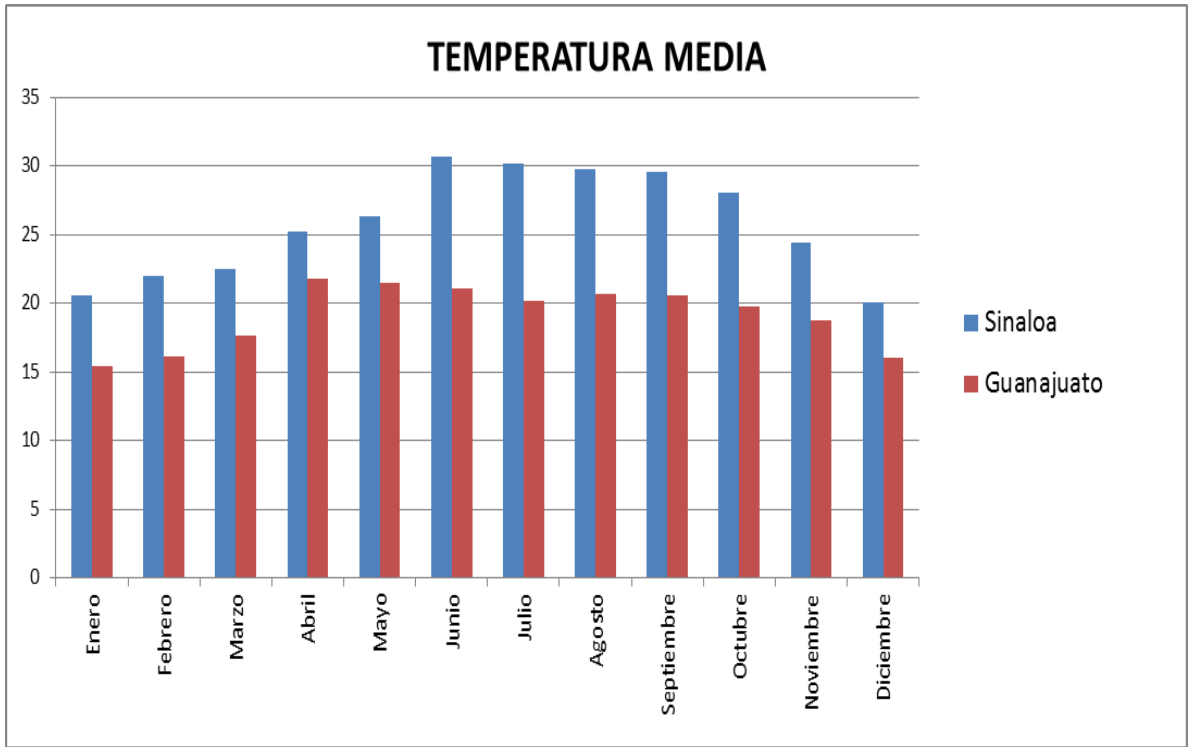


Figura 8: Comparativo de temperatura promedio entre los estados de Sinaloa y Durango. Diferencias de temperaturas promedio expresadas en °C de manera mensual, existe una diferencia en temperaturas promedios de 6 °C (CONAGUA, 2015).



Figura 9: Ubicación geográfica y distancia entre los sitios de muestreo, Sinaloa y Guanajuato. Los sitios donde fueron colectadas las muestras para el estudio se encuentran a una distancia lineal de poco más de 760 km, existen diferencias significativas entre ambas regiones principalmente de tipo de vegetación, temperatura ambiente ($\neq 6\text{ }^{\circ}\text{C}$) y altitud ($\neq 1,700\text{ msnm}$). El primer registro de daño a cultivos de tomate causado por *B. cockerelli* en conjunto con *C. Liberibacter solanacearum* en México se tiene en el estado de Guanajuato en el año de 1984 (Garzón-Tiznado, 1984), 18 años más tarde se registra la presencia del insecto vector en Sinaloa.

Cuadro 3: Coordenadas geográficas de los sitios de recolecta de *B. cockerelli* en México.

Localidad	Coordenadas		Cultivo
	N	W	
Cortázar, Guanajuato	20° 28' 58"	100° 57' 40"	Tomate
Romita, Guanajuato	20°52'13"	101°31'00"	Chile
Culiacancito, Culiacán, Sinaloa	24°49'00"	107°32'00"	Tomate
Costa Rica, Culiacán, Sinaloa	24°35'24"	107°23'32"	Chile
Zavala, Concordia, Sinaloa	23°17'18"	106°04'03"	Chile
El Huajote, Concordia, Sinaloa	23°17'17"	106°04'02"	Chile
Nieblas, El Rosario, Sinaloa	23°01'03"	105°51'28"	Chile

Cuadro 4: Características físicas de los sitios de recolecta.

Localidad	Altura (msnm)	Clima	Temperatura media anual	Tipo de suelo	Vegetación
Cortázar, Guanajuato	1736	Semicálido subhúmedo con lluvias en verano	19.3 °C	Vertisol pelico	Pastizales, bosques de coníferas y encinos, matorrales
Romita, Guanajuato	1750	Semicálido subhúmedo con lluvias en verano	19 °C	Vertisol pelico	Pastizales, bosques de coníferas y encinos, matorrales
Culiacancito, Culiacán, Sinaloa	33	Cálido subhúmedo	25 °C	Feozem, vertisol, regosol y cambisol	Matorral xerófito, bosque de coníferas y encinos, vegetación riparia
Costa Rica, Culiacán, Sinaloa	32	Cálido subhúmedo	25 °C	Feozem, vertisol, regosol y cambisol	Matorral xerófito, bosque de coníferas y encinos, vegetación riparia
Zavala, Concordia, Sinaloa	120	Cálido subhúmedo/ Templado subhúmedo	24 °C	Livisol	Bosque tropical caducifolio, bosque tropical subcaducifolio, el bosque de Quercus, escasamente representado el bosque de Pinus-Quercus
El Huajote, Concordia, Sinaloa	80	Cálido subhúmedo/ Templado subhúmedo	24 °C	Livisol	Bosque tropical caducifolio, bosque tropical subcaducifolio, el bosque de Quercus, escasamente representado el bosque de Pinus-Quercus, así como

					pequeñas áreas de pastizales naturales y pastizales inducidos
Nieblas, El Rosario, Sinaloa	20	Tropical lluvioso	22 °C	Regozol, litosol, feozem	Selva baja y mediana caducifolia

Se realizó una colecta dirigida de ninfas y adultos de *B. cockerelli*. En cada sitio de muestreo (Cuadro 3) se localizaron las plantas de chile o tomate en las que estuviera presente *B. cockerelli*, según su caracterización morfológica; en dicha caracterización encontramos que los adultos tienen la apariencia de chicharras pequeñas y brincan cuando se les molesta y el color varía según la edad, de tal forma que recién emergidos son amarillo pálido o verde claro y después se tornan a colores más oscuros, como gris o negro. En la cabeza presenta varias manchas blancas, ojos grandes de color café, antenas filiformes de 10 segmentos; en la división con el tórax hay una franja café. El tórax es de color amarillo ámbar, con manchas café claro bien definidas, además presenta manchas blancas redondeadas y paralelas, con dos pares de alas membranosas que miden aproximadamente 1.5 veces el largo de su cuerpo y están colocadas en forma de tejado sobre el abdomen. Para el caso de las ninfas estas son aplanadas, en forma de escamas, de coloración variable (naranja, amarillo y verde) según el instar en que se encuentren, tienen un halo de setas cortas en la periferia del cuerpo. Para su localización en la planta, se observó la parte posterior de las hojas. La recolecta se realizó manualmente por succión empleando una manguera de plástico transparente con un tapón de tela en un extremo permitiendo el paso de aire pero no del insecto, posteriormente las muestras fueron depositadas en tubos de 1.5 µl, se les añadió etanol al 70% y se trasladaron al laboratorio de Fitopatología, Genética y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas (FCQB) de la Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS) en donde se almacenaron a -20 °C para su procesamiento en los experimentos correspondientes.

B. EXTRACCIÓN DE ADN DE *B. cockerelli* Y *C. Liberibacter solanacearum*

Para la extracción del ADN del insecto se empleó la metodología de Doyle-Doyle (1990), con algunas modificaciones estandarizadas en el laboratorio de trabajo las cuales se describen a continuación:

- 1) Se seleccionó un pool de 10 insectos de muestra y se sometieron a un lavado con 20 µl de agua destilada durante 10 segundos para eliminar imperfectos que pudieran estar presentes en la muestra, efectuando este paso por triplicado.
- 2) Posteriormente se hizo una maceración en un mortero previamente esterilizado, este paso se efectuó empleando 200 µl de buffer de extracción (2% CTAB, 1.4 M de NaCl, 0.2% 2-β

Mercaptoetanol, 20 mM EDTA, 100 mM TRIS-HCl, ajustado a pH 8) a 60 °C y macerando la muestra empleando un pistilo de porcelana estéril.

- 3) Se recuperó el macerado empleando una micropipeta de 200 µl y se pasó a un tubo eppendorf de 1.5 ml estéril. La muestra se incubó a 60 °C en una termoplaca.
- 4) Pasado el tiempo de incubación, se le añadió a la muestra un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico para remover los componentes proteicos que no son de interés, se centrifugó a una temperatura de 4 °C a 12,000 rpm por 4 min, posteriormente se recuperó el ADN (Fase superior del tubo) en un tubo eppendorf nuevo de 1.5 ml estéril.
- 5) Posteriormente se le añadió al tubo con la muestra un volumen de Isopropanol, sometiendo la muestra a una incubación a -20 °C por una hora, pasado ese lapso de tiempo se centrifugó en refrigeración (4 °C) a 12,000 rpm durante 40 min.
- 6) Se decantó el isopropanol teniendo cuidado de no derramar la pastilla formada (ADN precipitado) y se le realizaron dos lavados con etanol al 70% con el fin de remover sales adheridas al ADN.
- 7) Una vez lavada la pastilla, se resuspendió en 35 µl de agua inyectable y se almacenó a -20 °C hasta su posterior uso.

C. ANÁLISIS POR PCR PUNTO FINAL DE GENES DE INTERÉS

1. Gen Citocromo Oxidasa I para la detección de *B. cockerelli*

Para la detección del insecto por la técnica de PCR punto final se emplearon los oligos específicos para esta región mitocondrial descritos por López (2012) cuyas secuencias son:

- Directo

5'-CAACACCTATTCTGATTTTTTGG-3'

- Reverso

5'-TGTTGAGGAAAAAATGTTAGGTTTAC-3'

La reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo en un volumen total de 20 µl conteniendo 2 µl de Buffer PCR (Invitrogen 10X), 1 µl de MgCl₂ (Invitrogen a 50 mM), 0.5 de dNTP's (Invitrogen a 1 mM), 2.5 µl de cada oligo (Invitrogen a 5 µM), 2 µl de ADN, 0.25 µl de Taq polimerasa (Invitrogen, 1 unidad) y 9.25 µl de agua inyectable. Un tubo de PCR control conteniendo todos los componentes excepto el ADN se corrió como blanco para descartar contaminación,

además se corrió otro tubo empleando ADN de pulgón negro (*aphis fabae*) como control negativo. La amplificación del ADN se llevó a cabo en un termociclador programable C1000™ Thermal Cycler BIO-RAD. El programa utilizado fue de 95°C (5 min) para la separación inicial de las cadenas de ADN, seguido por 36 ciclos de 95°C (30 seg), 56 °C (1 min), 72°C (1 min) y finalmente 10 min a 72 °C como extensión final.

2. Gen 16S para la detección de *C. Liberibacter solanacearum*

La reacción de amplificación se realizó en un volumen de 25 µL conteniendo 2.5 µl Buffer PCR (Invitrogen 10X), 1.5 µl de MgCl₂ (Invitrogen a 50 mM), 0.5 de dNTP's (Invitrogen a 1 mM), 2.5 µl de cada oligo (Invitrogen a 5 µM), 2 µl de ADN, 0.25 µl de Taq polimerasa (Invitrogen, 1 unidad) y 13.25 µl de agua inyectable empleando un termociclador marca C1000™ Thermal Cycler BIO-RAD. El programa utilizado fue de 94°C (4 min) para la separación inicial de las cadenas de ADN, seguidos por 35 ciclos de 94°C (45 seg), 64 °C (1 min), 72°C (1 min) seguido de un ciclo a 72°C (10 min) para la extensión final.

Se emplearon los oligos específicos para esta región mitocondrial descritos por Munyaneza *et al*, (2009) cuyas secuencias son:

- Directo

5'- GCGCTTATTTTAAATAGGAGCGGCA -3'

- Reverso

5'- GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT -3'

D. ELECTROFORESIS Y DETECCIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Los fragmentos amplificados mediante PCR fueron separados por su tamaño mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% preparados con TAE 1X (40 mM TRIS, 0.011% C₂H₄O₂ Absoluto, 2 mM EDTA), además se les añadió 0.3 µl de Gel Red® para la visualización de ADN a la luz ultravioleta. En el primer carril del gel se colocó un marcador de ADN de peso molecular de 1 kb seguido por la muestra control blanco y la muestra control negativo.

La corrida electroforética se llevó a cabo a 80 voltios durante 50 minutos. Posteriormente los productos de amplificación se visualizaron y fotografiaron bajo luz ultravioleta en un transiluminador marca MiniBIS-Pro. El fragmento esperado de 560 pb corresponde a la detección del gen COI para

el insecto y de 1128 pb para el gen 16S de la bacteria. La identificación de ambos organismos se realizó a través de la secuenciación de los fragmentos predichos para cada organismo.

E. PURIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Una vez visualizados los geles tanto de COI como de 16S y obtenidas bandas acorde a los tamaños de los genes en estudio se procedió a la purificación de los amplicones, para dicha purificación se empleó un kit comercial denominado UltraClean^R 15 y se siguieron los sencillos pasos descritos en el protocolo técnico para este kit. Posteriormente las muestras ya purificadas se mandaron a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM en la ciudad de Cuernavaca, Morelos.

F. ALINEAMIENTO Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE SECUENCIAS

La visualización, edición y alineamiento tanto de las secuencias de COI como de 16S se llevaron a cabo en el programa MEGA versión 6 (Tamura *et al.* 2013). En el alineamiento de secuencias para COI se incluyeron también las secuencias depositadas en GenBank con números de acceso AY971888.1, AY971885.1, JQ708095.1, KC305359.1, KR534770.1, KR534768.1 y EF372597.1, que corresponden a las secuencias reportadas para los cuatro haplotipos descritos de *B. cockerelli* proveniente de Washington, Arizona, Nuevo Mexico y California, EUA, con la finalidad de comparar la variabilidad de las secuencias COI obtenidas con las ya reportadas.

En el alineamiento de secuencias para 16S, de igual forma, se incluyeron las secuencias depositadas en GenBank con números de acceso EU935004.1, FJ395218.1, FJ395214.1, KC771219.1, KF776420.1, KF776423.1, EU918196.1, FJ829807.1, KF776422.1, HM245242.1, GU373049.1 y EU921627.1, correspondientes a las secuencias reportadas de los tres haplotipos descritos para *C. Liberibacter solanacearum* provenientes de Finlandia, Nueva Zelanda, México y EUA, además de otras secuencias correspondientes a las mismas zonas.

Para la determinación de los haplotipos tanto del insecto como de la bacteria y la comparación entre las poblaciones obtenidas de la colecta en los sitios de muestreo anteriormente descritos, se utilizó el programa estadístico DNAsp (Rozas *et al.* 1999). Para el caso del análisis de la filogenia, bajo el algoritmo del método “Máxima verosimilitud” así como el de “neighbor-joining”, se infirieron y construyeron árboles filogenéticos los cuales fueron sometidos a un análisis

“bootstrap” con 1000 réplicas de donde se obtuvo un árbol consenso para cada método. Dicho análisis se llevó a cabo en MEGA 6 (Tamura *et al.* 2013).

VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. COLECTA DE *B. cockerelli* Y *C. Liberibacter solanacearum*

En cada sitio descrito en el Cuadro 3 se dirigió una colecta principalmente sobre adultos y ninfas del insecto de acuerdo a la descripción morfológica que describe a este vector (Garzón-Tiznado *et al*, 2010). Como se trabajó con genes conservados para la identificación de los haplotipos, el estado de desarrollo biológico en el que se encontraban los insectos no impactaron en el resultado final (Lanteri *et al*, 2002).

De cada sitio de colecta se extrajo un promedio de 100 insectos, basándose en el muestreo descrito por López *et al*, (2013). El porcentaje de ninfas colectadas no supero el 10% del total de insectos por sitio. El muestreo sobre los cultivos se realizó de manera uniforme tratando de cubrir la mayor parte de la superficie del terreno de siembra. En las figuras 10 y 11 se muestran ejemplos de *B. cockerelli* en su etapa ninfal y adulta.



Figura 11: *B. cockerelli* en estado adulto. Insectos adultos alimentándose de la planta hospedera. las características morfológicas previamente descritas se encuentran bien definidas. por
Figura 10: Ninfas de *B. cockerelli*. Aglomeración de *B. cockerelli* en diferentes estados ninfales alimentándose de la planta hospedera, las dimensiones de las ninfas van desde las 400 a 1500 micras de largo y de 200 hasta 1000 micras de ancho coincidiendo con Garzón-Tiznado *et al*, (2010). La caja toraxica, paquetes alares, patas y el estilete aun no se encuentran bien definidos.

B. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

1. Amplificación de COI en *B. cockerelli*.

La Figura 12 muestra los resultados de amplificación de la región mitocondrial COI en *B. cockerelli* proveniente de Romita, Guanajuato y de Culiacancito, Costa Rica, Zavala, El Huajote y Nieblas, Sinaloa, cuyas coordenadas geográficas fueron mostradas anteriormente en el Cuadro 3. Para la reacción de PCR se utilizaron 2 µl de ADN extraído de *B. cockerelli* a una concentración de 20 ng/µl, repitiendo el experimento por triplicado. Los amplicones obtenidos fueron guardados a -20 °C para su posterior purificación y secuenciación. El tamaño de los fragmentos amplificados fue de aproximadamente 560 pb coincidiendo con lo reportado anteriormente por Liu *et al*, (2006), López (2012) y Swisher *et al*, (2014).

2. Amplificación del Gen 16S de *C. Liberibacter solanacearum* en *B. cockerelli*.

La Figura 13 muestra los resultados de amplificación del gen 16S de *C. Liberibacter solanacearum* en *B. cockerelli* proveniente de Guanajuato y Sinaloa de las comunidades de Cortázar, Romita, Costa Rica y Culiacancito cuyas coordenadas geográficas fueron mostradas anteriormente en el Cuadro 3. De manera similar que para la amplificación de COI, para la reacción de PCR se utilizaron 2 µl de ADN extraído de *B. cockerelli* a una concentración de 20 ng/µl, repitiendo el experimento por triplicado. Los amplicones obtenidos fueron guardados a -20 °C para su posterior purificación y secuenciación. El tamaño de los fragmentos amplificados fue de aproximadamente 1,128 pb coincidiendo con lo reportado anteriormente por Munyaneza *et al*, (2009) y Nelson *et al*, (2011). Para el caso de las muestras colectadas al sur del estado de Sinaloa (Zavala, El Huajote y Nieblas) correspondientes a los municipios de Concordia y El Rosario no se logró la amplificación de *C. Liberibacter solanacearum* en *B. cockerelli*, esta situación probablemente se deba a la ausencia de la bacteria en el insecto en ese momento, ya que esta bacteria se ha descrito como un simbiote secundario de *B. cockerelli*, lo cual indica que el vector puede sobrevivir en su ausencia o mejorar su capacidad de vida cuando está presente en él, además según lo descrito por Millán (2014) la eficiencia de transmisión transovarica de la bacteria hacia el insecto es muy baja, alrededor del 2%, sin embargo también puede estar relacionado con

una baja concentración de la bacteria en el insecto, con ello superando la sensibilidad de la técnica de PCR punto final dificultando su detección.

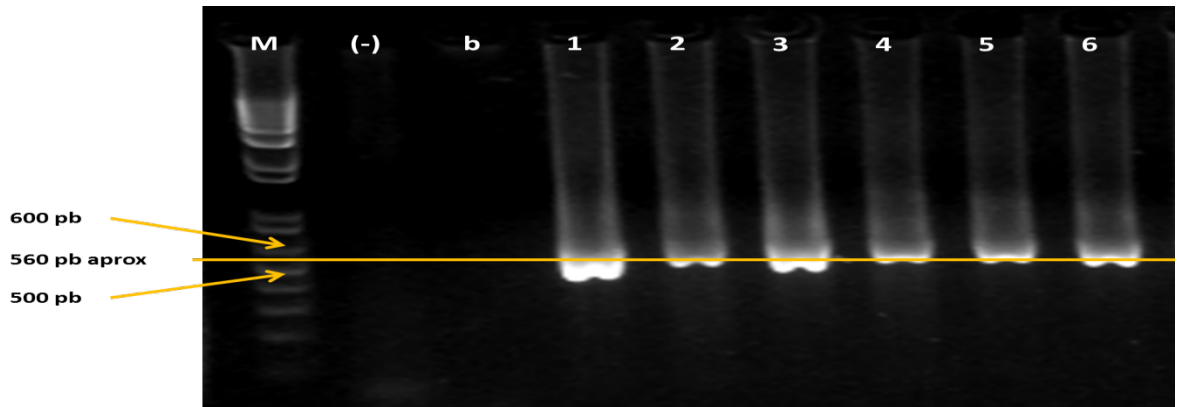


Figura 12: Productos de amplificación por PCR de la región mitocondrial citocromo oxidasa subunidad I (COI) en *B. cockerelli*. Gel de agarosa 1.5% mostrando los productos de amplificación por PCR de la región mitocondrial citocromo oxidasa subunidad I (COI) en *B. cockerelli*. M: Marcador de peso molecular de 1 kb, (-): Control negativo de la reacción de PCR, b: Blanco de la reacción de PCR (H₂O), 1-6: Muestras de *B. cockerelli* de las regiones de Guanajuato y Sinaloa.

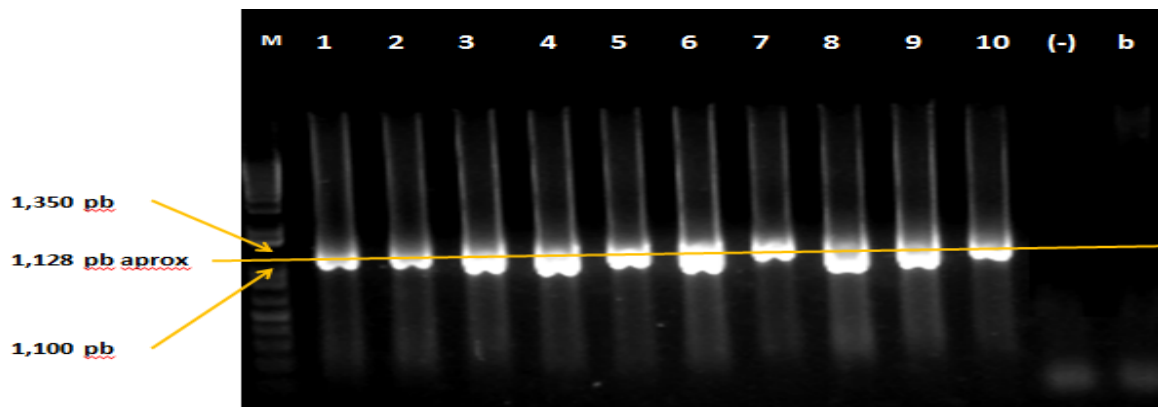


Figura 13: Productos de amplificación por PCR de la región 16S de *C. Liberibacter solanacearum* en *B. cockerelli*. Gel de agarosa 1.5% mostrando los productos de amplificación por PCR de la región 16S de *C. Liberibacter solanacearum* en *B. cockerelli*. M: Marcador de peso molecular de 1 kb, (-): Control negativo de la reacción de PCR, b: Blanco de la reacción de PCR (H₂O), 1-8: Muestras de *B. cockerelli* de las regiones de Guanajuato y Sinaloa.

C. ALINEAMIENTO Y ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS COI DE *B. cockerelli* Y 16S DE *C. Liberibacter solanacearum*

1. Secuencias correspondientes a COI

a. Alineamiento

Se obtuvieron y alinearon 9 secuencias de *B. cockerelli* provenientes de 2 estados de México (5 de Sinaloa y 4 de Guanajuato), además se realizó un alineamiento con secuencias depositadas en el GenBank correspondientes a las reportadas para los cuatro haplotipos descritos de *B. cockerelli* proveniente de Washington, Arizona, Nuevo México, Nebraska y California, EUA con los números de acceso AY971888.1, AY971885.1, JQ708095.1, KC305359.1, KR534770.1 y EF372597.1. Para México no se encontraron registros de secuencias en el GenBank.

Este análisis se realizó con el programa MEGA versión 6 (Tamura *et al.* 2013), para lo cual se realizó un corte de las secuencias situadas en el extremo 5' y en el extremo final 3' de los fragmentos secuenciados de 560 pb para hacer posible la comparación con las secuencias reportadas en GenBank. El corte mencionado fue hecho en una sección de sitios invariables para no afectar los resultados esperados de la determinación de haplotipos, cuyo análisis toma como primordial la detección de sitios variables. Una vez ajustadas las secuencias nucleotídicas, el tamaño final de las mismas fue de 415 pb lo que permitió comparar estas bajo las mismas condiciones, lo que a su vez se logró una mayor cantidad de secuencias reportadas en GenBank.

Nombre	Secuencia																	
Romita (Chile)_Guanajuato(1)	A	T	A	C	G	T	T	G	A	C	A	C	C	T	A	G	T	C
Romita (Chile)_Guanajuato(2)
Culiacancito (Tomate)_Culiacan_Sinaloa(1)
Culiacancito (Tomate)_Culiacan_Sinaloa(2)
Culiacancito (Tomate)_Culiacan_Sinaloa(3)
Costa Rica (Chile)_Culiacan_Sinaloa
Zavala (Chile)_Concordia_Sinaloa
El Huajote (Chile)_El Rosario_Sinaloa
Niblas (Chile)_El Rosario_Sinaloa
AY971888.1 Nebraska_USA(CENTRAL HAPLOTYPE)
AY971885.1 Ventura_California_USA	.	C
JQ708095.1 Hermiston_USA(WESTERN HAPLOTYPE)	.	C
KC305359.1 Farmington_USA(SOUTHWESTERN HAPLOTYPE)	C	.	G	T	.	C	T	.	.	G
KR534770.1 Mesa_Washington_USA(NORTHWESTERN HAPLOTYPE)	C	.	.	T	T	C	C	A	T	T	G	T	T	C	.	T	C	T
EF372597.1 Arizona_USA
Posición Original (Previo al corte de secuencias)	158	182	191	230	296	308	326	359	377	401	410	416	422	443	458	461	527	532

Figura 14: Alineamiento y comparación de las secuencias obtenidas para Citocromo Oxidasa I entre los sitios de muestreo y accesiones registradas en GenBank. Comparativo entre las secuencias obtenidas y las ya reportadas en GenBank de Citocromo Oxidasa I de *B. cockerelli* y descartando los sitios invariables. Una vez efectuada la edición de las mismas se agruparon de acuerdo a los sitios variables que presentan, en la base de datos se incluyeron secuencias de los cuatro haplotipos reportados para *B. cockerelli*.

b. Determinación de haplotipos de *B. cockerelli* con base en las secuencias obtenidas de Citocromo Oxidasa I

Una vez realizado el alineamiento y corte de 15 secuencias obtenidas de las muestras propias y las ya reportadas, se creó una base de datos en el programa MEGA 6 (Tamura *et al.* 2013) y ésta se cambió a formato FASTA para proceder a la determinación de los haplotipos en las muestras obtenidas de los estados de Sinaloa y Guanajuato. Dicha determinación se efectuó con la ayuda del programa DNAsp (Rozas *et al.* 1999).

Para lo anterior se definieron poblaciones en función de la región de colecta, quedando establecidas como “Guanajuato”, “Centro Sinaloa”, “Sur Sinaloa”, además se definieron dos poblaciones sumando las regiones de colecta con el propósito de hacer un comparativo entre lo existente en la zona a manera global y lo ya reportado, quedando establecidas estas como “Total Sinaloa” (Suma de las poblaciones Centro y Sur de Sinaloa) y “Total México” (Suma de las poblaciones de Guanajuato, Centro y Sur de Sinaloa). Las poblaciones se sometieron a un análisis de determinación de haplotipos por población en DNAsp, el cual determinó un único haplotipo entre las muestras propias, teniendo el dato de diversidades tanto Haplotípica (H_d) como la nucleotídica (π) igual a 0, por consecuencia los datos adicionales de varianza también fueron igual a 0. Una vez determinada la cantidad de haplotipos existentes, igual a uno, en las muestras obtenidas en las regiones de colecta, se procedió a la identificación. Para esto se realizó un comparativo entre la población “Total México”, por tratarse de un único haplotipo para los dos estados de estudio, estas secuencias fueron comparadas con las ya reportadas en el GenBank correspondientes a los haplotipos “Central”, “Oeste”, “Noroeste” y “Suroeste” en E.U.A (Swisher *et al.* 2014). El comparativo consistió en un análisis de divergencia de DNA empleando de igual manera el programa DNAsp, teniendo como resultado que el único haplotipo entre Sinaloa y Guanajuato, descrito en la población “Total México”, se agrupó al haplotipo “Central” cuyos datos de número de sitios variables (S) y de diversidad Nucleotídica (π) fueron igual a 0, este resultado concuerda con lo reportado por Swisher *et al.* (2012) quien afirma que psíidos de este haplotipo han sido identificados a través de una amplia zona geográfica, que se extiende desde el este y centro de México hasta Texas, Kansas, Colorado, Nebraska, Wyoming y Dakota del Norte. Además se

comparó el haplotipo identificado en los sitios de colecta con los otros tres antes mencionados, para ver la divergencia genética entre sí (Cuadro 5).

Los valores de diversidad nucleotídica entre el haplotipo “Central”, adjudicado a la población “Total México” encontrado en el presente estudio, y el haplotipo “Oeste” fueron los menores de todas las comparaciones posibles (= 0.00079) teniendo un único sitio variable entre sí. Por otra parte el comparativo de diversidad entre el “Central” (Total México) y “Noroeste” arrojó un total de 15 sitios variables en el fragmento de 415 pb de la región analizada. Este resultado es similar al reportado por Swisher *et al*, (2012) quien en un fragmento de 500 pb del gen Citocromo Oxidasa I encontró un sitio variable entre el haplotipo “Central” y el “Oeste”, mientras que entre “Central” y “Noroeste” encontró 16 sitios.

También, empleando las 15 secuencias de la base de datos generada para COI en la cual están implícitos los 4 haplotipos reportados para *B. cockerelli* en base al gen mitocondrial de estudio, se realizaron pruebas de neutralidad de “D de Tajima” y “Fu and Li” empleando el programa DNAsp generando una tabla que arrojó también datos de θ y π , estos nuevos valores corresponden al comparativo de los 4 haplotipos de manera global (Cuadro 6). Los valores de las pruebas de neutralidad fueron negativos, ya que el valor de π es menor que θ_{nuc} lo que indica la presencia de mutaciones deletéreas (selección negativa) que pueden deberse a dos factores: 1) el tamaño de la población del insecto puede estar aumentando, 2) Presencia de polimorfismos de baja frecuencia (Tajima, 1989).

Además, con la ayuda del programa MEGA 6, se identificaron las variaciones en la secuencia de nucleótidos en comparación con los haplotipos reportados en E.U.A. y fue posible la ubicación del sitio y a que nucleótido hace referencia dicha variación. Los resultados se muestran en el Cuadro 7.

Cuadro 5: Análisis de divergencia de ADN entre poblaciones en base al gen mitocondrial COI, empleando el programa DNAsp.

POBLACION 1	n1	POBLACION 2	n2	nTotal	Total de Sitios	S	π	k
TOTAL MEXICO	9	HAPLOTIPO CENTRAL	2	11	415	0	0	0
TOTAL MEXICO	9	HAPLOTIPO OESTE	2	11	415	1	0.00079	0.327
TOTAL MEXICO	9	HAPLOTIPO NOROESTE	1	10	415	15	0.00723	3
TOTAL MEXICO	9	HAPLOTIPO SUROESTE	1	10	415	6	0.00289	1.2
HAPLOTIPO OESTE	2	HAPLOTIPO NOROESTE	1	3	415	16	0.0257	10.66
HAPLOTIPO OESTE	2	HAPLOTIPO SUROESTE	1	3	415	7	0.01124	4.667
HAPLOTIPO NOROESTE	1	HAPLOTIPO SUROESTE	1	2	415	13	0.0313	13

n1, n2 Numero de Secuencias para cada poblacion
nTotal Numero total de secuencias
S Numero de Sitios Variables
 π Diversidad Nucleotídica
k Numero promedio de diferencias de nucleotidos

Cuadro 6: Análisis de divergencia de ADN y pruebas “TajimaD” y “Fu and Li” para las 15 secuencias utilizadas de la fracción del gen mitocondrial COI, empleando el programa DNAsp.

Population	n	Sites	S	H	Hd	VarHd	π	Var π	θ_{nuc}	k	θ_{seq}	TajimaD	FuLiD
Todas las secuencias COI	15	415	18	4	0.467	0.02184	0.00716	0.0000163	0.01334	2.9714	5.5358	-1.881	-1.8364

n Numero de secuencias	π Diversidad Nucleotídica
S Numero de sitios variables	Varπ Varianza de π
H Numero de Haplotipos	θ_{nuc} Valor tetha de numero de S por sitio
Hd Diversidad Haplotípica	k Numero promedio de diferencias de nucleotidos
VarHd Varianza de Hd	θ_{seq} Valor tetha de numero de S por secuencia

Cuadro 7: Representación del número de sitios variables para COI; "S".

HAPLOTIPO	SITIO ORIGINAL																	
	158	182	191	230	296	308	326	359	377	401	410	416	422	443	458	461	527	532
CENTRAL	A	T	A	C	G	T	T	G	A	C	A	C	C	T	A	G	T	C
OESTE	A	C	A	C	G	T	T	G	A	C	A	C	C	T	A	G	T	C
NOROESTE	C	T	A	T	T	C	C	A	T	T	G	T	T	C	A	T	C	T
SUROESTE	C	T	G	T	G	C	T	G	A	C	A	T	C	T	G	G	T	C

Sin embargo, a pesar de los múltiples sitios que difieren entre sí en las secuencias de ADN, los haplotipos reportados de *B. cockerelli* a nivel de cadena de aminoácidos no mostraron diferencias entre los cuatro haplotipos, esto concuerda con lo reportado por Swisher *et al.* (2014) donde mencionan que el haplotipo “Suroeste” tiene una diferencia muy marcada con respecto a los haplotipos “Central” y “Oeste” en relación a la cadena de ácidos nucleicos correspondiente al gen Citocromo Oxidasa I, pero esta diferencia no se ve reflejada a nivel de secuencia de aminoácidos.

c. Determinación de la filogenia de *B. cockerelli* en base a su gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I

A partir del alineamiento de secuencias, se compararon dos dendogramas obtenidos por el algoritmo de “Máxima verosimilitud” (Maximum Likelihood) y “neighbor-joining” en MEGA versión 6 (Tamura *et al.* 2013). Las figuras 15 y 16 muestran el árbol consenso para cada algoritmo empleado, en ambos el porcentaje de réplicas de los árboles en los cuales se asoció a *B. cockerelli* proveniente de las diferentes regiones de colecta fue mediante una prueba bootstrap igual a 1000. Para ambos métodos, los arboles construidos son muy similares, la representación en los dendogramas elaborados resalta la información mostrada en el Cuadro 5, las secuencias obtenidas de las regiones de estudio quedan agrupadas en el mismo clado en donde se encuentran las secuencias reportadas en GenBank para el haplotipo “Central” con una baja diversidad nucleotídica ($\pi = 0$), además los valores comparativos de π entre el haplotipo Central y el Oeste (Western Haplotype), fueron los más bajos entre todos los comparativos, esto indica que estos haplotipos se encuentran más cerca genéticamente entre sí ($=0.00079$), el soporte bootstrap arrojó un valor entre 62 a 65 % de probabilidad de que se presente dicha agrupación para ambos métodos.

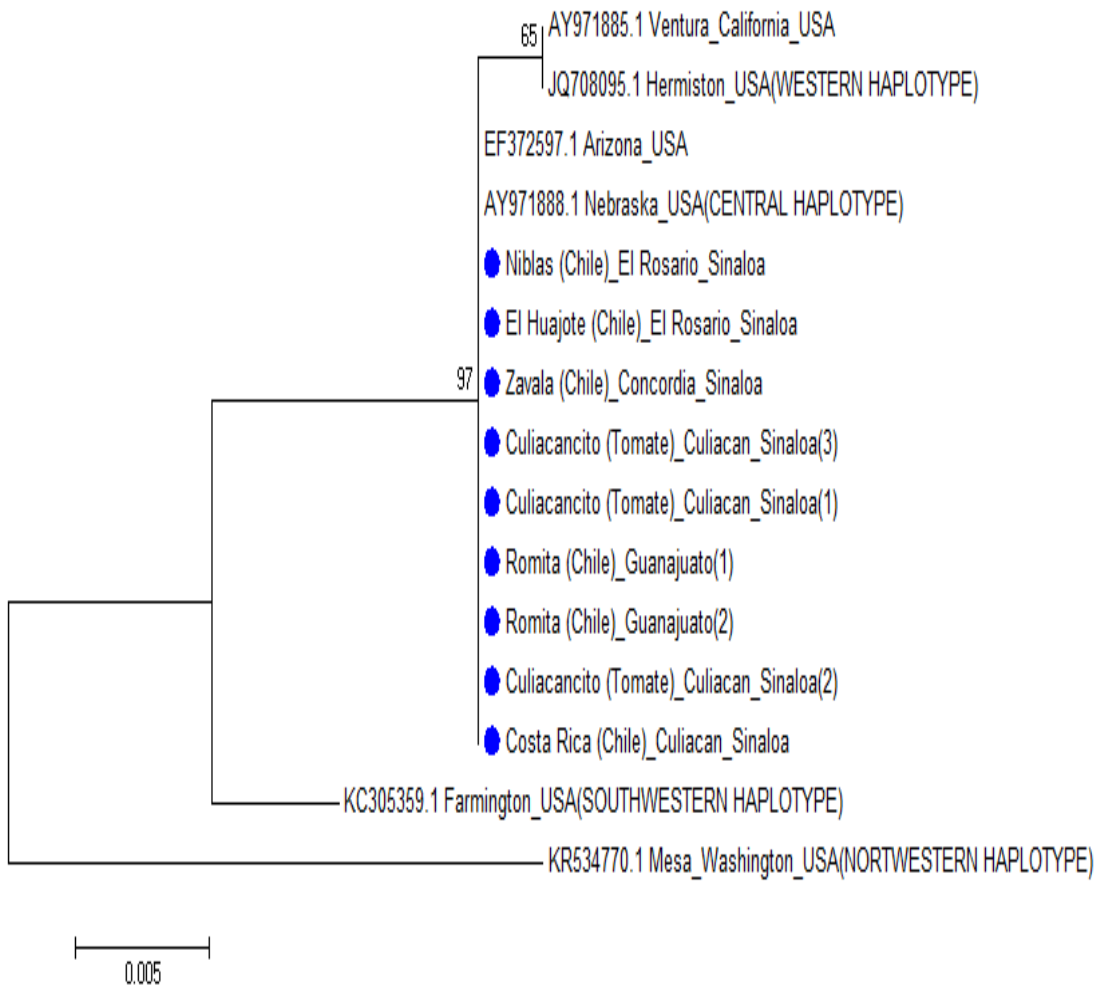


Figura 15: Árbol consenso en neighbor-joining para *B. cockerelli*. Agrupamiento a partir de secuencias de la región mitocondrial Citocromo Oxidasa I empleando el método neighbor-joining, el valor bootstrap empleado fue de 1000 réplicas, todas las comparaciones por debajo del 50% se colapsaron.

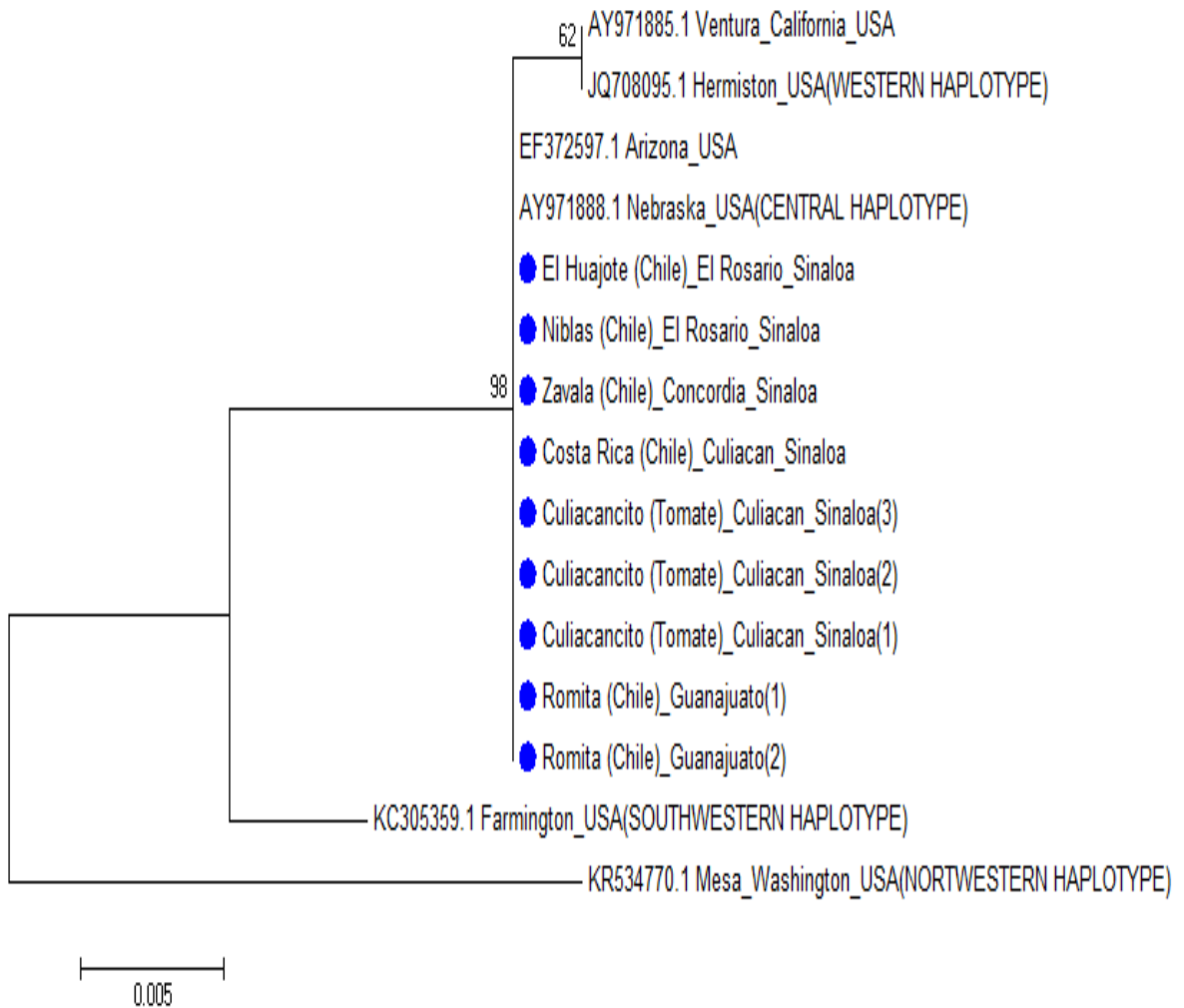


Figura 16: Árbol consenso en Máxima Verosimilitud para *B. cockerelli*. Agrupamiento a partir de secuencias de la región mitocondrial Citocromo Oxidasa I empleando el método de Máxima Verosimilitud, el valor bootstrap empleado fue de 1000 réplicas, todas las comparaciones por debajo del 50% se colapsaron.

2. Secuencias correspondientes a la región 16S de *C. Liberibacter solanacearum* en *B. cockerelli*.

a. Alineamiento

Para el caso de la región 16S para la bacteria se obtuvieron y alinearon 9 secuencias de la bacteria provenientes de 4 regiones de 2 estados de México (Guanajuato y Sinaloa), se realizó un alineamiento con secuencias depositadas en GenBank con números de acceso EU935004.1, FJ395218.1, FJ395214.1, KC771219.1, KF776423.1, EU918196.1, FJ829807.1, KF776422.1, HM245242.1, GU373049.1, EU921627.1, entre otras correspondientes a las secuencias reportadas de los tres haplotipos existentes para *C. Liberibacter solanacearum* provenientes de Finlandia, Nueva Zelanda, México y E.U.A dando un total de 31 secuencias en el alineamiento.

Todo lo anterior se realizó empleando el programa MEGA versión 6 (Tamura *et al.* 2013), en el cual se realizó un corte a las secuencias originales de 1128 pb tanto al inicio como al final de las mismas, para hacer posible la comparación con las secuencias reportadas en GenBank, el corte mencionado fue hecho de igual forma que en el caso de COI, en una sección de sitios invariables para no afectar los resultados esperados de la determinación de haplotipos, cuyo análisis toma como primordial la detección de sitios variables. Una vez realizados los cortes a las cadenas nucleotídicas, el tamaño final de las mismas fue de 903 pb con la finalidad de someter a comparativo con la mayor cantidad de secuencias posibles ya reportadas en GenBank.

Nombre	Secuencia		
KF776423 Leon Gto (papa)	G	C	A
Cortazar(Tomate)_Guanajuato_Mexico(1)	.	.	.
Cortazar(Tomate)_Guanajuato_Mexico(2)	.	.	.
Cortazar(Tomate)_Guanajuato_Mexico(3)	.	.	.
EU935004.1_Nueva_Zelanda	T	T	.
FJ395214.1_Monterrey_Mexico	T	T	.
FJ395218.1_Dakota_del_Norte_USA	.	.	.
KC771219.1_Thailandia	T	T	.
KF776423.1_Leon_Guanajuato_Mexico	.	.	.
Costa Rica(Chile)_Culiacan_Sinaloa(2)	.	.	.
Romita(Chile)_Guanajuato_Mexico(1)	.	.	.
Romita(Chile)_Guanajuato_Mexico(2)	.	.	.
Culiacancito(Tomate)_Culiacan_Sinaloa(2)	.	.	.
Culiacancito(Tomate)_Culiacan_Sinaloa(4)	.	.	.
Culiacancito(Tomate)_Culiacan_Sinaloa(5)	.	.	.
FJ829807.1_Kansas_USA(Solanum_tuberosum)(HAPLOTYPE_B)	.	.	.
KF776422.1_La_Cruz_de_Elota_Sinaloa	.	.	.
HM245242.1_Southcentral_Washington_USA	.	.	.
GU373049.1_Finlandia(Daucus_carota)(HAPLOTYPE_C)	T	T	G
KR935887 Edo Mex (papa) Hap A	T	T	.
KR935886 Edo. MEx (papa) Hap A	T	T	.
EU812559 California (B. cockerelli) Hap A	T	T	.
FJ395216 Guatemala (papa) Hap A	T	T	.
FJ957896 Sinaloa (chile) Hap A	T	T	.
FJ829813 Colorado (papa) Hap B	.	.	.
FJ829815 Kansas (papa) Hap B	.	.	.
FJ829812 Chihuahua (papa) Hap B	.	.	.
FJ498806 Saltillo (papa) Hap B	.	.	.
FJ829809 Texas (papa) Hap B	.	.	.
EU921627.1_Texas_USA	.	.	.
GU373048 Finlandia (zanahoria) Hap C	T	T	G
Posición Original (Previo al corte de secuencias)	167	540	998

Figura 17: Alineamiento y comparación de las secuencias obtenidas para 16S entre los sitios de muestreo y accesiones registradas en GenBank. Comparativo entre las secuencias obtenidas y las ya reportadas en GenBank de la región 16S de *C. Liberibacter solanacearum* descartando los sitios invariables. Una vez efectuada la edición de las mismas se agruparon de acuerdo a los sitios variables que presentan, en la base de datos se incluyeron secuencias de los tres haplotipos reportados para *C. Liberibacter solanacearum* transmitidos por *B. cockerelli*.

b. Determinación de haplotipos de *C. Liberibacter solanacearum* en base a las secuencias obtenidas de la región 16S

Una vez realizado el alineamiento y corte de las 31 secuencias, obtenidas de las muestras propias y las ya reportadas, se creó una base de datos en el programa MEGA 6 y esta se cambió a formato FASTA para proceder a la determinación de los haplotipos en las muestras obtenidas de los estados de Sinaloa y Guanajuato empleando también el programa DNAsp (Rozas *et al*, 1999) de manera similar para el gen COI. También se definieron poblaciones, en función de la región de colecta quedando establecidas como “Guanajuato” y “Sinaloa”, se definió una población total para estas dos zonas de colecta en conjunto, con el mismo propósito de hacer un comparativo entre lo existente en la zona a manera global y lo ya reportado, quedando establecida esta como “Total México”. Las poblaciones se sometieron a un análisis de determinación de haplotipos por población en DNAsp el cual arrojó un único haplotipo entre las muestras propias, teniendo el dato de diversidades tanto Haplótica (H_d) como la nucleotídica (π) igual a 0, por consecuencia los datos adicionales de varianza también fueron igual a 0. Una vez determinada la cantidad de haplotipos existentes en las muestras obtenidas en las regiones de colecta, se procedió a la identificación. Para esto se realizó un comparativo entre la población “Total México”, por tratarse también de un único haplotipo, y las secuencias ya reportadas en GenBank, estas secuencias previamente fueron identificadas y reportadas como correspondientes a los haplotipos “A”, “B” y “C” (Nelson *et al*, 2011).

Como resultado, el haplotipo identificado en los sitios de muestreo corresponde al haplotipo “B” puesto que los datos de número de sitios variables (S) y la diversidad Nucleotídica (π) fueron igual a 0, este resultado es congruente con lo reportado por Nelson *et al*, (2011), quien mencionó que este haplotipo tiene presencia en cultivos de papa, chile y tomate en México principalmente en los estados de Chihuahua y Coahuila y en E.U.A. desde el estado de Texas hasta Washington, no obstante para Sinaloa, México, el mismo autor describe que en el estado solo se encuentra el haplotipo “A” de *C. Liberibacter solanacearum*, sin embargo en GenBank se cuenta con una secuencia de la región 16S de *C. Liberibacter solanacearum* en cultivo de tomate con número de acceso KF776422.1 aportada por Melgoza-Villagomez *et al*, (2013), integrante de nuestro equipo de investigación, descrita para la región de La Cruz de Eleta, Sinaloa, asociada al haplotipo “B”,

concordando con lo reportado en el presente estudio. Además se comparó el haplotipo identificado en los sitios de colecta con los otros tres antes mencionados para ver la divergencia genética entre sí. Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 8.

Cuadro 8: Análisis de divergencia de ADN entre poblaciones en base a la región 16S, empleando el programa DNAsp.

POBLACION 1	n1	POBLACION 2	n2	nTotal	Total de Sitios	S	π	k
TOTAL MEXICO	9	HAPLOTIPO A	3	12	903	2	0.00092	0.818
TOTAL MEXICO	9	HAPLOTIPO B	3	12	903	0	0	0
TOTAL MEXICO	9	HAPLOTIPO C	2	11	903	3	0.0011	0.982
HAPLOTIPO A	3	HAPLOTIPO C	2	5	903	1	0.00067	0.6

n1, n2 Numero de Secuencias para cada poblacion
nTotal Numero total de secuencias
S Numero de Sitios Variables
 π Diversidad Nucleotídica
k Numero promedio de diferencias de nucleotidos

En el comparativo entre el haplotipo “B”, explícito en la población “Total México”, y el “C” la diversidad nucleotídica es la mayor de todas las comparaciones posibles siendo igual a 0.0011, sin embargo no fue posible compararlo con otros resultados previamente descritos por no encontrarse fuentes que describieran esa información.

También, empleando las 31 secuencias de la base de datos generada para 16S en la cual se incluyeron los 3 haplotipos reportados para *C. Liberibacter solanacearum*, se realizaron pruebas de neutralidad de “D de Tajima” y “Fu and Li” empleando el programa DNAsp generando una tabla arrojando datos de θ y π , estos nuevos valores corresponden al comparativo de los 3 haplotipos de manera global (Cuadro 9). Para este caso, los valores de las pruebas de neutralidad fueron positivos, ya que el valor de π es mayor que θ_{nuc} lo que indica bajos niveles de polimorfismos de alta y baja frecuencia, además indica que algunos alelos se encuentran bajo selección positiva (Tajima, 1989).

Además, con la ayuda del programa MEGA 6, también se identificaron las variaciones en la secuencia de nucleótidos original en comparación con los haplotipos reportados en distintas regiones del mundo y fue posible la ubicación del sitio y a que nucleótido hace referencia dicha variación. Los resultados se muestran en la Cuadro 10. La variación a nivel de nucleótidos se ve reflejada a nivel de cadena de aminoácidos, el cambio en la posición 540 entre el haplotipo B y los otros dos haplotipos (C-T) da como resultado el cambio de ácido glutámico (Glu o E), presente en el haplotipo B, por Lisina (Lys o K), presente en los haplotipos A y C. Lo anterior se determinó haciendo un comparativo, en el programa MEGA 6, entre las secuencias reportadas en GenBank para los haplotipos A, B y C con números de acceso KF776423, GU373049.1 y EU812559 respectivamente, el haplotipo “B” reportado en GenBank comparte el 100% de homología con el correspondiente a nuestro estudio. En comparación con el gen mitocondrial COI en donde se encontraron un mayor número de variaciones a nivel de cadena de nucleótidos, en el gen 16S la variación fue mucho menor, sin embargo representa un cambio a nivel de cadena de aminoácidos más grande, es decir para COI hay un cambio significativo a nivel cadena nucleotídica pero no a nivel de proteína, para 16S no hay un cambio tan significativo a nivel de cadena nucleotídica pero esta pequeña variación impacta a nivel cadena proteínica.

Cuadro 9: Análisis de divergencia de ADN y pruebas “TajimaD” y “Fu and Li” para las 31 secuencias utilizadas de la fracción de la región 16S, empleando el programa DNAsp.

Population	n	Sites	S	H	Hd	VarHd	π	Var π	θ_{nuc}	k	θ_{seq}	TajimaD	FuLiD
Todas las secuencias 16S	31	903	3	3	0.486	0.0065	0.00115	0	0.00084	1.028	0.7509	0.8602	0.9457

n Numero de secuencias	π Diversidad Nucleotídica
S Numero de sitios variables	Varπ Varianza de π
H Numero de Haplotipos	θ_{nuc} Valor tetha de numero de S por sitio
Hd Diversidad Haplotípica	k Numero promedio de diferencias de nucleotidos
VarHd Varianza de Hd	θ_{seq} Valor tetha de numero de S por secuencia

Cuadro 10: Representación del número de sitios variables para 16S; "S".

HAPLOTIPO	SITIO ORIGINAL		
	167	540	998
A	T	T	A
B	G	C	A
C	T	T	G

c. Determinación de la filogenia de *C. Liberibacter solanacearum* en base a la región 16S

A partir del alineamiento de secuencias, de manera muy similar que para COI, se realizó la construcción de dendogramas utilizando el algoritmo de “Máxima verosimilitud” (Maximum Likelihood) y “neighbor-joining” en MEGA versión 6 (Tamura *et al.* 2013). Las figuras 18 y 19 muestran el árbol consenso para cada algoritmo empleado, en ambos el porcentaje de réplicas de los árboles en los cuales se asoció a *C. Liberibacter solanacearum* proveniente de las diferentes regiones de colecta fue mediante una prueba bootstrap igual a 1000. Para ambos métodos, los árboles construidos son muy similares, la representación en los dendogramas elaborados resalta la información mostrada en el Cuadro 8, las secuencias obtenidas de las regiones de estudio quedan agrupadas en el mismo clado en donde se encuentran las secuencias reportadas en GenBank para el haplotipo “B” con una baja diversidad nucleotídica ($\pi = 0$), además los valores comparativos de π entre el haplotipo “B” y el “C”, fueron los más altos entre todos los comparativos, esto indica que se encuentran más alejados genéticamente entre sí ($=0.0011$), el soporte bootstrap arrojó un valor entre 87 y 88 % de probabilidad de que se presente dicha agrupación para ambos métodos.

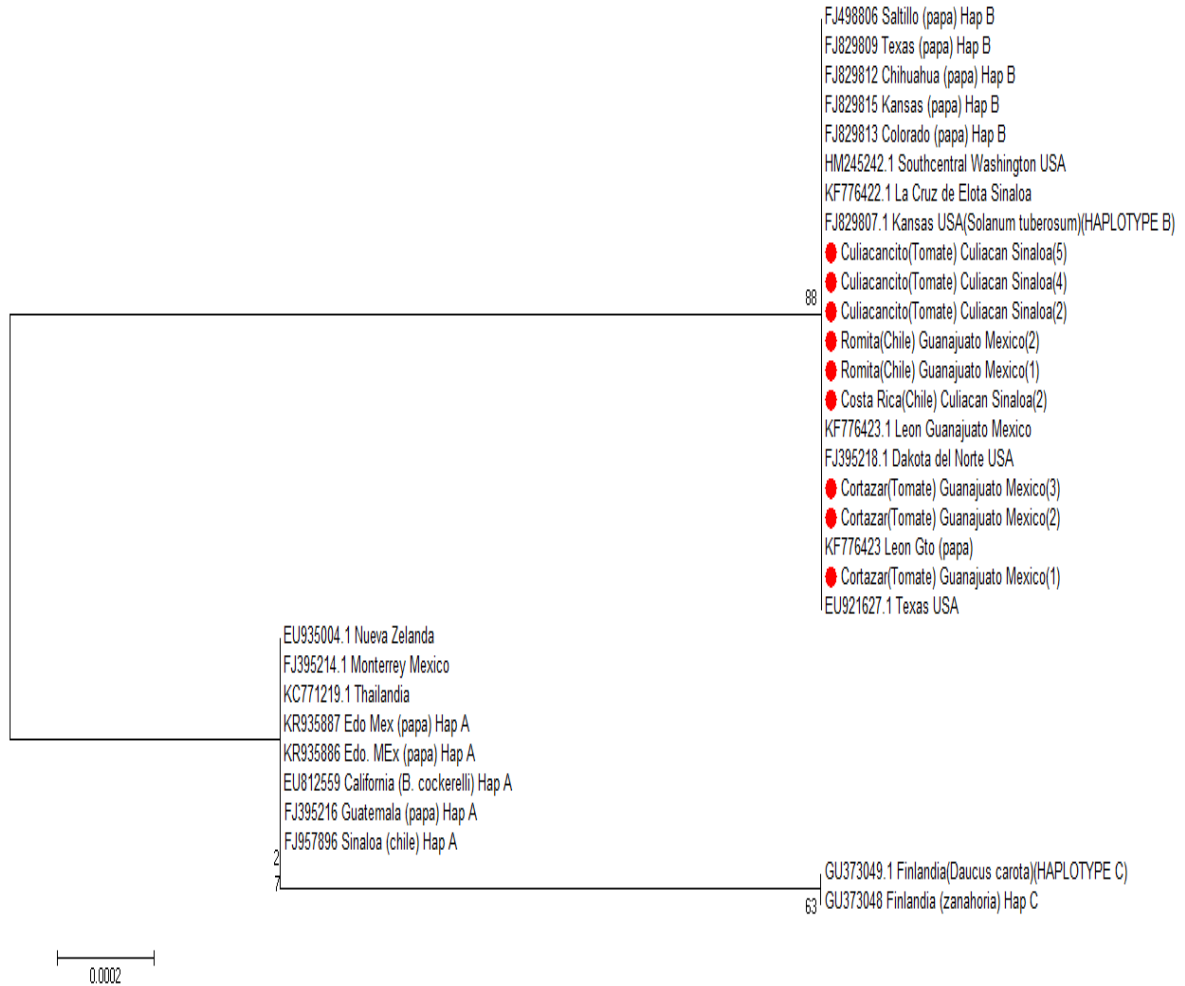


Figura 18: Árbol consenso en neighbor-joining para *C. Liberibacter solanacearum* en *B. cockerelli*. Agrupamiento a partir de secuencias de la región 16S empleando el método neighbor-joining, el valor bootstrap empleado fue de 1000 réplicas, todas las comparaciones por debajo del 50% se colapsaron.

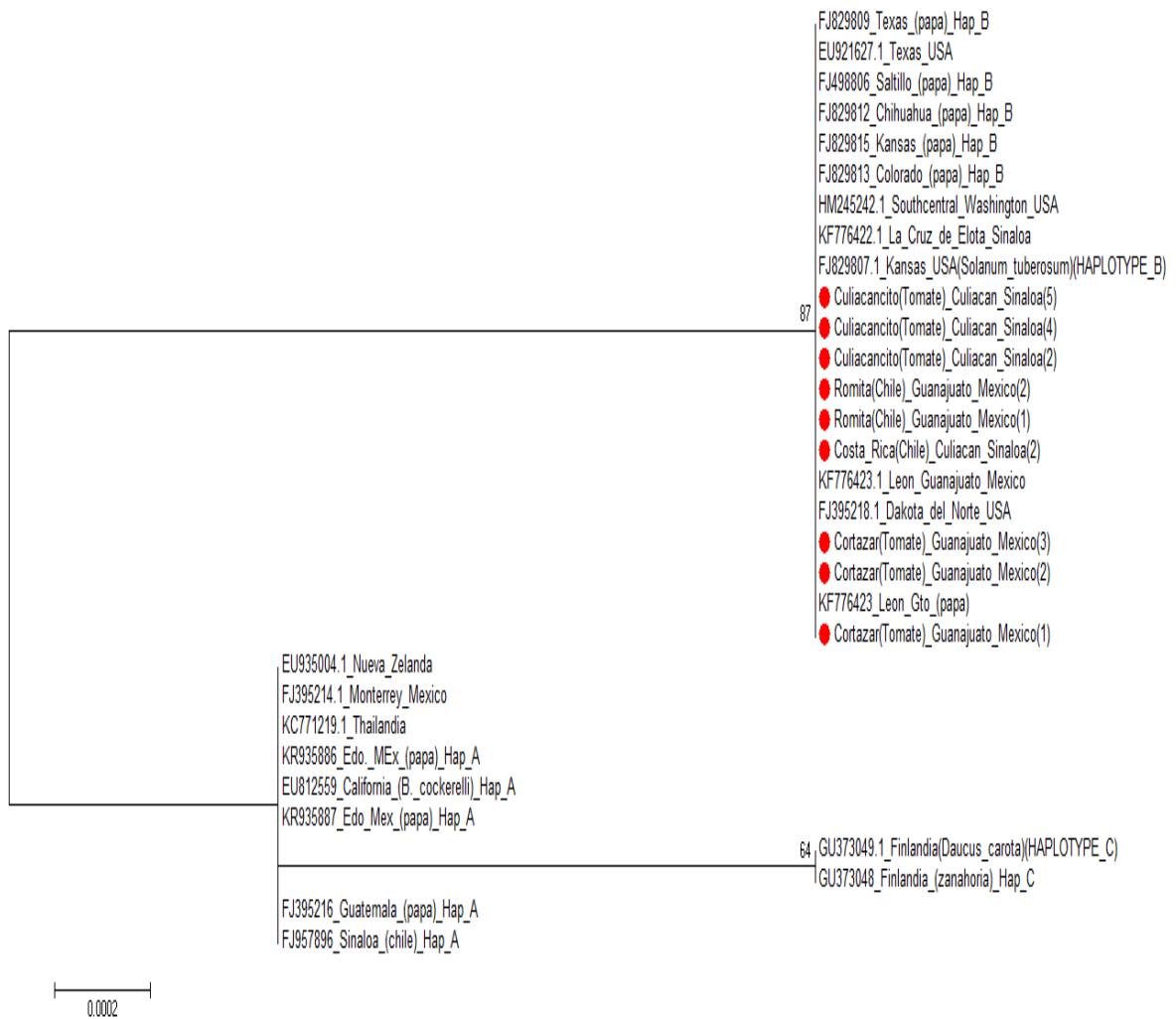


Figura 19: Árbol consenso en Máxima Verosimilitud para *C. Liberibacter solanacearum* en *B. cockerelli*. Agrupamiento a partir de secuencias de la región 16S empleando el método de Máxima Verosimilitud, el valor bootstrap empleado fue de 1000 réplicas, todas las comparaciones por debajo del 50% se colapsaron.

VII CONCLUSIONES

El análisis de las secuencias del ADN mitocondrial de *B. cockerelli* colectado en las regiones de Sinaloa y Guanajuato, México, agrupó por ambos métodos, Máxima Verosimilitud y Neighbor-joining, al gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I en el clado correspondiente al haplotipo “Central” de las accesiones de Nebraska y Arizona, E.U.A. el cual se reporta por primera vez en el Sinaloa, anteriormente solo se tenía identificado la presencia de este haplotipo en específico en el centro y este de México.

El análisis de las secuencias del ADN correspondiente a un fragmento amplificado de la región 16S de *C. Liberibacter solanacearum*, extraído de *B. cockerelli*, agruparon en el clado correspondiente al haplotipo “B”, a las muestras procedentes de Sinaloa y Guanajuato, México.

El presente estudio fue dirigido sobre *B. cockerelli* y *C. Liberibacter solanacearum* en *B. cockerelli*, por las secuencias encontradas en GenBank para la bacteria en el estado de Sinaloa se tiene la presencia de los haplotipos “A” y “B” (Números de acceso FJ957896 y KF776422) identificados directamente de plantas infectadas de chile y tomate respectivamente, se infiere que el haplotipo “Central” de *B. cockerelli* está asociado a estos dos haplotipos de la bacteria, ya que no se encontró otro haplotipo diferente del insecto vector.

Para el caso de la relación filogeográfica la cual está planteada como objetivo específico número 5, las características físicas de los sitios geográficos en donde se realizó la colecta del insecto, mostradas en el Cuadro 3, como la temperatura, clima, altitud y tipo de vegetación principalmente indican una diferencia significativa entre ambas regiones de estudio, pero al parecer estos factores no son suficientes para que impacten en la variabilidad del insecto y de la bacteria de manera significativa en el tiempo que tienen de estar interactuando entre sí.

En el caso del análisis del gen COI a pesar de que se encontró una mayor variación entre el ADN de los diferentes haplotipos esto no se reflejó en la variación de aminoácidos a diferencia del análisis correspondiente al gen 16S en donde diferencias menores a nivel de ADN se reflejaron en cambios de aminoácidos, en nuestro caso el haplotipo B se diferenció de los haplotipos “A” y “C” por el cambio de ácido glutámico (Glu o E) por Lisina (Lys o K) originado por un cambio en la posición 540 de las secuencias analizadas de una Citosina por una Tiamina.

VIII BIBLIOGRAFIA

- Abdullah N. 2008. Life history of the Potato Psyllid *Bactericera cockerelli* (Homoptera: Psyllidae) in Controlled Environment agriculture in Arizona. African Journal of Agricultural Research 3:60-67.
- Abernathy R. 1991. Investigations into the nature of the potato psyllid *Paratrioza cockerelli* (SULC). Colorado State University, Fort Collins, CO 54 p.
- Almeyda I., J. Sanchez, and J. A. Garzón-Tiznado. 2008. Vectors Casual of Potato Purple top in Coahuila and Nuevo Leon, Mexico. Agricultura Tecnica Mexicana 141-150.
- Ballard J. and M. Withlock. 2004. The incomplete natural history of mitochondria. Molecular Ecology 729-744.
- Bromham L. and D. Penny. 2003. The modern molecular clock. Nature Review Genetics 216-224.
- Cruickshank R. 2002. Molecular markers for phylogenetics of mites and ticks. Systematic and Applied Acarology 3-14.
- Day W. 1986. Computational complexity of inferring phylogenies from dissimilarity matrices. Bulletin of Mathematical Biology 1-7.
- De Luna E., J. Guerrero and T. Chew-Taracena. 2005. Sistemática biológica: avances y direcciones en la teoría y los métodos de la reconstrucción filogenética. Hidrobiológica 351-370.
- Eguiarte L., V. Souza and X. Aguirre. 2007. Ecología Molecular. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. UNAM. México 594 p.
- FAOSTAT-FAO. 2012. www.faostat.fao.org.
- Felsenstein J. 2004. Inferring phylogenies sinauer associates: sunderland. MA 1-17.
- Fitch W. and E. Margoliash. 1967. Construction of phylogenetic trees. Science 279-284.
- Freeland J. 2005. Molecular Ecology. Jonh Wiley & Sons. New York. pp: 25-47.
- Fu Y. X. and W. H. Li. 1993. Statistical Tests of Neutrality of Mutations. Center for Demographic and Population Genetics. University of Texas. Houston, Texas pp: 17.
- Garzón-Tiznado J. A. 1984. Enfermedad del "permanente" del jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en Celaya, Guanajuato. Sociedad Mexicana de Fitopatología pp: 138.

- Garzon-Tiznado J. A. 2010. *Paratrioza (Bactericera) cockerelli* Sulc, vector de la bacteria *Candidatus Liberibacter solanacearum*-Zebra chip en papa. Doctorado Regional en Biotecnología. FCQB-UAS 1-12.
- Gascuel, O. 2006. Approximate likelihood-ratio test for branches: a fast, accurate and powerful alternative. *Society of Systematic Biologists* 539-552.
- Hansen A., J. Trumble, R. Stouthamer and T. Paine. 2008. New huanglongbing (HLB) *Candidatus* species, “*C. Liberibacter psyllauros*”, found to infect tomato and potato is vectored by the psyllid *Bactericera cockerelli* (Sulc). *Applied and Environmental Microbiology* 58-65.
- Herrera J. 2005. Filogenia bacteriana mediante el análisis del rRNA 16S. Carrera de Biología, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México 10.
- Hodge T. and M. Cope. 2000. A myosin family tree. *J Cell Sci* 54.
- Hudson D. and R. Rupp. 2011. *Phylogenetic Networks. Concepts, Algorithms and Applications.* University Press. 2. New York. pp: 47-65.
- James A. and J. Ballard. 2003. Mitochondrial genotype affects fitness in *Drosophila simulans*. *Genetics* 187-194.
- Kambhampati S. and P. Smith. 1995. PCR primers for the amplification of our insect mitochondrial gene fragments. *Insect Molecular Biology* 233-236.
- Knowlton G. and M. Janes. 1931. Studies on the biology of *Paratrioza cockerelli* (Sulc). *Annals of the Entomological Society of America* 283-291.
- Lemey P., M. Salemi and A. Vandamme. 2009. *The Phylogenetic Handbook: a Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing.* University of California. California, U.S.A. pp: 78-83.
- Liefting L., B. Weir, S. Pennycook and G. Clover. 2009. *Candidatus Liberibacter solanacearum*, associated with plants in the family Solanaceae. *European and Mediterranean Plant Protection Organization* 2:1-5.
- Lin H., B. Lou, J. Glynn, H. Doddapaneni, E. Civerolo, and C. Chen. 2011. The Complete Genome Sequence of *Candidatus Liberibacter solanacearum*, the Bacterium Associated with Potato Zebra Chip Disease. *PLoS One* 6 4:1-13

- Liu D., J. Trumble and R. Stouthamer. 2006. Genetic differentiation between eastern populations and recent introductions of potato psyllid (*Bactericera cockerelli*) into western North America. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 177-183.
- CONAGUA. 2015. www.conagua.gob.mx
- López B. 2012. Variación genética de *Bactericera cockerelli* (Sulc) (hemiptera: triozidae) en las zonas paperas de México. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo Leon 92.
- Lopez B., S. Favela, G. Ponce, R. Foroughbakhch and A. Flores. (2013). Genetic Variation in *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae) from Mexico. *Molecular entomology* 7.
- López M., L. Gastélum, O. Olivas and M. Corrales. 2003. Experiencia con *Paratrioza cockerelli* Sulc. (Homoptera:Psyllidae) en tomate grape variedad 'Santa' y berenjena Solanum melongena. VI Congreso Internacional en Ciencias Agrícolas. UABC-ICA, CESVBC, FUNDACIÓN PRODUCE BC, SAGARPA.. Mexicali, Baja California pp: 670-675)
- Lowe A., S. Harris and P. Ashton. 2004. *Ecological genetics: design, analysis and applications*. Blackwell Science Ltd 1-18.
- Nelson W., T. Fisher and J. Munyaneza. 2011. Haplotypes of "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" suggest long-standing separation. *European Journal of Plant Pathology* 130:5-12.
- Nelson W., V. Sengoda, A. Alfaro, M. Font, J. Crosslin and J. Munyaneza. 2012. A new haplotype of *Candidatus Liberibacter solanacearum*, identified in the Mediterranean región. *European Journal of Plant Pathology* 4-16.
- Rodicio M. and M. Mendoza. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. Departamento de Biología Funcional. Área de Microbiología. Universidad de Oviedo, España pp: 238-245.
- Rozas J., P. Librado, J. Sánchez, X. Messeguer and R. Rozas. 1999. DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics*, 174-175.

- Salinas H. 2010. Identificación de haplotipos de *Spodoptera frugiperda* en algunas poblaciones de Colombia para el estudio del comportamiento migratorio de la especie. Facultad de ciencias. Posgrado en ciencias- entomología. Medellín, Colombia 1-93.
- Schmidt, H. 2009. Phylogenetic inference using maximum likelihood methods. The phylogenetic handbook. New York 18 p.
- SIAP-SAGARPA. 2014. www.siap.sagarpa.gob.mx.
- Soltis R. 2003. Applying the Bootstrap in Phylogeny Reconstruction. *Statistical Science* 256–267.
- Swisher K., D. Henne and J. Crosslin. 2014. Identification of a Fourth Haplotype of *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae) in the United States. *Journal of Insect Science* 1-7.
- Swisher K., D. Henne and J. Munyaneza. 2014. Latent Period and Transmission of *Candidatus Liberibacter solanacearum* by the Potato Psyllid *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae). *PLoS ONE* 1-10.
- Swisher K., V. Sengoda, J. Dixon, E. Echeagaray, A. Murphy, S. Rondon and J. Crosslin. 2013. Haplotypes of the Potato psyllid, *Bactericera cockerelli*, on the Wild Host Plant, *Solanum dulcamara* in the Pacific Northwestern United States. *American Journal of Potato Research* 90:570-577.
- Swofford D., G. Olson, P. Waddell and D. Hillis. 1996. Phylogenetic inference. *Molecular systematics* 407-514.
- Tajima F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 585–595.
- Tamura K., G. Stecher, D. Peterson and S. Kumar. 2013. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 12. U.S.A. pp: 2725-2729.
- Thao M., M. Clark, D. Burckhardt, N. Moran, P. Baumann. 2004. Phylogenetic analysis of vertically transmitted psyllid endosymbionts (*Candidatus Carsonella ruddii*) based on *atpAGD* and *rpoC*: Comparisons with 16S-23S rDNA-derived phylogeny. *Current Microbiology* 1-17.
- Vanmeer M., J. Witteveldt and R. Stouthamer. 1999. Phylogeny of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* based on the *wsp* gene. *Insect Molecular Biology* 399-408.

- Vega G., M. Rodríguez, O. Díaz, M. Bujanos, D. Mota, C. Martínez and J. A. Garzón-Tiznado. 2008. Susceptibilidad a insecticidas en dos poblaciones mexicanas del salerillo, *Bactericera cockerelli* (Sulc) (HEMIPTERA: TRIOZIDAE). Agrociencia 463-471.
- Weising K., H. Nybom, K. Wolff and G. Kahl. 2005. DNA Fingerprinting in plants: Principles, Methods and Applications. 2 ed. Taylor & Francis Group, U.S.A 472 p.

Glosario y abreviaturas

16S: Polirribonucleótido codificado por el gen *rrs*, también denominado ADN ribosomal 16S.

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

ADNmt: Ácido Desoxirribonucleico mitocondrial.

Análisis bootstrap: Técnica de muestreo que, a partir de la simulación, crea sucesivas muestras con reemplazamiento que teóricamente son una buena aproximación al universo muestral.

Árbol consenso: Árboles derivados que se construyen a partir de otros árboles y resumen a un conjunto de árboles. Suele tener dos aplicaciones básicas. Una es la de unir la información obtenida para la misma filogenia pero realizada con datos diferentes, por ejemplo, unir un árbol formado a partir de datos morfológicos y otro de datos moleculares. La otra aplicación que es la más frecuente es para reunir en un solo árbol la presencia de varios árboles resultado de ser los más parsimoniosos en el análisis cladista.

ARN: Ácido Ribonucleico.

Bionomía: Refiere al conocimiento de un género en el ecosistema en el que habita: su distribución, hábitats, etología, modificaciones de la densidad poblacional, longevidad, hábitos, capacidad vectorial, etc.

Clado: Un grupo monofilético en un cladograma.

COI: Gen mitocondrial correspondiente a la subunidad Citocromo Oxidasa I.

CONAGUA: Comisión Nacional del Agua.

Dendograma: Cualquier diagrama semejante a un árbol.

Filogenética: Procede de Hennig (1966). Está basada en la clasificación mediante las relaciones filogenéticas entre taxones monofiléticos. Se busca la secuencia de transformaciones de estados plesiomorfos a apomorfos.

Filogeografía: Disciplina que estudia los principios y procesos que gobiernan la distribución geográfica de los linajes genealógicos.

Fitoplasma: Organismos pleomórficos, sin pared celular, y están rodeados de una membrana. Su diámetro varía mucho; cuerpos que miden 50 a más de 1,000 nm se han hallado en la mayoría de las enfermedades de este tipo. Los cuerpos de los fitoplasmas contienen un enrejado fibrilar de hebras, que se supone son ADN, y áreas con gránulos semejantes a ribosomas. Estos organismos

aparentemente se propagan por fisión binaria, gemación o fragmentación. Los fitoplasmas son los procariontes más pequeños capaces de replicación autónoma.

Haplotipo: Única forma genética dentro de los biotipos que difiere de cualquier otra forma por variaciones en las posiciones individuales (al menos en un nucleótido) en una secuencia de ADN.

Loci: Plural de locus.

Locus: Posición fija sobre un cromosoma, como la posición de un gen o de un marcador genético.

Marcador molecular: Biomoléculas pueden ser relacionadas con un rasgo genético

Método Máxima Verosimilitud: Es uno de los métodos basados en caracteres empleados para realizar inferencias filogenéticas, a través del cual se busca determinar la organización de las ramas de un árbol filogenético y su longitud, para evaluar las hipótesis evolutivas de un grupo de taxones, o OTUS como también suelen ser denominados los extremos de las ramas.

Método Neighbor Joining: Propuesto por Saitou y Masatoshi Nei en el año de 1987 y consiste en la unión de los OTU's más cercanos (vecinos) tratando de minimizar la longitud total del árbol.

mM: Abreviatura para expresar el término "milimolar".

Ninfa: Estado intermedio en la metamorfosis de algunos insectos situado entre el huevo y la fase adulta.

pb: Abreviatura para expresar el término de "pares de bases nucleotídicas".

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

SAGARPA: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

SIAP: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera