



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

CARACTERIZACIÓN MORFOMÉTRICA Y GENÉTICA DE *Diaphorina citri* (HEMIPTERA: Liviidae) DE RUTÁCEAS EN CAZONES, VERACRUZ, MÉXICO

FLORINDA GARCÍA PÉREZ

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

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2013

La presente tesis titulada: **CARACTERIZACIÓN MORFOMÉTRICA Y GENÉTICA DE *Diaphorina citri* (HEMIPTERA: Liviidae) DE RUTÁCEAS EN CAZONES, VERACRUZ, MÉXICO** realizada por la alumna Florinda García Pérez bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS

FITOSANIDAD

ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA



DRA. LAURA DELIA ORTEGA ARENAS

ASESOR



DR. JOSÉ ISABEL LÓPEZ ARROYO

ASESOR



DR. JOSÉ REFUGIO LOMELÍ FLORES

ASESOR



DR. ALEJANDRO GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

ASESOR



DR. JESÚS ROMERO NÁPOLES

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Julio de 2013.

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

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

**Florinda García Pérez, Dr.
Colegio de Postgraduados, 2013**

RESUMEN

El psílido asiático de los cítricos, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), es una plaga de importancia cuarentenaria por ser un eficiente vector de la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus*, agente causal del Huanglongbing (HLB). Al ser una plaga invasora y de reciente introducción a nuestro país, es posible que el aislamiento geográfico desde su lugar de origen derive en variaciones morfométricas y biológicas que dificulten la definición de una estrategia de manejo. Por lo anterior en este estudio se planteó realizar estudios de morfometría y conocer la diversidad genética de *D. citri* mediante el uso de una región del marcador genético mitocondrial Citocromo oxidasa subunidad I (COI) en psílicos adultos recolectados en hospedantes rutáceas en la zona citrícola de Cazones, Veracruz. Para complementar el trabajo se incluyeron muestras de los estados de Nuevo León, Michoacán, Veracruz y Yucatán recolectados en diferentes hospedantes cítricos

Los especímenes de adultos se recolectaron mensualmente en el periodo de febrero de 2010 a febrero de 2011 en los siguientes cultivos: lima dulce (*Citrus limetta* Risso); Naranja Marrs (*C. sinensis* L. cv. 'Marrs'); Naranja Valencia (*C. sinensis* cv. 'Valencia'); Naranja 'Selección 8' (*C. sinensis* 'Selección 8'); Pomelo (*C. paradisi* Macfad cv. 'Rio Red') y Murraya (*Murraya paniculata* (L) Jack). En total se recolectaron 4,719 individuos (1,725 machos y 2,994 hembras).

Para realizar la caracterización morfométrica se analizó el 27% de los adultos de la colección total y se consideraron seis caracteres morfológicos: longitud del cuerpo; longitud de alas; amplitud de alas; longitud de los procesos genales, amplitud de los procesos genales y la longitud

de antenas. Las estructuras de machos y hembras se analizaron de manera independiente. La caracterización molecular se hizo con base en 48 individuos con variaciones morfométricamente diferentes en los procesos genales y alas anteriores.

Los resultados mostraron que *D. citri* es una especie con variantes morfométricas y el hospedante posee un efecto determinante en la definición de caracteres. Los hospedantes donde se recolectaron los individuos con mayores variantes morfométricas fueron *C. limetta* y *C. sinensis* cv ‘Selección 8’ y dicha variabilidad fue más evidente en los machos. En ambos sexos, se observó que las variables determinantes para la caracterización morfométrica de *D. citri* fueron la longitud y amplitud de las alas anteriores y la longitud y amplitud de los procesos genales.

A partir del alineamiento de las secuencias del ADN mitocondrial, los resultados indicaron la presencia de un sólo haplotipo (H1) presente en la región de estudio. No se obtuvo un indicio de variación genética en las secuencias de las poblaciones en relación con el hospedero y sexo de los ejemplares. Se confirma que *D. citri* es la única especie asociada a cítricos en la región.

Palabras clave: Procesos genales, variantes morfométricas, haplotipo

**MORPHOMETRY AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Diaphorina citri*
(HEMIPTERA: LIVIIDAE) OF HOST RUTACEAEs FROM CAZONES, VERACRUZ,
MEXICO**

ABSTRACT

The Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), is a pest of quarantine significance because it is an efficient vector of the bacterium *Candidatus Liberibacter asiaticus*, which cause Huanglongbing (HLB). Since it is an invasive pest and was recently introduced into our country, it is possible that geographic isolation from their place of origin derived in morphometric and biological variations that obstruct the definition of any management strategy. The objective of this study was to characterize morphometrically populations of *D. citri*, as well to determine the genetic diversity by using mitochondrial cytochrome oxidase I (COI) in six rutaceous host species in Cazon, Veracruz, Mexico. To complement the work were included samples from the states of Nuevo Leon, Michoacan, Veracruz and Yucatan collected in different rutaceous host species.

Adult specimens were collected monthly during the period February 2010 to February 2011 in the following groves: sweet lime (*C. limetta* Risso); ‘Marrs’ orange (*C. sinensis* L. cv. ‘Marrs’); ‘Valencia’ orange (*C. sinensis* cv. ‘Valencia’); ‘Selection 8’ orange (*C. sinensis* ‘Selection 8’); grapefruit (*C. paradisi* Macfad cv. ‘Rio Red’) and Orange jasmine (*M. paniculata* (L.) Jack. A total 4,719 adults (1,725 males and 2,994 females) were collected throughout the year.

The morphometric characterization was 27% adults of the total collection. Six morphological characters were considered in the analysis: Body length; wing length; wing width; length of genal process; width of the genal process and antenna length. The male and female structures were analyzed independently. The molecular characterization was established on 48 individuals with morphometric variations in genal processes and forewings.

The results of this study reveal the presence of morphometrical variants of *D. citri* and the host has a determining effect on the definition of some characters. The plant taxa that hosted individuals with greater morphometrical variants were *C. limetta* and *C. sinensis* ‘Selection 8’. Variability was more evident in males. In both sexes we observed that the determining variables for the morphometric characterization of *D. citri* were wing lengths and widths as well as genal process lengths and widths.

The alignment of the sequences showed the presence of only one haplotype (H1) present in the study area. No genetic variation was obtained in the sequences of populations in relation to the host and sex of the specimens. It is confirmed that *D. citri* is the only species associated with citrus in the region.

Key words: Genal processes, morphometric variants, haplotype

AGRADECIMIENTOS

Al **Colegio de Postgraduados** por haberme brindado la oportunidad de continuar con mi formación profesional.

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

A la **Dra. Laura Delia Ortega Arenas**, por toda su paciencia, consejos, amistad brindada, pero sobre todo por su acertada dirección en la realización de este trabajo.

A los integrantes de mi consejo particular **Dra. Laura Delia Ortega Arenas, Dr. José Refugio Lomelí Flores, Dr. José Isabel López Arroyo, Dr. Alejandro González Hernández y Dr. Jesús Romero Nápoles**, por su valiosa participación y apoyo incondicional en la asesoría de este trabajo de investigación. Gracias.

Al **Dr. Héctor González Hernández** por su participación como sinodal.

Al **M. C. Jorge Valdez Carrasco**, por su paciencia y apoyo en la toma fotográfica de mis especímenes.

Al **Dr. Gerardo Terrazas y Dr. Humberto Vaquera** por su apoyo en el análisis estadístico.

A mis hermanos **Ana, Poli y Tito**, por ese gran lazo que nos une y porque siempre luchamos para salir adelante.

A mis **compañeros y amigos de generación**, con quienes compartí gratos momentos, todos con el mismo objetivo de no darnos por vencidos.

A mis **compañeros y amigos del Laboratorio de Insectos Vectores**, en especial a **Edgar**, por su valiosa amistad.

A **Don Magdaleno Caballero**, por su apoyo en las salidas de campo.

A todas esas personas que de alguna manera me apoyaron para poder concluir exitosamente con este proyecto. *Gracias*

DEDICATORIA

A mis hijos, mis tres hermosos tesoros que son el eje que le da rumbo y sentido a mi vida

Vanesa, Valeria y Juliancito

Por todos esos momentos de felicidad que me han brindado

Porque son el motor que me impulsa a seguir adelante

Porque gracias a ustedes somos una gran familia

Espero que en un futuro logren cada éxito que se propongan y jamás claudiquen, tomen todo lo bueno de la vida y aprendan a estar siempre unidos

Los amo con todo mi corazón

A mi esposo **Jaime**,

Porque juntos iniciamos un gran proyecto de vida

Por tu paciencia, apoyo incondicional, comprensión y amor

Porque eres el mejor padre y un gran ejemplo para nuestros hijos

Te amo

A mis padres **Teresita y Daniel**, mis viejitos adorados

Porque siempre confiaron en mí

Por todo su amor, humildad, consejos y sacrificios

Porque a ustedes les debo cada éxito alcanzado

Gracias por darme la dicha de ser su hija

Los amo

A ustedes que Dios los bendiga siempre

"No se vive celebrando victorias, sino superando derrotas"
Ernesto Guevara

"El éxito no es tanto hacer lo que se desea como desear lo que se hace"
Dan Brown

"Si un minuto basta para morir, debe bastar para cambiar"
Émile Chartier

CONTENIDO

	Pág.
INDICE DE CUADROS.....	x
INDICE DE FIGURAS.....	xi
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
CAPITULO I. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
1.1 Sistemática de Psylloidea.....	4
1.2 Clasificación taxonómica de <i>Diaphorina citri</i>	5
1.2.1 Características distintivas del género <i>Diaphorina</i>	7
1.3 Distribución de <i>Diaphorina citri</i>	7
1.4 Descripción y Biología de <i>Diaphorina citri</i>	8
1.5 Plantas hospedantes.....	11
1.6 Dispersión.....	13
1.7 Factores ambientales y biológicos que determinan la abundancia de <i>D. citri</i>	15
1.7.1 Temperatura.....	16
1.7.2 Precipitación.....	17
1.7.3 Altitud.....	18
1.7.4 Período de brotación.....	18
1.7.5 Podas.....	20
1.7.6 Fertilización.....	20
 CAPITULO II. MORFOMETRÍA DE <i>Diaphorina citri</i> (HEMIPTERA: LIVIIDAE) DE SEIS RUTÁCEAS EN CAZONES, VERACRUZ, MÉXICO.	 22
2.1 RESUMEN.....	22
2.2 ABSTRACT.....	23
2.3 INTRODUCCIÓN.....	24
2.4 MATERIALES Y MÉTODO.....	26
2.4.1 Ubicación del área de estudio.....	26
2.4.2 Recolección del material biológico.....	26
2.4.3 Identificación del material biológico.....	27
2.4.4 Separación de estructuras.....	27
2.4.5 Caracteres morfológicos evaluados.....	27
2.4.6 Análisis estadístico.....	28
2.5 RESULTADOS.....	28
2.6 DISCUSIÓN.....	38
2.7 CONCLUSIONES.....	42
 CAPÍTULO III. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE <i>Diaphorina citri</i> (HEMIPTERA: LIVIIDAE) DE SEIS RUTÁCEAS EN CAZONES, VERACRUZ, MÉXICO.	 43
3.1 RESUMEN.....	43
3.2 ABSTRACT.....	44

3.3 INTRODUCCIÓN.....	45
3.4 MATERIALES Y MÉTODO.....	46
3.4.1 Recolecta del material biológico.....	46
3.4.2 Determinación de la especie.....	47
3.4.3 Extracción de ADN.....	47
3.4.4 Amplificación de la región COI de ADNmt mediante la técnica de PCR...	48
3.4.5 Electroforesis.....	49
3.4.6 Alineación de las secuencias.....	49
3.4.7 Análisis de relaciones filogenéticas entre haplotipos.....	49
3.5 RESULTADOS.....	50
3.5.1 Determinación de la especie	50
3.5.2 Electroforesis.....	50
3.5.3 Alineación de las secuencias.....	50
3.5.4 Análisis de relaciones filogenéticas entre haplotipos.....	51
3.6 DISCUSIÓN.....	53
3.7 CONCLUSIONES.....	56
CONCLUSIONES GENERALES Y RECOMENDACIONES.....	57
LITERATURA CITADA.....	58

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Pág.
1.1	Plantas hospedantes de <i>Diaphorina citri</i> .	14
2.1	Medidas promedio de seis caracteres morfológicos (mm) (media $\pm$ error estándar) en machos y hembras de <i>Diaphorina citri</i> recolectados en diferentes hospedantes rutáceas en Cazones, Veracruz, México.	34
2.2	Matriz de correlación de Pearson de seis caracteres morfológicos de machos y hembras de <i>Diaphorina citri</i> recolectados en diferentes hospedantes rutáceas en Cazones, Veracruz, México.	35
2.3	Variabilidad estadística por carácter morfológico de machos y hembras de <i>Diaphorina citri</i> recolectados en diferentes hospedantes rutáceas en Cazones, Veracruz, México.	36
3.1	Muestras utilizadas para la extracción de ADN provenientes de diferentes hospedantes y estados.	48
3.2	Diferencias nucleotídicas de los haplotipos encontrados mediante el uso del gen mitocondrial COI.	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
2.1	Estructuras medidas en ejemplares de <i>Diaphorina citri</i> recolectados en Cazones, Veracruz, México. A) Longitud del cuerpo del macho, B) Longitud del cuerpo de la hembra, C) Longitud y amplitud del ala anterior, D) Longitud y amplitud de los procesos genales y E) Longitud de la antena.	29
2.2	Media mensual de adultos de <i>Diaphorina citri</i> recolectados por hospedante en Cazones, Veracruz, México. Las barras representan al error estándar de la media. Las literales en minúscula representan a la comparación de medias entre los machos y las literales en mayúscula a la comparación de medias de las hembras.	30
2.3	Variantes morfométricas de las alas anteriores encontradas en <i>Diaphorina citri</i> . A) Venación típica del ala anterior. B) Macho recolectado en lima, venas Rs y M interrumpidas por venas transversales. C) Hembra recolectada en lima, venas transversales adicionales. D) Macho recolectado en naranja cv 'Valencia', vena M ₃₊₄ ausente. E y F) Machos recolectados en murraya, venas transversales adicionales. Escala: 1 mm.	31
2.4	Variantes morfométricas de los procesos genales encontrados en <i>Diaphorina citri</i> . A) Macho recolectado en naranja cv. 'Valencia', procesos genales cónicos con ápices redondeados. B) Macho recolectado en naranja 'Selección 8', procesos genales cónicos. C) Macho recolectado en naranja 'Selección 8', procesos genales parcialmente separados. D) Macho recolectado en lima, procesos genales fuertemente separados. Escala: 500 µm.	31
2.5	Dispersión de caracteres morfológicos de machos de <i>Diaphorina citri</i> determinada por el primer y segundo componente principal en ejemplares recolectados en diferentes hospedantes rutáceas en Cazones, Veracruz, México.	37
2.6.	Dispersión de caracteres morfológicos de hembras de <i>Diaphorina citri</i> determinada por el primer y segundo componente principal en ejemplares recolectados en diferentes hospedantes rutáceas en Cazones, Veracruz, México.	37
3.1	Gel de agarosa al 2% que muestra algunos fragmentos de la región COI amplificados.	50
3.2	Árbol filogenético de Neighbor-Joining inferido de un fragmento del gen mitocondrial COI para poblaciones de <i>Diaphorina citri</i> . Incluye a <i>Bactericera cockerelli</i> como grupo externo.	52

INTRODUCCIÓN GENERAL

La citricultura representa un segmento económico fundamental de la agricultura mexicana. De las cerca de 560 mil hectáreas sembradas de cítricos se produce un promedio anual de 7 millones de toneladas de fruta, con un valor estimado superior a los 13 mil millones de pesos, lo que sitúa a México en el quinto lugar mundial en producción de cítricos (Salcedo *et al.*, 2010, 2012; SIAP, 2013). Sin embargo, y al igual que en otros países, la industria citrícola mexicana se encuentra regularmente amenazada por diferentes plagas de importancia cuarentenaria que han impactado negativamente la producción y rendimientos de los cultivos, requiriendo de la intervención del gobierno y de los productores en su prevención y manejo. Entre los fitopatógenos que destacan por sus efectos devastadores se encuentra enfermedad causada por la bacteria *Candidatus Liberibacter* var. *africanus*, *asiaticus* y *americanus* (da Graca & Korsten, 2004; Halbert & Manjunath, 2004; Bové, 2006; Manjunath *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009), conocida como “Huanglongbing” (HLB) o enverdecimiento de los cítricos, enfermedad que deteriora la calidad de los frutos y de la planta en general. Las pérdidas económicas que ocasiona el HLB van desde reducciones crecientes de los rendimientos hasta la pérdida total de la plantación, debido a que los árboles infectados por HLB tienen que eliminarse a fin de evitar la diseminación de la bacteria (Halbert & Manjunath, 2004; Salcedo *et al.*, 2010).

Diaphorina citri Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), el Psílido Asiático de los Cítricos (PAC), es el vector primario del HLB, de modo que el control del vector es vital para el manejo de la enfermedad (Halbert & Manjunath, 2004; SENASICA, 2012).

El HLB, se detectó por primera vez en América en 2004, en el estado de Sao Paulo, Brasil y en 2005 se confirmó su presencia en Florida, EUA, donde ha tenido efectos devastadores (Cermeli *et al.*, 2000, Halbert & Núñez, 2004, Villalobos *et al.*, 2004; Halbert, 2005). En México, el HLB se detectó en julio de 2009 en huertos comerciales y de traspatio en el estado de Yucatán y de ahí se ha dispersado a otras entidades poniendo en riesgo la citricultura del país (SENASICA, 2012).

En México, el primer informe formal de la presencia del PAC se dio a conocer en el 2002 en el estado de Campeche y Quintana Roo. En 2003, se registró simultáneamente en los estados de Nuevo León y Tamaulipas; para 2004, la plaga se extendió a los estados de Colima, Querétaro, San Luis Potosí, Tabasco y Yucatán (López-Arroyo *et al.*, 2005), en 2005 se registró en Sinaloa. Durante 2006, el insecto se encontró en los estados de Michoacán, Oaxaca, Sinaloa y Sonora. Finalmente en 2008 se colectó en Tijuana, Baja California y Coahuila (López-Arroyo *et al.*, 2008) y con esto terminó por invadir todas las entidades productoras de cítricos del país (SENASICA, 2012).

El PAC tiene preferencia exclusiva por plantas de la familia Rutaceae y su reproducción es dependiente de la disponibilidad de brotes por lo que la presencia de éstos y en consecuencia la dinámica de población del PAC y enemigos naturales asociados puede variar entre regiones (Yang *et al.*, 2006; Halbert & Manjunath, 2004; Ortega-Arenas *et al.*, 2013). A razón de lo anterior, se ha intensificado la investigación relativa a biología, ecología y comportamiento del psílido y la enfermedad, a fin de entender y encontrar elementos para mejorar el muestreo y estrategias de manejo de esta plaga

Las especies de Psylloidea como plagas agrícolas han sido poco estudiadas a nivel nacional, con frecuencia no se especifica su identidad o erróneamente son confundidas con otros grupos. Hasta la fecha en México no se dispone de un registro detallado de las especies de psíloideos y plantas hospedadas. Prácticamente la investigación en el grupo se ha centrado al psílido del tomate *Bactericera cockerelli* y más recientemente, a raíz de su detección en Campeche en 2002, a *D. citri* (López-Arroyo *et al.*, 2005); pero se sabe que existen especies de psílicos asociados a los cítricos que podrían ser vectores potenciales del HLB, como *Cacopsylla citrisuga* (Yang & Li) (Cen *et al.*, 2012) y *D. communis* Mathur (Donovan *et al.*, 2011) y de estar presentes en México, incrementarían el riesgo del establecimiento de la enfermedad.

Con base en lo anterior se plantearon como objetivos el realizar la caracterización morfométrica de adultos de *D. citri* procedentes de seis rutáceas hospedantes y explorar si el hospedante tiene

alguna repercusión importante en la definición de morfos y conocer la diversidad genética de *D. citri* en seis rutáceas hospedantes mediante el uso del gen mitocondrial COI.

Con el fin de alcanzar los objetivos propuestos, el presente trabajo se organizó en tres capítulos. En el primero se proporciona información relevante del PAC, donde se hace hincapié en la nueva clasificación taxonómica así como la morfología, biología y ecología, plantas hospedantes, y factores que determinan su abundancia. En el capítulo dos, parte central de esta investigación, se aborda el estudio de la morfometría de *D. citri* en relación con la hospedante y por último, en el tercer capítulo, se muestran los resultados del estudio genético de *D. citri* en diversos hospedantes.

CAPÍTULO I

REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 Sistemática de Psylloidea

Filogenéticamente la superfamilia Psylloidea Latreille, 1807 constituye el taxón hermano de todos los Sternorrhyncha (Campbell *et al.*, 1994). Con base en estudios morfológicos y moleculares Quaintance & Baker (1915), Schlee (1969) y Shcherbakov (2007) concluyen que los psíloideos pertenecen al taxón de Aleyrodoidea y están escasamente representados en el registro fósil del jurásico temprano (Grimaldi y Engel, 2005). White & Hodkinson (1985) sugieren que los principales clados existentes de Psylloidea tuvieron un origen Gondwana y que sus ancestros originalmente se alimentaban de una especie de Rutales (=Sapindales) antes de su ruptura.

White & Hodkinson (1985) realizaron una clasificación fenética y cladística para Psylloidea, con base en caracteres de ninfas y adultos, información de la planta hospedante y datos zoogeográficos y elaboraron un cladograma para describir la posible historia evolutiva. El cladograma quedó integrado por seis familias que se derivaron de un ancestro común extinto. Las familias que se clasificaron fueron: Triozidae, Carsidaridae, Homotomidae, Phacopteronidae, Calophyidae y Aphalaridae. Establecen que las familias Spondyliaspidae y Psyllidae tuvieron como antecesor común a la familia Aphalaridae.

De acuerdo a la clasificación realizada por Burckhardt & Ouvrard (2012) se consideraron las seis familias propuestas por White & Hodkinson (1985) y agregaron las familias Liviidae y Psyllidae, por lo que la clasificación quedó constituida por ocho familias: Aphalaridae, Carsidaridae, Calophyidae, Homotomidae, Liviidae, Phacopteronidae, Psyllidae y Triozidae. Las familias Aphalaridae, Liviidae y Psyllidae se redefinieron. La clasificación siguió en revisión debido a que se propusieron 42 nuevas combinaciones de especies que son sinonimias y aun había géneros y subfamilias no definidas con exactitud.

Actualmente, la superfamilia Psylloidea comprende ~3500 especies descritas a nivel mundial agrupadas en las familias Aphalaridae, Calophyidae, Carsidaridae, Homotomidae, Liadopsyllidae†, Liviidae, Malmopsyllidae†, Neopsylloididae†, Phacopteronidae, Psyllidae y Triozidae (Ouvrard, 2013). Los psylloideos del mesozoico se asignaron a las tres familias de las cuales están extintas (Bekker-Migdisova, 1985)

La familia Liviidae, donde se incluye ahora a *D. citri*, agrupa a dos subfamilias (Euphyllurinae y Liviinae), con 29 géneros, 317 especies y dos subespecies distribuidas en 344 hospederos; once especies de esta familia tienen como hospederos a miembros de Rutaceae. En México se reportan nueve especies de los géneros *Caradocia*, *Diaphorina*, *Diclidophlebia*, *Katacephala*, *Livia*, *Neophyllura* y *Psyllopsis* (Ouvrard, 2013).

El género *Diaphorina* comprende un total de 67 especies descritas (Ouvrard, 2013), y tiene una preferencia ecológica por climas secos y generalmente se asocian a plantas dicotiledóneas incluidas en 18 familias. *D. amoena* Capener, *D. auberti* Hollis, *D. murrayi* Kandasamy, *D. punctulata* Pettey, *D. zebrana* Capener, *D. communis* Mathur y *D. citri* Kuwayama tienen como hospedante principal a miembros de la familia Rutaceae (Hollis, 1987).

Diversos autores señalan a *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) y *Trioza erytrae* Del Guercio (Hemiptera: Triozidae) como vectores primarios de la bacteria (*Candidatus* Liberibacter var. asiaticus, africanus y americanus) agentes causales del Huanglongbing (HLB) (Garnier & Bové, 2000; Halbert & Manjunath, 2004). Sin embargo, recientemente en otros países señalan también a *Cacopsylla citrisuga* Yang & Li (Hemiptera: Psyllidae) en *Citrus limon* L. (Cen *et al.*, 2012) y *D. communis* en árboles de mandarina (*C. reticulata* Blanco) y hojas de curry (*Bergera koenigii* L.) como vectores potenciales del HLB (Donovan *et al.*, 2011).

1.2 Clasificación taxonómica de *Diaphorina citri*

Phyllum: Arthropoda

Clase: Insecta

Orden: Hemiptera
Suborden: Sternorrhyncha
Superfamilia: Psylloidea
Familia: Liviidae
Subfamilia: Euphyllurinae
Tribu: Diaphorinini
Género: *Diaphorina*
Especie: *Diaphorina citri*
Sinonimia: *Euphalerus citri*

La posición taxonómica de género *Diaphorina* es confusa. Hollis (1985) sugiere que el género proviene de un grupo relativamente antiguo con una distribución Gondwana. Las especies del grupo son difíciles de reconocer debido a que la coloración, morfología y genitalia del macho son relativamente homogéneas, en consecuencia las especies se definen por la forma de los conos genales, forma y coloración de las alas anteriores, así como el arreglo de las espínulas sobre las mismas y la forma de la terminalia de la hembra (Burckhardt, 1984; Hollis, 1987).

Mathur (1975) describió y registró a las especies orientales y posteriormente Burckhardt (1984) redefinió al género y describió la especie paleártica occidental. Boselli (1960) examinó los estadíos ninfales de *Diaphorina* y sugirió la existencia de una relación estrecha con algunos géneros de la familia Aphalaridae. Con base en los caracteres de las ninfas, White (1980) citado por Burchardt (1984) reubicó a la subfamilia Diaphorininae, antes Psyllidae, dentro de la familia Aphalaridae.

Recientemente, Burckhardt & Ouvrard, (2012) proponen una nueva clasificación para la superfamilia Psylloidea, donde el género *Diaphorina* se reclasifica dentro de la familia Liviidae y subfamilia Euphyllurinae. Sin embargo, esta nueva clasificación no se ha incluido en los artículos publicados recientemente.

1.2.1 Características distintivas del género *Diaphorina*

La identificación del género *Diaphorina* propuesta por Burckhardt (1994) es la siguiente: antenas mucho más cortas que el ancho de la cabeza, alas anteriores más amplias en el ápice con un patrón oscuro y puntos bien definidos, edeago con tres segmentos, metabasitarso con dos espinas (raramente una), metatibia con una corona incompleta de espuelas apicales espaciadas de manera uniforme.

No obstante, existen seis especies de *Diaphorina* que morfológicamente son similares a *D. citri*, ellas son: *D. amonea*, *D. auberti*, *D. communis*, *D. murrayi*, *D. punctulata* y *D. zebrana* (Halbert & Manjunath, 2004).

Las especies *D. amoena* y *D. auberti* pueden separarse de *D. citri* por el patrón alar. Las alas anteriores de *D. communis* presentan tonalidades oscuras que cubren casi la totalidad de su superficie, lo que hace que se diferencie fácilmente de *D. citri*. *D. murrayi* está estrechamente relacionada con *D. citri*, según la descripción original de la especie realizada en la India, pero puede diferenciarse de esta última en el patrón alar además de que ésta tiene como único hospedante a *Murraya exotica* L. *D. punctulata* también es similar a *D. citri* ya que ambas especies presentan una banda oscura que flanquea el borde de las alas, y un área clara al centro con manchas irregulares; sin embargo, la banda en *D. punctulata* es continua, mientras que en *D. citri* se corta cerca del apice de la vena Rs (sectora del radio). Además, en *D. punctulata* el ala tiene forma angular y el proceso genal es más amplio y ahusado que en *D. citri*. *D. zebrana*, posee alas alargadas por lo que puede diferenciarse fácilmente del resto de las especies (Halbert & Manjunath, 2004).

1.3 Distribución de *Diaphorina citri*

El psílido asiático de los cítricos *D. citri*, fue descrito por primera vez en Taiwán por Kuwayama en 1908 (Halbert & Manjunath, 2004). De acuerdo con Mead (1977) es originario del lejano oriente y Hollis (1987) menciona que es autóctona del subcontinente indio. El psílido se registró

por primera vez como plaga importante de los cítricos en la India por Husain & Nath (1927) que, al dar a conocer el daño que causó fueron los primeros en describir a lo que ahora se conoce como Huanglongbing. De acuerdo con Hoffmann (1936) el primer registro de *D. citri* en China fue en 1934.

El PAC actualmente está establecido en Sur y Centro América (Cermeli *et al.*, 2000; Halbert & Núñez, 2004, Villalobos *et al.*, 2004), Florida (EUA) (Halbert & Manjunath, 2004, Halbert & Núñez 2004) y México (Thomas 2002, López Arroyo *et al.* 2005 y SENASICA 2012). Este insecto fue detectado en las áreas citrícolas de Florida en 1998 y en Río Grande Valley, Texas en 2001 (Halbert & Manjunath, 2004; Halbert & Núñez, 2004).

En México se descubrió en los cítricos de Campeche en 2002 (Thomas, 2008; López-Arroyo *et al.*, 2005). En 2003, *D. citri* fue reportada en los estados de Nuevo León y Tamaulipas (López-Arroyo *et al.*, 2004, 2005; Ruiz *et al.*, 2004, 2006); mientras que en 2004 se registró en los estados de Colima, Querétaro, San Luis Potosí, Tabasco y Yucatán (López-Arroyo *et al.*, 2005). Para 2008 se reportó en el estado de Baja California y con esto terminó por invadir todas las entidades productoras de cítricos del país (SENASICA, 2012).

Actualmente, se considera un insecto plaga con categoría cuarentenaria y está ampliamente establecido en las zonas citrícolas del mundo (EPPO, 2005) y al igual que el HLB su presencia está determinada por las condiciones ambientales, disponibilidad de cítricos y hospederos susceptibles (López-Arroyo *et al.*, 2008; SENASICA, 2012). En México, desde el 2009, se tiene registro del patógeno en 12 de los 23 estados productores de cítricos del país, aunque con una distribución limitada en cada estado (SENASICA, 2012).

1.4. Descripción y Biología de *Diaphorina citri*

D. citri como todos los hemípteros tiene metamorfosis incompleta, por lo que su ciclo biológico comprende una etapa de huevo, cinco estadios ninfales y el adulto.

La hembra oviposita en los brotes, hojas jóvenes y en las axilas de las mismas (Huang *et al.*, 1999). Éstos tienen forma oval alargada, con el ápice ahusado y miden en promedio 0.3 mm de longitud y 0.14 mm de ancho (Chavan & Summanwar, 1993; Tsai *et al.*, 2000; Fernández & Miranda, 2005a).

El número máximo de huevos por hembra varía de 630 a 1900 dependiendo de las condiciones ambientales y la planta hospedante (Huang, 1990; Chavan & Summanwar, 1993; Liu & Tsai, 2000). Los huevos recién depositados son de color amarillo mate, después adquieren una coloración amarillo naranja y requieren de 2-4 días para completar su maduración.

Cuando termina el desarrollo del huevo, se rompe por la parte apical, por donde emerge una ninfa que se mueve por un tiempo corto para seleccionar un punto de alimentación. Después de que la ninfa comienza a alimentarse, pasa por otras cuatro etapas o instares ninfales de desarrollo, en cada caso, de mayor tamaño, hasta transformarse en adulto. Las ninfas son aplanadas dorsoventralmente, de color naranja-amarillento, sin manchas abdominales, con esbozos alares abultados, un par de ojos rojos compuestos y antenas de color negro (Fonseca *et al.*, 2007).

El primer ínstar mide 0.30 mm de longitud y 0.17 mm de ancho con el cuerpo de color rosa claro y un par de ojos compuestos rojos; el segundo ínstar mide 0.45 mm de largo y 0.25 de ancho con esbozos alares visibles en el dorso del tórax; el tercer ínstar tiene una medida de 0.74 mm de longitud y 0.43 de ancho con los rudimentos alares desarrollados y los segmentos antenales visibles; el cuarto mide 1.01 mm de longitud y 0.70 mm de ancho, los esbozos alares son de mayor tamaño; el último ínstar mide 1.60 mm de longitud y 1.02 de ancho (Tsai & Liu, 2000). Sobre *M. paniculata* Nava *et al.* (2007) anotan que los cinco instares ninfales midieron 0.12 ± 0.006 ; 0.18 ± 0.002 ; 0.35 ± 0.03 ; 0.44 ± 0.01 y 0.57 ± 0.04 mm, del I al V, respectivamente, mientras que Fonseca *et al.* (2007) reportan longitudes de 0.35; 0.44; 0.76; 1.05 y 1.66 mm para los cinco instares.

El adulto recién emergido presenta el cuerpo de color blanquecino, pero a medida que madura, éste se torna de color marrón moteado, y se recubre de polvo ceroso (Fonseca *et al.*, 2007). Las

hembras son más grandes que los machos (Hall, 2008; Étienne *et al.*, 2001; Fernández & Miranda, 2005b). La hembra adulta mide 3.1 mm, mientras que el macho 2.5 mm. Las antenas son gruesas y presentan una seta larga y gruesa en el extremo distal. Ventralmente se distingue el aparato bucal caracterizado por tener un estilete largo succionador de savia y se destaca la abertura anal de gran tamaño y en forma de media luna.

El patrón de las alas anteriores consiste de un grupo de manchas marrones confluentes a lo largo de la vena R y a lo largo del borde externo, y éstas dos áreas se separan por un espacio en blanco en la región subapical de la vena Rs (Burckhardt, 2007). Las alas posteriores son membranosas y transparentes (Fernández & Miranda, 2005a), delgadas y frágiles con venación simple (Ouvrard *et al.*, 2010).

Es frecuente encontrar en *D. citri* variaciones en tamaño y color (Wenninger *et al.*, 2009), atribuidas, además de la planta hospedante, a factores abióticos como la temperatura, humedad y precipitación (Bomfim *et al.*, 2011), fotoperíodo y sequía, entre otros (Hodkinson, 2009). En *D. citri* se han encontrado por lo menos tres variantes en el color abdominal: gris-marrón, azul-verdoso y naranja-amarillento, relacionados con la tasa reproductiva y la atracción de hembras hacia los machos. El color gris-marrón deriva de una alta población en un mismo hospedante, y los individuos presentan menor masa corporal y menor producción de huevos, lo que significa que pueden estar más propensos a los cambios ambientales, así como al ataque de enemigos naturales.

El color azul-verdoso se relaciona con mayor presencia de carotenoides o clorofila en la hemolinfa (Weisgraber, *et al.*, 1971; Barbier, 1981; Jenquins *et al.*, 1999; Wenninger *et al.*, 2009) lo que a su vez está relacionado con una mayor producción de feromona sexual, mientras que el color naranja-amarillento se ha relacionado con una madurez sexual y reproductiva. Wenninger *et al.* (2009) anotan que las hembras de color azul-verdoso son más atractivas a los machos, en comparación con las hembras de coloración marrón. En este sentido, la variación en color se ha descrito en numerosas especies de Sternorrhyncha, y en psílidos se asocia a formas estacionales,

durante el invierno son más oscuros debido a la función de termorregulación (Wenninger & Hall, 2008).

Generalmente los adultos están aptos para iniciar el cortejo a las pocas horas después de la emergencia. Pueden vivir varios meses, copulan varias veces y las hembras son más longevas que los machos (Mead, 1977). El ciclo de vida de huevo a adulto puede completarse en dos o tres semanas en climas tropicales, pero puede requerir hasta de dos meses en climas fríos (Hodkinson, 2009).

1.5. Plantas hospedantes

Los datos existentes en el Museo Nacional de Historia Británico, indican que el hospedante original de *D. citri* probablemente fue una especie de *Murraya*, pero esta plaga se desarrolló rápida y exitosamente en cítricos (Hollis, 1987). Sin embargo, el tipo de hospedante causa diferentes efectos sobre el psílido, aumentando o disminuyendo las poblaciones (Tsagkarakis & Rogers, 2008) y en pocos el desarrollo es exitoso (Baloch & Ghaffar, 1984).

La reproducción del insecto está determinada por la atracción inicial del hospedante, de su capacidad de ovipositar y de sobrevivir hasta la emergencia del adulto (Hodkinson, 2009). En este sentido, existen factores que influyen en la preferencia del hospedante tales como la fenología, la cantidad de cera en la superficie de las hojas, la dureza física del brote, el color de la hoja, la presencia de productos químicos como el cariofileno y bajas concentraciones de repelentes como los compuestos fenólicos o glucosinolatos (Moran & Brown, 1973) por lo que el éxito en el desarrollo del psílido varía en función de la susceptibilidad del hospedante (Center *et al.*, 2007).

D. citri ha ampliado su rango de hospedantes a través de todo un proceso evolutivo, en dicho proceso se involucra a la temperatura y la precipitación que varían en respuesta a la latitud del lugar, altitud y a la continentalidad. Los compuestos químicos del hospedante han evolucionado

por lo que debe adaptarse a los nuevos compuestos, esta coevolución es muy importante para la selección del hospedante (Hodkinson, 2009).

En la actualidad se sabe que el rango de hospedantes de *D. citri* incluye principalmente a miembros de *Citrus* y *Murraya*. Estos dos géneros son idóneos para su desarrollo durante todo el año y su ciclo de vida por lo general no se interrumpe (Bigornia & Obana, 1974).

En Asia, *M. paniculata* (L.) Jack. es el hospedante preferido; *C. aurantifolia* (Christm.) Swingle y *B. koenigii* son buenos hospedantes ya que en ellos el desarrollo del psílido es común; sin embargo, en Filipinas, los adultos de *D. citri* son más atraídos por *Clausena anisumoleons* Merrill que en *M. paniculata* y en Malasia son más atraídos por *B. koenigii*, estas observaciones abren la posibilidad de la existencia de biotipos de *D. citri* (Aubert, 1990).

C. jambhiri Lushington y *C. aurantifolia* se reportan como pobres hospedantes en comparación con la naranja dulce (*C. sinensis* (L.) Osbeck) (Nehru *et al.*, 2004). La oviposición, desarrollo y sobrevivencia de *D. citri* es baja sobre *C. sunki* (Hayata) Tanaka y *C. reshni* Hort. ex Tan. (Tsagkarakis & Rogers, 2010); incluso, el psílido evita colonizar a la naranja trifoliada (*Poncirus trifoliata* L.) y no lo hace en zapote blanco (*Casimiroa edulis* Llave et Lex). Dado que la naranja trifoliada hibridiza fácilmente con especies de *Citrus* se ha propuesto como un candidato prometedor para el mejoramiento y desarrollo de cítricos que expresan resistencia parcial a *D. citri* (Westbrook *et al.*, 2011).

En China, el psílido ocurre en más de 27 especies vegetales, de las cuales siete géneros pertenecen a la familia Rutaceae (*Atalantia*, *Citrus*, *Fortunella*, *Poncirus*, *Murraya*, *Clausena* y *Euodia*) (He, 2000, citado por Yang *et al.*, 2006). Sin embargo, Halbert & Manjunath (2004) citan 25 géneros de la familia Rutaceae, y anotan al zapote blanco *Casimiroa edulis* y al género *Zanthoxylum* spp. L. como aparentes no hospedantes, originarios del hemisferio occidental, lo que sugiere una preferencia de *D. citri* por las Rutáceas en el viejo mundo. *Artocarpus heterophyllus* Lam. y *Ficus carica* L. (Rosales: Moraceae), así como *Pithecellobium lucidum* Benth. (Fabales: Fabaceae) son citados por Thomas & de León (2011) como nuevos hospedantes

del psílido. Por su parte, Ouvrard (2013) presenta una lista parcial donde solamente menciona a los géneros *Citrus*, *Artocarpus*, *Murraya*, *Ficus* y *Phitecellobium* como hospedantes del PAC. En el Cuadro 1.1 se resume la información disponible de los hospedantes de *D. citri* reportados a nivel mundial.

1.6 Dispersión

La dispersión eficaz es un elemento clave en la vida de un psílido, independientemente del hábitat en el que se encuentren. En insectos de vuelo limitado permite que la especie de seguimiento al cambio de la distribución espacial de su hospedero y/o a la disponibilidad temporal de la fuente de alimento y explotar especies de plantas no hospedantes como sitio de hibernación para que pueda escapar de la competencia intraespecífica y de los enemigos naturales (Hodkinson, 2009).

El PAC se dispersa habitualmente a distancias de 25 a 50 m (Gottwald *et al.*, 2007); aunque tiene la capacidad de desplazarse 100 metros en 3 días en plantaciones de cítricos abandonados (Boina *et al.*, 2009). Recientemente Lewis-Rosenblum (2011) mediante la técnica de inmunomarcaje determinó que la distancia de dispersión del psílido fue de 2 km en un período de 12 días. Esta distancia fue similar a la distancia máxima de dispersión (1.5 km) reportada para el psílido africano de los cítricos, *T. erytrae* (van den Berg & Deacon, 1988). Los adultos de *D. citri* tienen un tiempo de vuelo continuo de 50 minutos y tienen la capacidad de desplazarse hasta 1,241 m en ese tiempo (Arakawa & Miyamoto, 2007).

Cuadro 1.1. Plantas hospedantes de *Diaphorina citri*.

Hospedante	Familia	Referencias
<i>Aegle marmelos</i> (L.) Corr.	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004
<i>Aeglopsis chevalieri</i> Swingle	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004
<i>Afraegle gabonensis</i> Engl.	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004
<i>Afraegle paniculata</i> (Schaum.) Engl.	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004
<i>Artocarpus heterophyllus</i> Lamarck	Moraceae	Halbert & Manjunath, 2004; Thomas & de Leon, 2011
<i>Atalantia missionis</i> Oliver	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004
<i>Atalantia monophylla</i> (L.) Corr.	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004
<i>Atalantia</i> sp.	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004
<i>Balsamocitrus dawei</i> Stapf	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004
<i>Citropsis gillettiana</i> Swingle & M. Kellerman	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004
<i>Citropsis schweinfurthii</i> (Engl.) Swingle & Kellerm.	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004
<i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swingle	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004; Nehru <i>et al.</i> , 2004
<i>Citrus aurantium</i> L.	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004
<i>Citrus deliciosa</i> Tenore	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004
<i>Citrus depressa</i> Hayata	Rutaceae	Yasuda <i>et al.</i> , 2005
<i>Citrus grandis</i> (L.) Osbeck	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004
<i>Citrus hystrix</i> DC.	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004
<i>Citrus jambhiri</i> Lushington	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004; Nehru <i>et al.</i> , 2004
<i>Citrus limetta</i> Risso	Rutaceae	Ortega <i>et al.</i> , 2013; OIRSA, 2008
<i>Citrus limon</i> (L.) Burm. f.	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004
<i>Citrus madurensis</i> Loar.	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004
<i>Citrus maxima</i> (Burm.) Merr.	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004
<i>Citrus medica</i> L.	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004
<i>Citrus meyeri</i> Tan	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004
<i>Citrus</i> × <i>nobilis</i> Lour.	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004
<i>Citrus obovoidea</i> Hort. ex Tanaka cv ‘Kinkoji’	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004
<i>Citrus</i> × <i>paradisi</i> Macfad.	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004
<i>Citrus reticulata</i> Blanco	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004
<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004
<i>Citrus</i> spp.	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004
<i>Clausena anisum-olens</i> Merrill	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004; Aubert, 1990
<i>Clausena excavata</i> Burm. f.	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004
<i>Clausena indica</i> Oliver	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004
<i>Clausena lansium</i> (Lour.) Skeels	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004

Continuación del **Cuadro 1.**

<i>Eremocitrus glauca</i> (Lindley) Swingle	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004
<i>Eremocitrus hybrid</i>	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004
<i>Ficus carica</i> L.	Moraceae	Thomas & de Leon, 2011
<i>Fortunella crassifolia</i> Swingle	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004
<i>Fortunella margarita</i> (Lour.) Swingle	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004
<i>Fortunella polyandra</i> (Ridley) Tanaka	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004
<i>Fortunella spp.</i>	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004
<i>Limonia acidissima</i> L.	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004
<i>Merrillia caloxylon</i> (Ridley) Swingle	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004
<i>Microcitrus australasica</i> (F.J. Muell.) Swingle	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004
<i>Microcitrus australis</i> (Planch.) Swingle	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004
<i>Microcitrus papuana</i> H. F. Winters	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004
<i>Microcitrus</i> sp. 'Sidney'	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004
<i>Murraya exotica</i> L.	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004
<i>Murraya koenigii</i> (L.) Sprengel	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004
<i>Murraya paniculata</i> (L.) Jack	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004
<i>Naringi crenulata</i> (Royb.) Nicholson	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004
<i>Pamburus missionis</i> (Wight) Swingle	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004
<i>Pithecellobium lucidum</i> Benth.	Fabaceae	Thomas & de Leon, 2011
<i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf.	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004; Westbrook <i>et al.</i> , 2011
<i>Severinia buxifolia</i> (Poiret) Ten.	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004
<i>Swinglea glutinosa</i> (Blanco) Merr.	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004
<i>Toddalia asiatica</i> (L.) Lam	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004
<i>Triphasia trifolia</i> (Burm. f.) P. Wilson	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004
<i>Vepris lanceolata</i> G. Don	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004
<i>Zanthoxylum fagara</i> (L.) Sarg.	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004
Aparentemente no hospedantes		Halbert & Manjunath, 2004
<i>Casimiroa edulis</i> Llave & Lex.	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004; Westbrook <i>et al.</i> , 2011
<i>Zanthoxylum clava-herculis</i> L.	Rutaceae	Halbert & Manjunath, 2004

1.7 Factores ambientales y biológicos que determinan la abundancia de *D. citri*

Aurambout *et al.* (2009) señalan que existen múltiples factores bióticos y abióticos involucrados en las interacciones que determinan el éxito o fracaso del desarrollo y establecimiento de *D. citri*

en una región. Entre éstos, la temperatura, humedad relativa, precipitación, hospedante (fenotipo, genotipo, fisiología, fotoquímica), enemigos naturales (depredadores, parasitoides, hongos entomopatógenos) y labores agrícolas (poda, fertilización, densidad de plantación) que ejercen influencia directa sobre la densidad poblacional de *D. citri*.

1.7.1 Temperatura

La temperatura ambiente es un factor determinante en la tasa de desarrollo de huevos y ninfas de *D. citri*, ya que regula de manera potencial el número de generaciones al año (Hodkinson, 2009). De acuerdo con Atwal *et al.* (1968) el rango de temperatura favorable para el desarrollo del psílido varía entre 22 y 29°C. Por su parte Liu & Tsai (2000) y Fung & Chen (2006) reportan un rango óptimo de 25-28°C, mientras que temperaturas constantes de 16°C son perjudiciales para los adultos.

Fung & Chen (2006) señalaron que la longevidad del adulto de *D. citri* en *M. paniculata* se redujo de 84 días a 20°C a 36 días a 28°C y Liu & Tsai (2000) reportan que a 15°C el desarrollo de huevo hasta adulto se concreta en 49.3 días, mientras que a 28°C se logró en sólo 14 días. Por el contrario, una alta temperatura puede afectar el tamaño y la fecundidad del psílido, esto puede explicar la presencia de bajas poblaciones con temperaturas extremas (Geiger & Gutiérrez, 2000). Xu (1985) y Xie *et al.* (1988) señalan que las áreas de distribución potencial del psílido se relacionan con los lugares donde la baja temperatura se encuentra dentro de la tolerancia de los adultos invernantes, ya que los sitios que presentan inviernos crudos son perjudiciales para el establecimiento de las poblaciones.

D. citri es un insecto muy persistente, y sobrevive a una amplia gama de temperaturas extremas que van desde los 45°C en climas áridos hasta los -7°C en zonas húmedas subtropicales (Aubert, 1990). En China subtropical el PAC pasa el invierno como imago alargando su desarrollo hasta tres meses y tiene la capacidad de sobrevivir a períodos cortos de frío hasta de -7°C (Xie *et al.*, 1990). Las ninfas se desarrollan bien durante la temporada de frío y en las primaveras húmedas. Por el contrario en las zonas tropicales la sobrevivencia de las ninfas es más baja, las poblaciones de *D. citri* se reducen por el efecto combinado de calor y humedad (Garnier & Bové, 2000).

En un estudio reciente realizado por Ortega-Arenas *et al.* (2013) en la región citrícola de Cazones, Veracruz, reportan que el descenso en la temperatura ocurrido en los meses de diciembre a enero tuvo una repercusión negativa en las poblaciones del psílido asiático de los cítricos. Fung & Chen (2006) señalan que las temperaturas frías suprimen la oviposición y prolongan el desarrollo de los inmaduros de esta misma especie.

1.7.2 Precipitación

La precipitación también tiene repercusión importante en la abundancia poblacional del PAC, ya que justo en los periodos de máxima precipitación, las poblaciones disminuyen. En tal sentido, Sohail *et al.* (2004) determinaron la existencia de correlación negativa entre la abundancia poblacional de *D. citri* y la humedad relativa. Valores de precipitación mensual superior a 150 mm disminuyen drásticamente la densidad de ninfas y huevos, debido a un efecto de volteo por lavado, dado que *D. citri* ovipone en brotes superiores de la planta, quedando las ninfas completamente expuestas al impacto de la lluvia. Yang (1989) anota que las altas temperaturas y elevada humedad relativa tuvieron un impacto negativo sobre las poblaciones de *D. citri*, en contraste con los efectos negativos que las altas temperaturas y baja humedad tuvieron sobre el psílido africano *T. erytreae* en África. Al respecto, Hodkinson (2009) menciona que la combinación de una alta temperatura y una baja humedad aletargan o bloquean el desarrollo del psílido, lo que provoca una reducción en la fecundidad y dispersión y un incremento en la mortalidad. De acuerdo con Fung & Chen (2006) las temperaturas frías suprimen la oviposición y prolongan el desarrollo de los inmaduros.

Aubert (1987) señala que las poblaciones de *D. citri* no toleran la humedad cercana al punto de saturación debido a que esta situación promueve epizootias fungales, a las cuales las ninfas son susceptibles. Sin embargo, la alta humedad registrada en Florida no previno el alto incremento de las poblaciones del psílido durante el verano (Hall *et al.*, 2008). Por su parte, McFarland & Hoy (2001) al comparar la supervivencia de *D. citri* y sus parasitoides *Tamarixia radiata* Waterson y *Diaphorencyrtus aligarhensis* Shafee, Alam y Agarwal desarrollados en diferente humedad relativa, encontraron que la sobrevivencia de ambos mostró una relación positiva conforme se

incrementó la humedad relativa pero disminuyó con el incremento de la temperatura desde 25 a 30°C. No obstante, observaron que en ambas temperaturas y con una humedad relativa del 75 y 97 %, *D. citri* logró sobrevivir más tiempo que las poblaciones de los parasitoides, lo que sugiere que la plaga tiene una velocidad más baja de pérdida de agua neta.

1.7.3 Altitud

Las altas montañas tienen gran influencia en la restricción de la diseminación de las poblaciones del psílido (Yang *et al.*, 2006) ya que actúan como barreras naturales para la migración y establecimiento de las poblaciones (Wang, 2002).

La influencia de la altitud varía en cada región. En China, el psílido generalmente se presenta en altitudes inferiores a los 600 msnm (Xu *et al.*, 1994) y en las regiones subtropicales normalmente ocurre entre los 600 y 1200 msnm (Peng *et al.*, 1996). En México, Hernández-Guerra *et al.* (2012) determinaron la presencia del psílido a diferentes intervalos de altitud en los estados de Veracruz y Puebla. Las mayores infestaciones del psílido estuvieron presentes en los sitios de menor altitud (20 a 150 msnm) asociados a temperaturas media anual de 25.4°C; también anotan que las poblaciones disminuyeron a medida que la altitud aumentó y la temperatura se redujo. No se registró la presencia del psílido en regiones ubicadas a altitudes superiores de 2200 m y con temperaturas promedio menores a 15.2°C.

1.7.4 Período de brotación

El PAC tiene preferencia exclusiva por plantas de la familia Rutaceae y su reproducción es dependiente de la disponibilidad de brotes jóvenes pequeños u hojas tiernas recién expandidas. Los adultos y ninfas deben alimentarse de brotes tiernos para madurar sus huevos y completar su desarrollo (Tsai *et al.*, 2002; Fernández & Miranda, 2005b; Stansly & Qureshi, 2007; Qureshi & Stansly, 2008). La producción de brotes es influenciada por el clima, edad, variedad y fenología de la planta (Tsai & Liu, 2000, Medina *et al.*, 2007) por lo que la presencia de éstos y en consecuencia la dinámica de población del PAC puede variar entre regiones, esto hace necesario

el conocimiento particular de dichas interacciones que den pauta al diseño de estrategias de manejo del PAC y HLB.

En el sur del país el crecimiento vegetativo se produce durante todo el año, mientras que en los estados del norte como Baja California, Nuevo León, Sinaloa, Sonora, y Tamaulipas la producción de brotes es principalmente en otoño y a finales de invierno (Curti-Díaz *et al.*, 1996). Hall *et al.* (2008) mencionan que altas infestaciones de la plaga pueden presentarse siempre y cuando existan las condiciones ambientales favorables y haya disponibilidad de brotes (Tsai & Liu, 2000; Medina *et al.*, 2007). Al respecto, Tsai *et al.* (2002) al estudiar la dinámica poblacional de *D. citri* en plantaciones de *M. paniculata* y toronja (*Citrus paradisi* Macfady) encontraron que la abundancia poblacional fue similar en ambos hospederos y señalan que el crecimiento continuo de los brotes producido por *M. paniculata* juega un papel importante en mantener altas poblaciones de este insecto cuando no hay disponibilidad de brotes en huertos comerciales de cítricos.

En hospederos preferenciales como *C. paradisi* y *C. sinensis* cv ‘Marrs’ ocurren generalmente mayores poblaciones debido a que presentan sincronía con los periodos de brotación y las hojas de estos contienen los nutrimentos esenciales que garantizan su sobrevivencia (Liu & Tsai 2000, Hall *et al.*, 2008, Ortega-Arenas *et al.*, 2013). Un alto índice de oviposición en pomelo resulta de la interacción de factores fisiológicos de la planta o factores físicos como la dureza de la hoja, ya que ésta es más ondulada y pubescente, que el de otras plantas, haciendo a ésta una hospedera más atractiva y adecuada para la oviposición y refugio de los insectos (Moran & Buchan 1975; Tsai & Liu 2000), aunque Wenninger *et al.* (2009) señalan que la calidad de la planta hospedante disminuye a través del tiempo por la alimentación continua de una alta densidad del psílido, inyección de toxinas salivales, presencia de endosimbiontes y/o predisposición genética.

Tsai *et al.* (2002) y Hall (2008) señalan que si se pudieran predecir los periodos de brotación/ floración por región agroecológica y variedad, así como la relación que guardan con factores ambientales, los agricultores podrían restringir las aplicaciones de insecticidas justo

antes del inicio de la brotación para prevenir el crecimiento poblacional del psílido o justificar la aplicación de una medida de control.

Díaz-Zorrilla *et al.* (2011) señalan que las brotaciones son favorecidas por las podas o condición climática y el periodo de brotación dura aproximadamente 85 días, pero son más atractivos a *D. citri* cuando estos comienzan a salir a los 15 a 21 días, los adultos se mueven constantemente y es un momento oportuno para controlar al psílido con algún insecticida.

El período de brotación es estimulado por señales externas e internas como la acumulación de frío de invierno y la dormancia invernal, en esta época las yemas brotan en la primavera sobre todo cuando la disponibilidad de calor y humedad son más altas. Además de la baja temperatura el déficit hídrico o sequía es otro fuerte inductor de la brotación en los cítricos ya que se ha demostrado que aumenta la relación de brotes florales con el número total de flores (Southwick & Davenport, 1986). De acuerdo con White (1969) el estrés hídrico incrementa la movilización de nitrógeno soluble en las hojas lo que es ideal para el desarrollo de las ninfas.

1.7.5 Podas

La poda promueve la brotación, afectando la fenología y abundancia del vector, de tal manera que los árboles jóvenes tienden a brotar continuamente a lo largo de un más amplio rango de temperaturas, por ello el efecto térmico sobre el vector cambia de acuerdo con la edad de la plantación (Hall *et al.*, 2008). La presencia de hojas maduras presentes en una rama inhiben el crecimiento y desarrollo de los brotes por lo que al realizar una defoliación se desinhiben las yemas e inicia la brotación de las mismas.

1.7.6 Fertilización

Las prácticas culturales como la poda, la fertilización y riegos estimulan la emisión de brotes vegetativos por lo que los árboles emitirán follaje nuevo después de la aplicación de algunas de estas prácticas, independientemente de la época del año (Robles-González *et al.*, 2011).

El estado nutricional de la planta está fuertemente asociado con la brotación de los cítricos, ya que un alto contenido de nitrógeno incrementa el número de brotes en los árboles (Iglesias *et al.*, 2007). Por tanto, los insectos chupadores muestran respuesta positiva al nivel de nitrógeno en el hospedante (van Emden, 1996) como la fecundidad, reproducción, desarrollo y supervivencia cuando se mejora el estado nutricional de plantas a través de la fertilización (Wang *et al.*, 2009).

Pfeiffer & Burts (1983) reportan que la densidad de huevos y ninfas del psílido del peral (*Cacopsylla pyricola* Foerster) incrementaron rápidamente y alcanzaron altos niveles en árboles de pera, *Pyrus communis* L. que recibieron aplicaciones constantes de fertilizantes nitrogenados. Según Albrigo (1999) la fertilización, en particular la nitrogenada, mejora el crecimiento de la planta que se manifiesta en mayor producción de brotes susceptibles de ser atacados por el psílido.

CAPÍTULO II

MORFOMETRÍA DE *Diaphorina citri* (HEMIPTERA: LIVIIDAE) DE SEIS RUTÁCEAS EN CAZONES, VERACRUZ, MÉXICO.

2.1 RESUMEN

El objetivo de este estudio fue realizar la caracterización morfométrica de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), así como conocer si el hospedero ejerce alguna influencia importante en la definición de variantes específicas. Los caracteres medidos fueron la longitud del cuerpo, longitud y amplitud de alas anteriores y procesos genales, y longitud de antenas. Los machos y hembras se analizaron de manera independiente. Las medidas obtenidas se sometieron a un análisis de varianza y a un análisis de componentes principales. La mayor variación morfométrica y menor talla se encontró en especímenes machos colectados en hospederos no preferenciales como *Citrus limetta* Risso, *C. sinensis* (L.) ‘Selección 8’ y *C. paradisi* Macfad. cv. ‘Rio Red’; mientras que los más grandes y menos variables en *C. sinensis* (L.) Osbeck cv. ‘Marrs’, *C. sinensis* (L.) cv. ‘Valencia’ y *Murraya paniculata* (L.) Jack. Los caracteres con variación notable fueron la longitud y amplitud de las alas anteriores y de los procesos genales. Se encontró mayor variación morfométrica en machos que en hembras. Los resultados mostraron que *D. citri* es una especie con variantes morfométricas y probablemente el hospedante posee un efecto determinante en la definición de caracteres.

Palabras clave: Psílido asiático de los cítricos, cítricos, anomalías en alas, procesos genales

MORPHOMETRY OF *Diaphorina citri* (HEMIPTERA: LIVIIDAE) ON SIX RUTACEAE FROM CAZONES, VERACRUZ, MEXICO

2.2 ABSTRACT

The objective of this study was to characterize *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) morphometrically, as well to determine whether the host has a relationship to a specific morphometric variation. The traits measured were body length, antenna length, lengths and widths of genal processes, and forewing length and width. Females and males were analyzed separately. The measures obtained were subjected to an analysis of variance and principal components analysis. The greatest morphometrical variation and smallest sizes were found in males collected from non-preferred hosts such as *Citrus limetta* Risso, *C. sinensis* (L.) ‘Selection 8’ and *C. paradisi* Macfad. cv. ‘Rio Red’; while, the least variations and largest sizes were found on *C. sinensis* (L.) Osbeck cv. ‘Marrs’, *C. sinensis* (L.) cv. ‘Valencia’ and *Murraya paniculata* (L.) Jack. The traits with notable variation were lengths and widths of forewings and genal processes. Greater morphometrical variations were found in males than in females. The results indicate that *D. citri* is a species with morphometrical variants and probably the host is a determinant in the definition of characters.

Key words: Asian citrus psyllid, citrus, wing anomalies, genal processes

2.3 INTRODUCCIÓN

Diaphorina citri Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), también conocido como Psílido Asiático de los Cítricos (PAC), es considerada la plaga más importante de los cítricos en el mundo (Halbert & Manjunath, 2004). La alimentación tanto de ninfas como adultos en brotes jóvenes causa la distorsión y alteraciones en el crecimiento de los árboles. En infestaciones severas los psíidos pueden matar los brotes nuevos o causar la abscisión de hojas o brotes terminales (Tsai *et al.*, 2002; Halbert & Manjunath, 2004). Sin embargo, la mayor peligrosidad del PAC se relaciona con su capacidad para transmitir bacterias (*Candidatus Liberibacter* var. *asiaticus* y *americanus*) agentes causales de la enfermedad Huanglongbing (HLB) o enverdecimiento de los cítricos (Garnier & Bové, 2000; Halbert & Manjunath, 2004). El HLB es una de las enfermedades más devastadoras de los cítricos, responsable del declinamiento y muerte de millones de árboles en el mundo (Roistacher, 1996; Halbert & Manjunath, 2004; Bové, 2006). En México, el HLB se detectó en julio de 2009 en huertos comerciales y de traspatio en el estado de Yucatán y de ahí se ha dispersado a otras entidades poniendo en riesgo la citricultura del país (SENASICA, 2012). A diferencia del HLB, la presencia de *D. citri* en cítricos se registró en Campeche desde 2002 (Thomas, 2002; López Arroyo *et al.*, 2005) y ahora se ha establecido e invadido todas las entidades productoras de cítricos (SENASICA, 2012). A razón de lo anterior, se ha intensificado la investigación relativa a biología, ecología y comportamiento del psílido y la enfermedad, a fin de entender y encontrar elementos para mejorar el muestreo y estrategias de manejo de esta plaga.

En general, la mayoría de especies de Psylloidea mantienen una relación estrecha y específica con plantas angiospermas dicotiledóneas (Hodkinson, 1988; Hollis, 2004), pero hay especies, como *D. citri*, que a través del tiempo evolutivo posiblemente han modificado su fisionomía, fisiología y fenología en concordancia con el hospedero y variaciones ambientales (Hollis, 1987; Halbert & Manjunath, 2004; Hodkinson, 2009; Tsagkarakis & Rogers, 2010) para explotar un rango de hospederas que incluyen más de 25 especies de Rutaceae (Sapindales) así como *Artocarpus heterophyllus* Lam., y *Ficus carica* L. (Rosales: Moraceae) y *Pithecellobium lucidum* Benth. (Fabales: Fabaceae) (Halbert & Manjunath, 2004; Thomas & de León, 2011). Aunque el

desarrollo del PAC puede ser exitoso en determinadas hospederas como *Murraya paniculata* (L.) Jack (Sapindales: Rutaceae) (Tsai & Liu, 2000; Tsai *et al.*, 2002, Fernández & Miranda, 2005b), *Citrus sinensis* cv Mars (L.) Osbeck (Sapindales: Rutaceae) (Ortega-Arenas *et al.*, 2013) y *C. paradisi* Macfad (Liu & Tsai, 2000) o adverso en hospedantes como la mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort. ex Tan) (Tsagkarakis & Rogers, 2010).

Se han reportado variaciones en tamaño y color en especies dentro de la Superfamilia Psylloidea, incluyendo *Cacopsylla midoriae* Miyatake (Inoue, 2004); *C. elegans* Inoue (Inoue, 2004); *C. chinensis* Yang & Li (Yang *et al.*, 2004); *Agonoscena pistaciae* Burckhardt & Lauterer (Mehrnejad & Copland, 2005); y *C. pyricola* Forster (Wong & Madsen, 1967; Krysan & Higbee, 1990), así como también en especies en la Familia Aphididae (Araya *et al.*, 1996; Stoetzel & Miller, 2001; Nevo & Coll, 2001; Toros *et al.*, 2003). Esta variación se asocia con diferentes formas estacionales, endosimbiontes (Weisgraber *et al.*, 1971; Jenkins *et al.*, 1999; Svensson & Abbott, 2005), o con formas genéticamente distintas como en los áfidos (Araya *et al.*, 1996, Langley *et al.*, 2006, Caillaud & Losey, 2010). El color del cuerpo en áfidos (Jenkins *et al.*, 1999; Nevo & Coll, 2001; Caillaud & Losey, 2010) y algunos psílicos como *Trioza erythrae* Del Guercio (Moran, 1968) y *D. citri* (Wenninger *et al.*, 2009) se ha relacionado con diferencias en masa corporal, fecundidad y calidad de la planta hospedera. Por ejemplo, Rapisarda (1993) encontró concordancia entre el polimorfismo (mayor tamaño y color) y la diapausa en dos psílicos que se alimentan de especies del género *Acacia*. La significancia biológica de las diferencias morfológicas no ha sido del todo entendida, porque pueden atribuirse además de la planta hospedante a factores abióticos como la temperatura, humedad y precipitación (Bomfim *et al.*, 2011) fotoperíodo y sequía, entre otros (Hodkinson, 2009). El hecho de que los morfos (variantes polimorfas) difieran a veces del tipo ‘normal’ de la población, ocasionó que muchos se describiesen originalmente como especies diferentes (Mayr, 1968).

En México, asociados a cítricos sólo se reporta al PAC como único vector del HLB (SENASICA, 2012); sin embargo, estudios recientes en otros países señalan a *Cacopsylla* (*Psylla*) *citrisuga* Yang & Li en *C. limon* (L.) (Cen *et al.*, 2012) y *D. communis* Mathur en árboles de mandarina (*C. reticulata* Blanco) y hojas de curry (*Bergera koenigii* L.) (Donovan *et al.*, 2011) como vectores

potenciales del HLB, situación que con lleva a realizar estudios detallados de la fauna de psílidos asociados a cítricos. Por tanto, se estableció como objetivo el realizar la morfometría de *D. citri* en seis rutáceas hospedantes en la región de Cazones, Veracruz, México, y explorar si el hospedante tiene alguna repercusión importante en las variaciones morfométricas.

2.4 MATERIALES Y MÉTODO

2.4.1 Ubicación del área de estudio

La investigación se realizó en Cazones, Veracruz en plantaciones de cítricos. El clima en la región es cálido-húmedo (Am) con temperatura promedio de 25°C, con abundantes lluvias en verano, precipitación media anual de 2000 mm y humedad relativa promedio anual de 82%. Se localiza en la zona norte del estado, en las coordenadas 20° 42' N y 97° 18' O, a 10 m de altitud. Limita al norte con Tuxpan, al este con el Golfo de México, al sur con Papantla, al suroeste con Poza Rica de Hidalgo y al oeste con Tihuatlán.

2.4.2 Recolección del material biológico

Los especímenes adultos se recolectaron mensualmente en los siguientes cultivos: 1) lima dulce (*C. limetta* Risso), de 10 años de edad, establecidos en una planicie de 2 ha donde el manejo consistió de deshierbes químicos y aplicaciones de fertilizantes e insecticidas; 2) Naranja Marrs (*C. sinensis* L. cv. 'Marrs'), de 12 años, dispuestas en un lomerío de 1.7 ha, en hileras de 6 × 6 m de distancia, y sometida regularmente a labores de deshierbe, podas de saneamiento y fertilización; 3) Naranja Valencia (*C. sinensis* cv. 'Valencia') de 15 años, plantados en una superficie de 3 ha en hileras de 6 × 6 m de distancia; 4) Naranja 'Selección 8' (*C. sinensis* 'Selección 8'), de siete años, dispuestos a 5 × 6 m de distancia en una planicie de 3 ha, combinados temporalmente con maíz.; 5) Pomelo (*C. paradisi* Macfad cv. 'Rio Red') de nueve años, dispuestos en una planicie de 1 ha en hileras de 5 × 6 m, y sometida regularmente a labores

de deshierbe, podas de saneamiento y fertilización; y 6) *Murraya* (*M. paniculata* (L.) Jack), de seis años, establecidas en huertos familiares y áreas urbanas sin aplicación de plaguicidas.

En cada sitio y fecha se revisaron las hojas y brotes (cuando presentes) de varios árboles o plantas al azar, para recolectar con un aspirador bucal y/o red entomológica a los adultos presentes en un periodo de 30 min de búsqueda. Los especímenes recolectados, por fecha y hospedante, con su respectiva etiqueta, se conservaron en alcohol al 70% para su traslado al laboratorio de Morfología de Insectos del Colegio de Postgraduados para su procesamiento.

2.4.3 Identificación del material biológico

La determinación taxonómica de los ejemplares recolectados se realizó mediante las claves dicotómicas para Psylloidea propuestas por Yang (1984) y Burckhardt (2007). Los ejemplares estudiados se depositaron en la colección de referencia de Insectos Vectores del Colegio de Postgraduados.

2.4.4 Separación de estructuras

Para realizar la caracterización morfométrica de los psílicos cada insecto se disectó bajo un microscopio estereoscópico para separar las alas y antenas, mismas que fueron colocadas individualmente en tubos eppendorf de 0.2 mL que contenían alcohol al 70%. Después se realizaron montajes en portaobjetos, con gel para el cabello y glicerina, para evitar deshidratación, de series representativas de antenas, alas y cuerpo para realizar tomas fotográficas por espécimen de cada estructura (alas y arreglo de espínulas, antenas, conos genales y terminalia). Después de la toma fotográfica, cada estructura fue devuelta al tubo respectivo.

2.4.5 Caracteres morfológicos evaluados

Se seleccionaron un total de seis caracteres morfológicos para determinar la presencia de variación morfométrica entre los adultos (Hollis, 1987). La medición de las estructuras de interés

se realizó con la ayuda del programa Image Tool versión 3 (Wilcox *et al.*, 2002). La longitud del cuerpo (LC) de los machos se midió del ápice del proceso genal hasta la parte terminal de la placa subgenital y el de las hembras del ápice del proceso genal hasta la parte distal del proctígero. La longitud de las alas (LA) se midió desde la parte basal hasta la parte distal del ala y para la amplitud (AA) se consideró la parte más ancha. La longitud de los procesos genales (LPG) se midió de la base al ápice del cono y la amplitud (APG) se midió a la mitad del proceso genal, considerando la parte más ancha. La longitud de las antenas (ANT) se midió desde el escapo hasta la parte distal del flagelo (Fig. 2.1).

2.4.6 Análisis estadístico

Durante todo el año se colectó un total de 4,719 adultos (1,725 machos y 2,994 hembras). Se estandarizó el tamaño de la muestra para el análisis estadístico por lo que se consideraron 88 machos y 124 hembras de cada especie de rutaceae, por tanto, se analizó el 27% de los adultos de la colección total anual del psílido. Las estructuras de machos y hembras se analizaron de manera independiente ya que un análisis preliminar mostró diferencias entre sexos.

Los datos morfométricos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y cuando se presentaron diferencias significativas se realizó una comparación de medias con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Adicionalmente, para definir cuáles de los seis caracteres estudiados aportaban la mayor variabilidad, se realizó un análisis multivariado de componentes principales (ACP) usando la matriz de correlación mediante la asistencia del programa Minitab versión 15 (Minitab Inc., 2007).

2.5 RESULTADOS

De acuerdo a las claves utilizadas, todos los especímenes recolectados en los seis hospedantes de la región de Cazones, Veracruz, correspondieron a *D. citri*, en los que se corroboraron las características distintivas de esta especie como son: procesos genales 1.0 veces más largo que el

vértex a lo largo de la línea media, delgado; patrón de las alas anteriores consistente en un grupo de manchas marrones confluentes a lo largo de la vena R y a lo largo del borde externo, y estas dos áreas bien separados por un espacio en blanco de la región subapical de la Rs, y la membrana blanquecina; el flagelo antenal de color marrón oscuro a negro (Burckhardt, 2007).

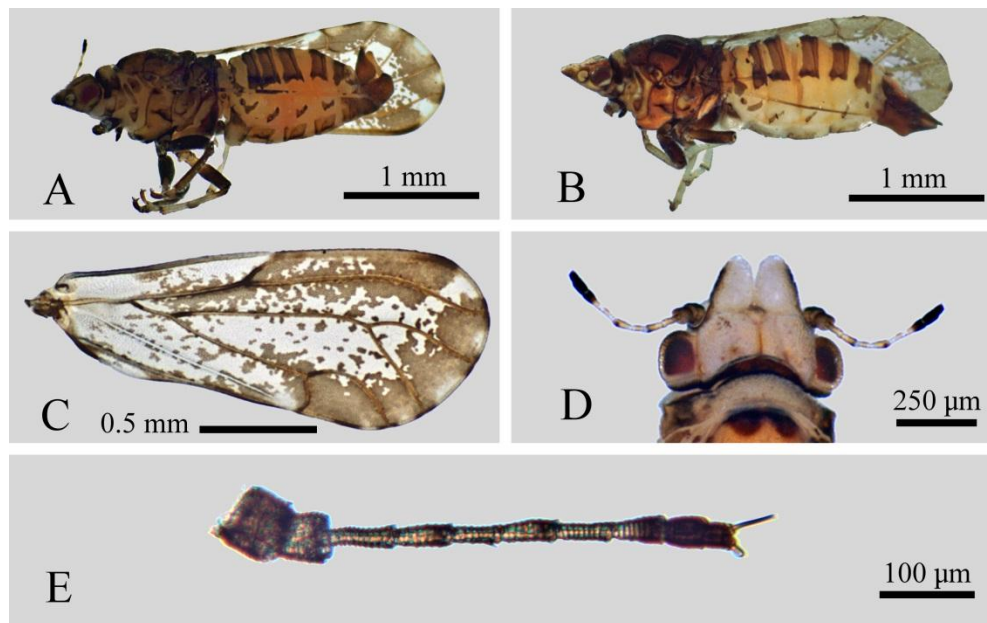


Figura 2.1 Estructuras medidas en ejemplares de *Diaphorina citri* recolectados en Cazones, Veracruz, México. A) Longitud del cuerpo del macho, B) Longitud del cuerpo de la hembra, C) Longitud y amplitud del ala anterior, D) Longitud y amplitud de los procesos genales y E) Longitud de la antena.

El psílido estuvo presente durante todas las recolectas realizadas en los diferentes hospedantes. Las poblaciones más altas del psílido se registraron en *M. paniculata* y *C. sinensis* cv ‘Mars’ mientras que en la lima *C. limetta* y naranja *C. sinensis* cv ‘Selección 8’ la abundancia fue menor ($F=10.07$, $GL=5$ $p \leq 0.01$ para los machos y $F= 3.83$, $GL=5$ $p \leq 0.01$ para las hembras) (Fig. 2.2). La población disminuyó considerablemente en los meses de agosto a diciembre debido a la intensa precipitación que se presentó durante el verano extendiéndose hasta principios de 2011 (SMN, 2012).

Cabe mencionar que las muestras presentaron ejemplares con anomalías. De éstos, 2.65% correspondió a machos y 1.9% a hembras con venación alar que difería a la venación típica de la especie, además de patrones de maculación y forma y tamaño de procesos genales diferentes al referente registrado en la mayoría de los especímenes recolectados (Figs. 2.3 y 2.4). También se observaron diferencias en el color abdominal que variaron en el gris-marrón, azul-verde y naranja-amarillo.

El análisis de los resultados se realizó tomando como referencia a los individuos recolectados en *M. paniculata* por ser el hospedante original y preferencial del PAC y de esa forma observar si existen variantes morfológicas en los demás hospedantes.

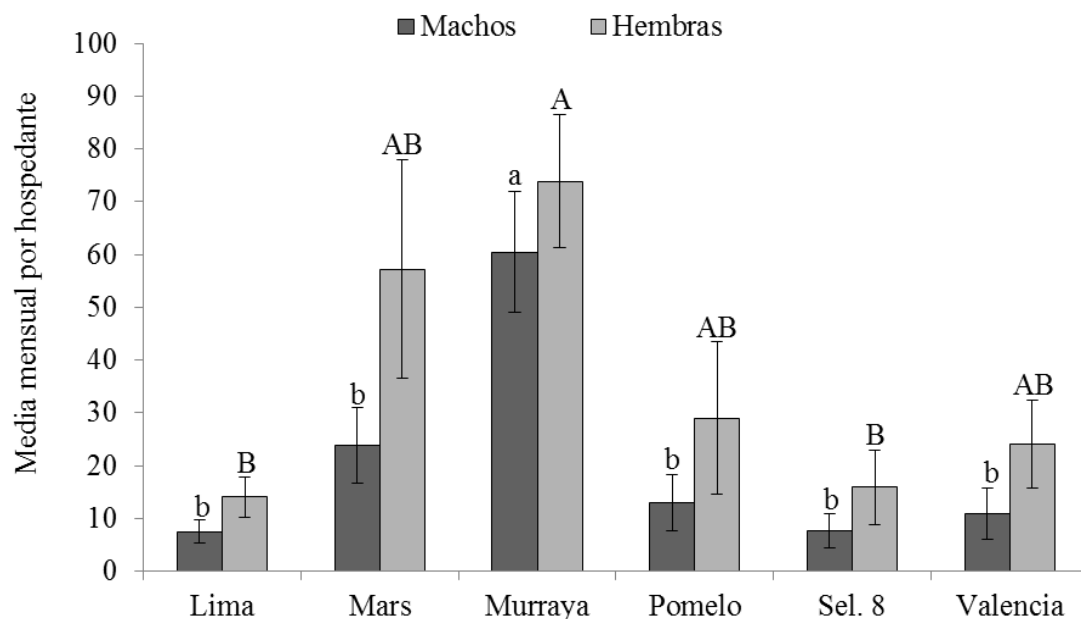


Figura 2.2 Media mensual de adultos de *Diaphorina citri* recolectados por hospedante en Cazones, Veracruz, México. Las barras representan al error estándar de la media. Las literales en minúscula representan a la comparación de medias entre los machos y las literales en mayúscula a la comparación de medias de las hembras.

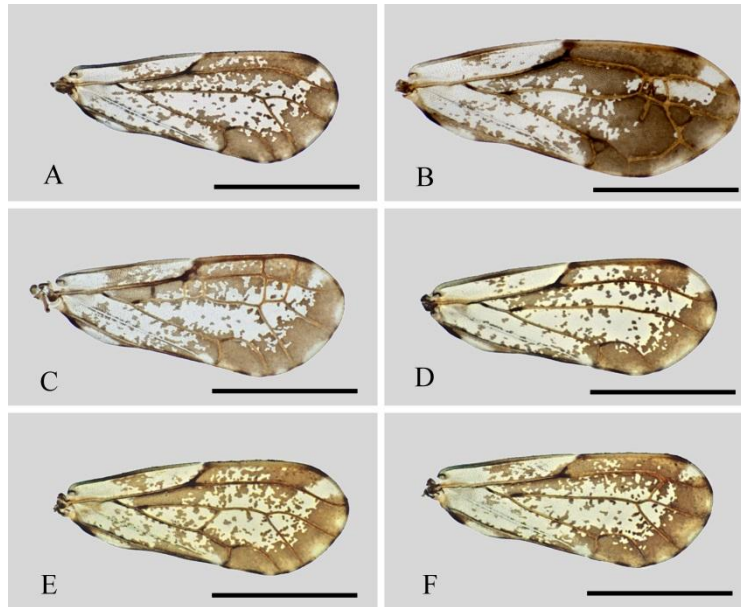


Figura 2.3 Variantes morfométricas de las alas anteriores encontradas en *Diaphorina citri*. A) Venación típica del ala anterior. B) Macho recolectado en lima, venas Rs y M interrumpidas por venas transversales. C) Hembra recolectada en lima, venas transversales adicionales. D) Macho recolectado en naranja cv ‘Valencia’, vena M_{3+4} ausente. E y F) Machos recolectados en murraya, venas transversales adicionales. Escala: 1 mm.

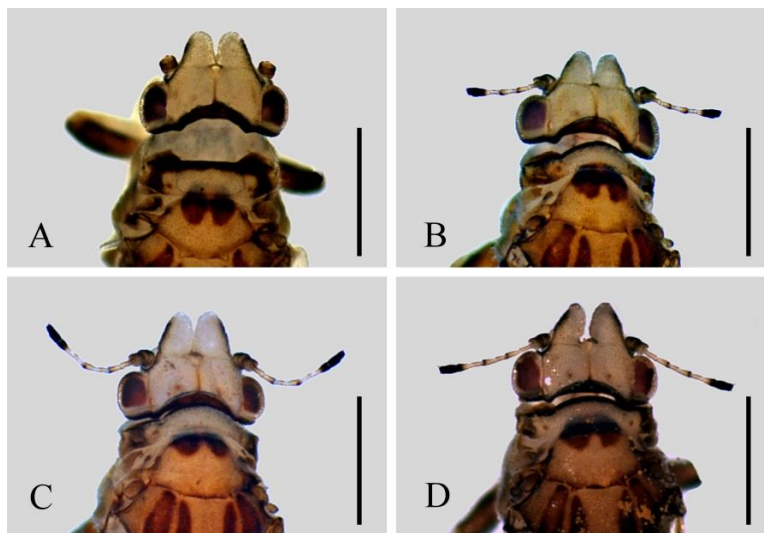


Figura 2.4 Variantes morfométricas de los procesos genales encontrados en *Diaphorina citri*. A) Macho recolectado en naranja cv. ‘Valencia’, procesos genales cónicos con ápices redondeados. B) Macho recolectado en naranja ‘Selección 8’, procesos genales cónicos. C) Macho recolectado en naranja ‘Selección 8’, procesos genales parcialmente separados. D) Macho recolectado en lima, procesos genales fuertemente separados. Escala: 500 µm.

El análisis de varianza indicó diferencias significativas respecto a las variables observadas ($F=16.99$ $GL= 5$ $p \leq 0.0001$). En general, las hembras fueron más grandes que los machos en todos los caracteres medidos (Cuadro 2.1). En los machos, se observaron diferencias estadísticas significativas en cada una de las variables observadas con respecto al hospedante ($p<0.05$). La longitud del cuerpo de los machos (LC) tuvo valores similares en los diferentes hospedantes (Tukey $p < 0.05$). En promedio, la LC de los machos fue ($\bar{x} = 2.46$, $SE=0.020$). Pomelo fue el hospedante con las medidas más pequeñas ($\bar{x} = 2.34 \pm 0.018$ EE), pero estos no fueron significativamente inferiores con los de lima. Los machos con la LC más grande lo presentaron los especímenes de naranja 'Mars' y naranja 'Valencia', pero no fueron significativamente más grandes que los de murraya y naranja 'Selección 8' (Tukey $p< 0.05$).

La amplitud de alas (AA) fue similar en los machos colectados en lima, naranja cv 'Mars', y pomelo. La AA más angosta se encontraron en murraya y estos fueron estadísticamente diferentes de los machos de naranja 'Selección 8' y naranja 'Valencia'. La longitud del ala (LA) fue diferente en cada hospedante, de manera similar con la AA; la diferencia principal fue que la LA de murraya y naranja cv. 'Marss' fueron los más pequeños. Las alas más grandes lo presentaron los colectados en lima y naranja 'Valencia', pero no fueron estadísticamente más grandes que los de naranja 'Selección 8' (Cuadro 2.1).

En pomelo se registraron los individuos con la mayor longitud y amplitud de los procesos genales, y estos difirieron estadísticamente con los de lima, que fueron los más pequeños. Las antenas de los machos fueron más grandes en naranja cv. 'Valencia', no fueron estadísticamente más grandes que los de naranja 'Selección 8' pero si fueron significativamente más pequeños que los de murraya (Cuadro 2.1).

En la comparación de medias de hembras, también se observaron diferencias estadísticas significativas por hospedante en relación a todas las variables consideradas en este estudio ($p < 0.05$). En el tamaño de la longitud de cuerpo (LC) de las hembras de lima, pomelo y naranja cv 'Valencia' se observan diferencias estadísticas significativas con respecto a la LC más grande que

se encontró en naranja cv. ‘Valencia’ y con pomelo que presentó la LC menor. Sin embargo, la LC de naranja cv. ‘Valencia’ no fue estadísticamente mayor que naranja cv. ‘Marrs’ (Cuadro 2.1).

La amplitud de alas (AA) de las hembras de murraya y pomelo fueron significativamente las más angostas. La AA más grande se presentó en las hembras de naranja ‘Selección 8’, pero éstas no fueron significativamente más amplias que las de lima. La longitud de alas (LA) mayor lo presentaron las de lima, aunque no fueron estadísticamente más grandes que las de naranja ‘Selección 8’ o naranja ‘Valencia’. Las alas más pequeñas fueron para las hembras de murraya, pero no fueron estadísticamente más cortas que las de pomelo o naranja ‘Marrs’ (Cuadro 2.1).

La longitud de los procesos genales más grandes lo presentaron las hembras de lima y naranja ‘Selección 8’, pero no fueron estadísticamente más grandes que las de pomelo, naranja ‘Marrs’ y naranja ‘Valencia’. La amplitud de los procesos genales fue mayor en las hembras de naranja ‘Marrs’, pero no fueron estadísticamente más amplios que los de lima, pomelo y naranja ‘Selección 8’. Los procesos genales de las hembras más angostos fueron las de murraya, pero no fueron significativamente más estrechos que los de lima, pomelo y naranja ‘Selección 8’. La longitud de las antenas de mayor tamaño fue para las hembras de naranja ‘Valencia’ y naranja ‘Selección 8’, pero éstas no fueron significativamente más grandes que las de lima o pomelo. Las antenas más cortas se encontraron en las hembras de murraya, sin ser estadísticamente más pequeñas que las lima y naranja ‘Marrs’ (Cuadro 2.1).

Para conocer el grado de asociación entre las seis variables evaluadas, fue necesario realizar la matriz de correlación de Pearson. El resultado indicó que en ambos sexos existe una alta correlación positiva entre las variables longitud de ala (LA) y amplitud de ala (AA), lo que indica que a mayor longitud de ala, mayor amplitud de la misma o viceversa. Así mismo, se observó correlación positiva entre la amplitud y longitud de los conos genales (Cuadro 2.2).

Cuadro 2.1. Medidas promedio de seis caracteres morfológicos (mm) (media $\pm$ error estándar) en machos y hembras de *Diaphorina citri* recolectados en diferentes hospedantes rutáceas en Cazones, Veracruz, México.

Variable Hospedante	Machos					
	LC ^a	AA	LA	LPG	APG	ANT
Lima	2.425 $\pm$ 0.01 bc ^b	0.907 $\pm$ 0.004 ab	2.157 $\pm$ 0.009 a	0.135 $\pm$ 0.002 b	0.103 $\pm$ 0.001 c	0.504 $\pm$ 0.002 bc
Mars	2.509 $\pm$ 0.01 a	0.900 $\pm$ 0.004 ab	2.105 $\pm$ 0.008 c	0.142 $\pm$ 0.001 ab	0.110 $\pm$ 0.001 ab	0.499 $\pm$ 0.002 c
Murraya	2.453 $\pm$ 0.01 ab	0.890 $\pm$ 0.004 b	2.091 $\pm$ 0.007 c	0.137 $\pm$ 0.001 ab	0.107 $\pm$ 0.008 abc	0.489 $\pm$ 0.002 d
Pomelo	2.342 $\pm$ 0.01 c	0.896 $\pm$ 0.004 ab	2.108 $\pm$ 0.008 bc	0.143 $\pm$ 0.001 a	0.112 $\pm$ 0.001 a	0.506 $\pm$ 0.002 bc
Sel. 8	2.451 $\pm$ 0.02 ab	0.911 $\pm$ 0.003 a	2.141 $\pm$ 0.006 ab	0.137 $\pm$ 0.002 ab	0.106 $\pm$ 0.001 bc	0.510 $\pm$ 0.002 ab
Valencia	2.493 $\pm$ 0.02 ab	0.908 $\pm$ 0.004 a	2.148 $\pm$ 0.008 a	0.142 $\pm$ 0.001 ab	0.110 $\pm$ 0.001 ab	0.517 $\pm$ 0.002 a
	Hembras					
	LC ^a	AA	LA	LPG	APG	ANT
Lima	2.795 $\pm$ 0.01 c	0.971 $\pm$ 0.003 ab	2.272 $\pm$ 0.006 a	0.153 $\pm$ 0.001 a	0.116 $\pm$ 0.001 ab	0.506 $\pm$ 0.002 abc
Mars	2.886 $\pm$ 0.01 ab	0.957 $\pm$ 0.004 bc	2.232 $\pm$ 0.008 bcd	0.149 $\pm$ 0.001 ab	0.117 $\pm$ 0.009 a	0.500 $\pm$ 0.004 bc
Murraya	2.766 $\pm$ 0.01 c	0.955 $\pm$ 0.003 c	2.223 $\pm$ 0.007 d	0.145 $\pm$ 0.001 b	0.113 $\pm$ 0.001 b	0.496 $\pm$ 0.002 c
Pomelo	2.674 $\pm$ 0.01 d	0.953 $\pm$ 0.004 c	2.225 $\pm$ 0.008 cd	0.150 $\pm$ 0.001 ab	0.116 $\pm$ 0.001 ab	0.509 $\pm$ 0.002 ab
Sel. 8	2.823 $\pm$ 0.02 bc	0.972 $\pm$ 0.003 a	2.261 $\pm$ 0.006 ab	0.150 $\pm$ 0.001 a	0.113 $\pm$ 0.001 ab	0.515 $\pm$ 0.001 a
Valencia	2.953 $\pm$ 0.02 a	0.967 $\pm$ 0.003 bc	2.252 $\pm$ 0.005 abc	0.148 $\pm$ 0.001 ab	0.117 $\pm$ 0.008 a	0.517 $\pm$ 0.002 a

^aCaracteres morfológicos: LC= Longitud de cuerpo, AA= Ancho de alas, LA= Longitud de alas, LPG= Longitud de los procesos genales, APG= Ancho de procesos genales, ANT= Longitud de antenas.

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

Cuadro 2.2 Matriz de correlación de Pearson de seis caracteres morfológicos de machos y hembras de *Diaphorina citri* recolectados en diferentes hospedantes rutáceas en Cazones, Veracruz, México.

Machos						
Variables	LC	AA	LA	LPG	APG	ANT
LC ^a	1	0.082	-0.010	0.175	0.172	-0.093
AA	0.082	1	0.678	0.107	0.046	0.158
LA	-0.010	0.678	1	0.062	-0.025	0.258
LPG	0.175	0.107	0.062	1	0.592	0.006
APG	0.172	0.046	-0.025	0.592	1	-0.046
ANT	-0.093	0.158	0.258	0.006	-0.046	1
Hembras						
Variables	LC	AA	LA	LPG	APG	ANT
LC	1	0.061	0.078	0.071	0.101	0.131
AA	0.061	1	0.505	0.052	-0.038	0.203
LA	0.078	0.505	1	0.055	-0.035	0.099
LPG	0.071	0.052	0.055	1	0.417	-0.02
APG	0.101	-0.038	-0.035	0.417	1	0.005
ANT	0.131	0.203	0.099	-0.02	0.005	1

^aCaracteres morfológicos: LC= Longitud de cuerpo, AA= Ancho de alas, LA= Longitud de alas, LPG= Longitud de procesos genales, APG= Ancho de procesos genales, ANT= Longitud de antenas.

El análisis de componentes principales (ACP) indicó que la longitud de cuerpo, longitud y amplitud de alas y la longitud y amplitud de los procesos genales aportaron mayor variabilidad, excepto la longitud de las antenas (Cuadro 2.3). En el primer componente (CP1) las variables determinantes fueron la amplitud y longitud de alas para ambos sexos, lo cual puede interpretarse como un índice de alas; para el componente dos (CP2) fueron la amplitud de los procesos genales y la longitud de los mismos para ambos sexos, por lo que puede interpretarse como un índice de tamaño de los procesos genales; finalmente el tercer componente principal, muestra un indicador de la longitud del cuerpo. Conjuntamente los componentes explican el 74.5% del total de la variabilidad en los machos y 68.3% en las hembras, resultado que indica que los machos presentan mayor variabilidad que las hembras. El análisis de las variables morfométricas en machos, mostró valores atípicos en los parámetros evaluados en los individuos, estas diferencias

ocurrieron principalmente en lima y naranja ‘Selección 8’ (Fig. 2.5). El análisis de las variables morfométricas en hembras, mostró valores atípicos en los parámetros evaluados, solo que a diferencia de los machos los individuos distintos fue menor, estas diferencias se presentaron en hembras colectadas en naranja cv ‘Mars’, pomelo y murraya (Fig. 2.6).

Cuadro 2.3. Variabilidad estadística por carácter morfológico de machos y hembras de *Diaphorina citri* recolectados en diferentes hospedantes rutáceas en Cazones, Veracruz, México.

Machos						
Variable	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6
LC ^a	0.156	0.316	0.685	0.634	0.000	-0.069
AA	0.599	-0.244	0.243	-0.214	-0.108	0.682
LA	0.583	-0.336	0.102	-0.163	0.044	-0.713
LPG	0.357	0.547	-0.253	-0.081	0.707	0.059
APG	0.286	0.594	-0.243	-0.114	-0.696	-0.098
ANT	0.262	-0.275	-0.582	0.711	-0.053	0.094
Valor propio	1.8362	1.6545	0.9813	0.8171	0.4037	0.3073
Proporción	0.306	0.276	0.164	0.136	0.067	0.051
Acumulada	0.306	0.582	0.745	0.882	0.949	1.000
Hembras						
Variable	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6
LC	0.247	-0.190	0.676	0.662	0.057	0.061
AA	0.636	0.173	-0.217	-0.027	-0.044	0.718
LA	0.608	0.157	-0.312	0.209	-0.122	-0.67
LPG	0.187	-0.652	-0.22	-0.089	0.695	-0.035
APG	0.094	-0.691	-0.035	-0.139	-0.702	0.025
ANT	0.348	0.081	0.59	-0.7	0.071	-0.171
Valor propio	1.6272	1.4383	1.0301	0.8529	0.5697	0.481
Proporción	0.271	0.24	0.172	0.142	0.095	0.080
Acumulada	0.271	0.511	0.683	0.825	0.92	1.000

^aCaracteres morfológicos: LC= Longitud de cuerpo, AA= Ancho de alas, LA= Longitud de alas, LPG= Longitud de procesos genales, APG= Ancho de procesos genales, ANT= Longitud de antenas.

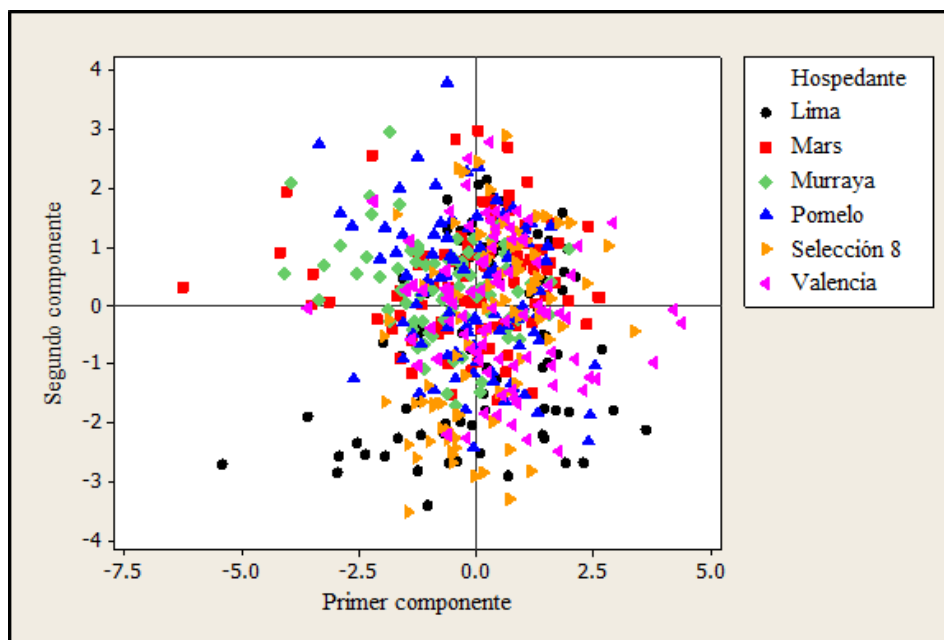


Figura 2.5 Dispersión de caracteres morfológicos de machos de *Diaphorina citri* determinada por el primer y segundo componente principal en ejemplares recolectados en diferentes hospedantes rutáceas en Cazones, Veracruz, México.

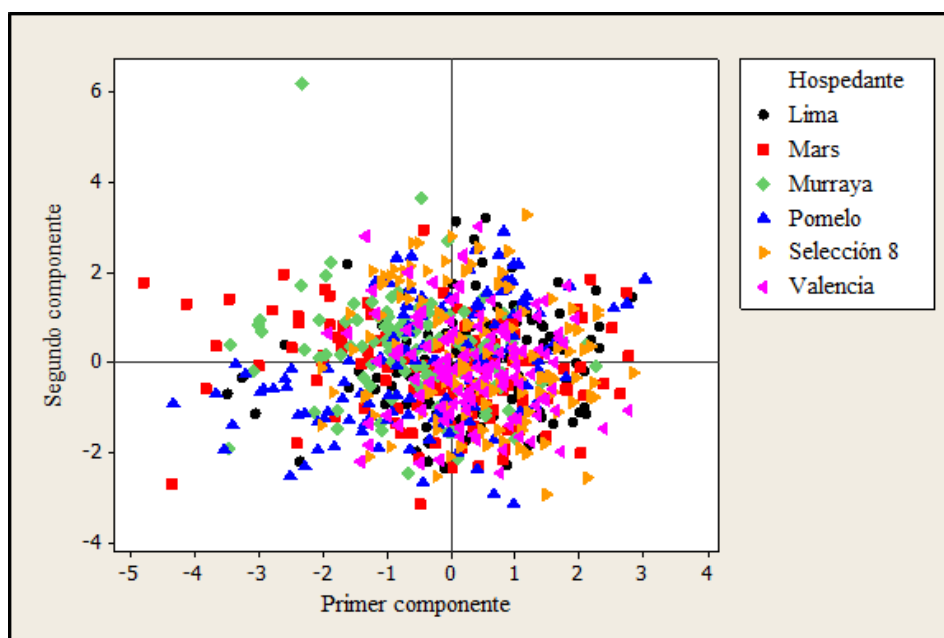


Figura 2.6. Dispersión de caracteres morfológicos de hembras de *Diaphorina citri* determinada por el primer y segundo componente principal en ejemplares recolectados en diferentes hospedantes rutáceas en Cazones, Veracruz, México.

En términos generales, en ambos sexos, se observó que las variables determinantes para realizar la caracterización morfométrica de *D. citri* fueron la longitud y amplitud de las alas y la longitud y amplitud de los procesos genales y los hospedantes que presentan a los individuos con más variabilidad morfométrica fueron lima y naranja ‘Selección 8’.

2.6 DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio revelan la presencia de variantes morfométricas en *D. citri* lo cual muy posiblemente está determinado por la planta hospedante, aunque pueden atribuirse también a factores abióticos como la temperatura, precipitación, humedad relativa, entre otros (García-Barros, 1999; Bomfim *et al.*, 2011). Berlocher & Feder (2002) mencionan que dichos cambios pueden originarse como consecuencia de la migración de una plaga, ya que tienen que adaptarse al cambio geográfico o a un nuevo hospedante.

Los hospedantes donde se recolectaron los individuos con mayores variantes morfométricas fueron *C. limetta* y *C. sinensis* cv ‘Selección 8’. Dicha variabilidad fue más evidente en los machos. Hodkinson (2009) señala que algunas especies de psílidos muestran polimorfismo en ciertas estaciones del año como parte de su ciclo de vida; este polimorfismo involucra diferencias en color o tamaño y puede manifestarse en variaciones en la forma y venación de las alas, presencia o intensidad del patrón de coloración de las alas anteriores, distribución y densidad de las espínulas de las alas, y ligeros cambios en la forma de la terminalia, coloración del cuerpo, y la longitud de la antena, así como los segmentos de la misma. Cabe mencionar que en los ejemplares recolectados en el presente estudio los cambios morfométricos más evidentes se manifestaron en la venación alar; 2.65% en machos y 1.9% en hembras. Sin embargo, estas variaciones en la venación alar pueden atribuirse a las condiciones de estrés ambiental que conduce a alteraciones en el desarrollo normal (Badyaev, 2005) y que podría implicar la temperatura (Santos *et al.*, 2006) y una posible relación entre la hibridación interespecífica y a la asimetría fluctuante (Rego *et al.*, 2006).

También se observaron variaciones en el color abdominal (gris-marrón, azul-verde y naranja-amarillo) las cuales probablemente, como lo anotan Wenninger *et al.* (2009) están relacionados con la reproducción, atracción, fecundidad y la calidad de la planta hospedante. Varios autores señalan que el color gris-marrón resulta de una alta población en un mismo hospedante, y el azul-verde por la presencia de carotenoides presentes en la hemolinfa (Weisgraber *et al.*, 1971, Jenquins *et al.*, 1999, Wenninger *et al.*, 2009) o a la acumulación de clorofila (Barbier, 1981). Aunque Wenninger & Hall (2008) anotan que las variaciones en color de formas genéticamente distintas o estacionales. Caillaud & Losey (2010) demostraron en el áfido *Acyrtosiphon pisum* Harris la existencia de determinismo genético para el polimorfismo en color.

Hollis (1987) señala que el hospedante original de *D. citri* fue una especie de *Murraya*, pero que el psílido se adaptó a otras rutáceas, permitiéndole desarrollarse con éxito en *C. sinensis* y *C. paradisi* (Tsai & Liu, 2000) aunque dicha adaptación trajo consigo cambios en la talla de los organismos derivados de la calidad de los nutrientes de la planta hospedante (Moran, 1968). Esta hipótesis fue sustentada por Lowe (1967) quien encontró crecimientos diferenciales del pulgón *Aulacorthum solani* Kaltenbach dependiendo del sitio de alimentación, incluso dentro de la misma hoja.

Las diferencias morfométricas en los individuos recolectados en *C. limetta* y *C. sinensis* cv ‘Selección 8’ sugieren una adaptación a nuevos hospedantes, como lo comprobó Moran (1968) al encontrar que *T. erytrae* se desarrolló mejor sobre sus hospedantes originales *Vepris undulata* Verdoorn & C. A. Sm. y *Clausena anisata* Willd, que en *C. limón*, ya que el psílido tuvo que readaptarse a este último hospedante cuando se introdujeron los cítricos en el sur de África.

En este estudio fue evidente que *D. citri* es una especie con variaciones morfométricas, por lo que puede atribuirse a su adaptación a la región de estudio como consecuencia del aislamiento geográfico de su centro de origen y que el hospedante podría tener repercusiones sobre la variación de *D. citri*. *M. paniculata* y *C. sinensis* cultivar ‘Mars’, fueron los hospederos que soportaron las poblaciones más altas, aspecto que coincide con varios autores quienes comentan que ello se debe a que dichas rutáceas presentan un crecimiento continuo de brotes y emisión de

hojas nuevas que son fuente de alimento y oviposición para el psílido (Tsai *et al.*, 2002; Skelley & Hoy, 2004; Yasuda *et al.*, 2005; Fernández & Miranda, 2005b, Ortega-Arenas *et al.*, 2013). Por su parte Teck *et al.* (2011) relacionan la abundancia poblacional con las características fisiológicas de la planta debido a que las hembras prefieren hojas suaves para la oviposición y de esa forma producir más generaciones al año con un ciclo de vida más corto que en otros hospederos. En contraste con lo anterior, en los árboles de *C. limetta*, *C. sinensis* cv ‘Selección 8’ y *C. paradisi* la densidad de adultos fue baja a pesar de la disponibilidad de brotes (Ortega-Arenas *et al.*, 2013). La no preferencia para *C. sinensis* cv ‘Selección 8’ se atribuye a que es un cultivar tardío, además de que presenta hojas grandes de color oscuro de apariencia seca y marchita, poco atractivas para el insecto. Al respecto White (1970) anota que las hojas maduras no son una fuente alimenticia de calidad ya que los nutrientes solubles no están disponibles, en particular los aminoácidos, y en consecuencia la reproducción disminuye, el desarrollo se alarga y la esperanza de vida se acorta. Esta aseveración también coincide con Moran (1968) y Tsagkarakis & Rogers (2010) quienes anotan que las diferencias en tamaño y duración del desarrollo de *T. erytrae* fueron reflejo de simples cambios en las propiedades nutricionales de las plantas.

La planta hospedante tiene un marcado efecto en la fenología del psílido, lo cual finalmente origina cambios en la talla de los insectos. En hospederos preferenciales como *C. paradisi* y *C. sinensis* cv ‘Marrs’ ocurren generalmente mayores poblaciones debido a que presentan sincronía con los periodos de brotación y las hojas de estos contienen los nutrimentos esenciales que garantizan su sobrevivencia (Liu & Tsai, 2000; Hall *et al.*, 2008; Ortega-Arenas *et al.*, 2013). Un alto índice de oviposición en pomelo resulta de la interacción de factores fisiológicos de la planta o factores físicos como la dureza de la hoja, ya que ésta es más ondulada y pubescente, que el de otras plantas, haciendo a ésta una hospedera más atractiva y adecuada para la oviposición y refugio de los insectos (Moran & Buchan, 1975, Tsai & Liu, 2000), aunque Wenninger *et al.* (2009) señalan que la calidad de la planta hospedante disminuye a través del tiempo por la alimentación continua de una alta densidad del psílido, inyección de toxinas salivales, presencia de endosimbiontes y/o predisposición genética.

En general, las hembras fueron más grandes ($\bar{x} = 2.81\text{mm} \pm 0.019 \text{ EE}$) que los machos ($\bar{x} = 2.45 \text{ mm} \pm 0.020 \text{ EE}$), aspecto que coincide con lo reportado por varios autores en diferentes países como Argentina (3.3 mm y 2.7 mm) (Hall, 2008), Isla Reunión (2.8 a 3.2 mm) (Étienne *et al.*, 2001), Cuba (2 a 3 mm) (Fernández & Miranda, 2005a) y Venezuela (3.1 y 2.5 mm) (Fonseca *et al.*, 2007); sin embargo, difieren de lo registrado por Mathur (1975) y la EPPO (2005) quienes reportan una longitud menor tanto para machos (1.53 -1.7) como para hembras (2.06 - 2.4 mm).

La diferencia en la talla de los machos respecto a las hembras se atribuye a que éstos son más activos que las hembras y en consecuencia el gasto energético por unidad de peso corporal es más alto. Según Hodkinson (2009) existe una relación negativa entre la respiración y la masa corporal, lo que indica que las especies más pequeñas tienden a ser menos eficientes para respirar que las más grandes y en consecuencia tienen una talla menor. Por el contrario, la mayor masa corporal y talla en las hembras se relaciona, al menos en parte, con una mayor ingesta de alimento y producción de huevos (Wenninger *et al.*, 2009).

La mayor talla corporal también estuvo relacionada con una mayor longitud de las alas anteriores (LA y AA) y sexo. En general en las hembras la LA y AA fue mayor ($\bar{x} = 2.24 \text{ mm} \pm 0.007 \text{ EE}$ y $0.96 \text{ mm} \pm 0.003 \text{ EE}$) que en los machos ($\bar{x} = 2.12 \pm 0.008 \text{ EE}$ y $0.90 \text{ mm} \pm 0.004 \text{ EE}$) resultado que coincide con Mathur (1975) y Chetry *et al.* (2012) quienes reportan una medida promedio de 2.17 mm para LA y 0.84 mm para AA; aunque señalan que pueden existir ligeras variaciones en función de factores ambientales diferenciales.

Existe una relación funcional entre el tamaño corporal, la frecuencia del batido de las alas y características morfológicas de las mismas; a mayor tamaño corporal corresponden alas con mayor superficie pero con movimientos más lentos (García-Barros, 1999). La mayor talla corporal y mayor longitud de alas en hembras está relacionada con un incremento en la actividad de vuelo de éstas en búsqueda de brotes para ovipositar, lo cual se restringe a horas de mayor luminosidad (Aubert & Quilici, 1988; Halbert & Manjunath, 2004; Wenninger & Hall, 2007). El movimiento del psílido es común durante todo el día; sin embargo, esta actividad se acrecienta durante las horas más cálidas, cuando no hay presencia de viento o en las tardes soleadas entre

las 4 a 6 pm (Aubert & Hua, 1990). Investigaciones en Florida indican que un bajo número de psílidos rutinariamente se dispersa de los cítricos a distancias de 8 a 60 m, pero también hay evidencia de que ocurren migraciones masivas ocasionales (Hall *et al.*, 2008). Aunque es difícil precisar la relación entre diseño, o proporción y talla, y su relación con fecundidad García-Barros (1999) anota que la manera en que uno o varios caracteres se combinan y expresan constituye el sustrato de la selección natural.

El análisis de componentes principales en este estudio, muestra que la longitud de las antenas no fue determinante para diferenciar a los machos de las hembras, y fue similar en todos los ejemplares recolectados en los diferentes hospedantes; sin embargo, estos órganos son esenciales durante el apareamiento, localización y elección del hospedante (Moran & Brown, 1973). García-Barros (1999) afirma que existe una relación funcional de tamaño del cuerpo de adultos y las características morfológicas del ala: cuanto mayor sea el tamaño del cuerpo, mayor es el área de superficie del ala; sin embargo, los movimientos son lentos. La función de los procesos genales no se conoce con precisión al respecto, Kristoffersen (2006) indica que la proximidad de tales estructuras con los lóbulos antenales sugiere que los procesos genales probablemente tengan una función olfativa, y que esto puede tener un impacto significativo en la localización del hospedante.

2.7 CONCLUSIONES

Se concluye que *D. citri* en la región de Cazones, Veracruz, México es una especie con variaciones morfométricas y probablemente el hospedante posee un efecto determinante en la definición de caracteres. La mayor variación morfométrica y menor talla se encontró en especímenes machos colectados en hospederos no preferenciales como *C. limetta* Risso, *C. sinensis* (L.) ‘Selección 8’ y *C. paradisi* Macfad. cv. ‘Rio Red’; mientras que los más grandes y menos variables en *C. sinensis* ‘Marrs’, *C. sinensis* (L.) cv. ‘Valencia’ y *M. paniculata*. Los caracteres con variación notable fueron la longitud y amplitud de las alas anteriores y de los procesos genales. Se encontró mayor variación morfométrica en machos que en hembras.

CAPÍTULO III

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Diaphorina citri* (HEMIPTERA: Liviidae) DE RUTÁCEAS EN CAZONES, VERACRUZ, MÉXICO

3.1 RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue conocer la diversidad genética de *Diaphorina citri* en Cazones, Veracruz, en poblaciones de insectos recolectados en seis hospedantes cítricos, mediante el uso de una región del marcador genético mitocondrial Citocromo oxidasa subunidad I (COI) utilizando los oligonucleótidos: CI-J-1718 (forward) 5'-GGAGGATTGGAATTGATTAGTTCC-3' y C1-N-2191 (reverse) 5'-FCCCGGTAAAATTAAAATATAAACTTC-3'. Para complementar el trabajo se incluyeron muestras de López-Piñón *et al.* (2012) de los estados de Nuevo León, Michoacán, Veracruz y Yucatán recolectados en diferentes hospedantes cítricos, así como a *Bactericera cockerelli* Sulc como grupo externo. A partir del alineamiento de las secuencias del ADN mitocondrial, los resultados indicaron la presencia de un solo haplotipo (H1) presente en la región de estudio. No se obtuvo variación genética en las secuencias de las poblaciones en relación con el hospedero, sexo de los ejemplares y fecha de colecta. Se confirma que *D. citri* es la única especie asociada a cítricos en la región.

Palabras clave: Citocromo de oxidasa subunidad I (COI), haplotipo, psílido asiático.

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Diaphorina citri* (HEMIPTERA: Liviidae) OF HOST RUTACEAEs FROM CAZONES, VERACRUZ, MEXICO

3.2 ABSTRACT

The objective of this study was to know the genetic diversity of *Diaphorina citri* in Cazon, Veracruz, in insect populations collected in six rutaceous host species; it was used a mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (COI) using the universal primers: CI-J-1718 (forward) 5'- GGAGGATTGGAATTGATTAGTTCC-3' y C1-N-2191 (reverse) 5'-FCCCGGTAAAATTAAAATATAAACTTC-3'. To complement the work there were included samples from López-Piñón *et al.* (2012) from of the following states: Nuevo Leon, Michoacan, Veracruz and Yucatan. The insect material was collected in different rutaceous host species as well as *Bactericera cockerelli* Sulc as outgroup. From the alignment of the sequences of mitochondrial DNA, the results indicated the presence of only one haplotype (H1) present in the study area. No genetic variation was obtained in the sequences of populations in relation to the host species, sex of the specimens, and date of collect. It is confirmed that *D. citri* is the only species associated with citrus in the region.

Key words: Cytochrome oxidase subunit I (COI), haplotype, Asian citrus psyllid

3.3 INTRODUCCIÓN

El Psílido Asiático de los Cítricos (PAC), *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) posee un rango restringido de plantas hospederas que incluye a plantas de la familia Rutaceae, particularmente del género *Citrus* y *Murraya* siendo éste último el huésped preferencial (Chakraborty *et al.*, 1976) y original de *D. citri* (Hollis, 1987). Las variaciones de *D. citri* en diferentes hospedantes pueden ocasionar un marcado efecto en el desarrollo, longevidad y reproducción del psílido (Tsai & Liu, 2000), aunque dicha adaptación está relacionada con la calidad de los nutrientes del hospedante. Se han reportado variaciones en tamaño y color dentro de la especie que difieren del tipo ‘normal’ de la población (Wenninger *et al.*, 2009) lo cual sugiere la probable existencia de haplotipos y/o especies diferentes.

En general, la sistematización de grupos taxonómicos ha llevado a realizar estudios basados en características morfológicas, las cuales no siempre son fáciles de observar, y algunas veces pueden variar. Por lo cual, recientemente para el estudio de especies, se recurre al análisis molecular, el cuál provee una base sólida en hipótesis de tipo filogenética, con el propósito de determinar especies, determinar variaciones intra e interespecíficas del ADN de una especie, hacer análisis filogenético, estudios de ecología y manejo de plagas (De Rojas *et al.*, 2011; Feldman & Ntenda, 2011). La filogenética posee un amplio enfoque para delimitar especies morfológicamente similares, además, de utilizarse en la determinación geográfica del origen de las especies invasoras, como es el caso de *D. citri* (Avise, 2000; Roderick & Navajas, 2003; Brown, 2004; Roderick, 2004; de León *et al.*, 2006, 2008; Triapitsyn *et al.*, 2008). Aun cuando Boykin *et al.* (2007) evaluaron la diversidad alélica de 288 individuos de *D. citri* de Florida, Texas y Brasil por medio de microsatélites polimórficos, no encontraron diferencias significativas entre alelos, años más tarde, los mismos autores, al analizar mediante citocromo oxidasa mitocondrial 1 (COI), 212 individuos provenientes de 52 colecciones de 15 países, registraron la presencia de ocho haplotipos, donde el más frecuente fue el haplotipo Dcit-1 SWA (Boykin *et al.*, 2012). López-Piñón *et al.* (2012) también trabajaron con COI y reportaron la existencia de tres haplotipos para la zona de México, uno de los cuales es único para la zona de Yucatán y, no encontraron relación entre haplotipos y hospedero.

El estudio de la genética molecular en *D. citri* y otros insectos provee una perspectiva a la biología básica de insectos por lo que puede usarse en el desarrollo de herramientas genéticas y estrategias novedosas de manejo dirigidas a reducir poblaciones del psílido (Marutani-Hert *et al.*, 2010). Sin embargo; es imprescindible caracterizar genéticamente a la plaga porque las poblaciones de la misma especie pueden diferir en características biológicas pertinentes de importancia para el control biológico. Existen reportes que indican que los enemigos naturales normalmente co-evolucionan con la plaga objetivo, lo que les confiere gran capacidad de encontrar a su hospedante, incrementando las posibilidades de éxito en un programa de control biológico (Narang et al. 1993, Unruh y Woolley 1999, de León et al. 2004).

En la actualidad poco se ha estudiado en relación a la descripción y variación genética entre las poblaciones de *D. citri* que permita la adecuada comprensión del proceso evolutivo de esta plaga y las implicaciones prácticas que esto puede tener, por lo que se planteó como objetivo el conocer la diversidad genética de *D. citri* en seis rutáceas hospedantes en la región de Cazonas, Veracruz, México, mediante el uso del gen mitocondrial COI.

3.4 MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.1. Recolecta del material biológico

Los especímenes adultos se recolectaron mensualmente en los siguientes cultivos: 1) lima dulce (*C. limetta* Risso), de 10 años de edad, establecidos en una planicie de 2 ha donde el manejo consistió de deshierbes químicos y aplicaciones de fertilizantes e insecticidas; 2) Naranja Marrs (*C. sinensis* L. cv. ‘Marrs’), de 12 años, dispuestas en un lomerío de 1.7 ha, en hileras de 6 × 6 m de distancia, y sometida regularmente a labores de deshierbe, podas de saneamiento y fertilización; 3) Naranja Valencia (*C. sinensis* cv. ‘Valencia’) de 15 años, plantados en una superficie de 3 ha en hileras de 6 × 6 m de distancia; 4) Naranja ‘Selección 8’ (*C. sinensis* ‘Selección 8’), de siete años, dispuestos a 5 × 6 m de distancia en una planicie de 3 ha, combinados temporalmente con maíz.; 5) Pomelo (*C. paradisi* Macfad cv. ‘Rio Red’) de nueve

años, dispuestos en una planicie de 1 ha en hileras de 5 × 6 m, y sometida regularmente a labores de deshierbe, podas de saneamiento y fertilización; y 6) *Murraya* (*M. paniculata* (L.) Jack), de seis años, establecidas en huertos familiares y áreas urbanas sin aplicación de plaguicidas.

En cada sitio y fecha se revisaron las hojas y brotes (cuando presentes) de varios árboles o plantas al azar, para recolectar con un aspirador bucal y/o red entomológica los adultos presentes en un periodo de 30 min de búsqueda.

Durante todo el año se colectó un total de 4,719 adultos; 1,725 machos y 2,994 hembras. Sin embargo, para el análisis molecular y con base en los resultados obtenidos en la caracterización morfométrica de *D.citri*, se seleccionaron los ejemplares con mayor variación en los procesos genales y alas anteriores; los cuales se conservaron en tubos eppendorf con alcohol al 100% para la posterior extracción de ADN.

3.4.2. Determinación de la especie

La determinación taxonómica de los ejemplares recolectados se realizó mediante las claves dicotómicas para Psylloidea propuestas por Yang (1984) y Burckhardt (2007). Los ejemplares estudiados se depositaron en la colección de referencia de Insectos Vectores del Colegio de Postgraduados.

3.4.3. Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó en 68 ejemplares, de los cuales 48 pertenecen a la región de Cazones, Veracruz y el resto provenían de muestras recolectadas por López-Piñón *et al.* (2012) de los estados de Nuevo León, Michoacán, Veracruz y Yucatán en diferentes hospedantes cítricos. (Cuadro 3.1). La extracción de ADN se realizó de manera individual y se siguió el protocolo propuesto por el Pure Link Genomic DNA Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). El ADN resultante se mantuvo a -20°C hasta su uso posterior.

3.4.4 Amplificación de la región COI de ADNmt mediante la técnica de PCR

Una vez extraído el ADN, se utilizó la técnica de PCR punto final, para amplificar un fragmento del gen mitocondrial de la Citocromo oxidasa subunidad I (COI), utilizando los oligonucleótidos: CI-J-1718 (forward) 5'-GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC-3' y C1-N-2191 (reverse) 5'-CCCCGGTAAAATTAATAAATACTTC-3' (Simon *et al.*, 1994). Las reacciones de PCR se prepararon de acuerdo a las siguientes concentraciones: 3.5 µl de solución buffer, 0.7µl de dntps (10 mM), 0.46 µl de cada primer (10 ng de cada uno), 3.5 µl de DNA, 0.46µl de enzima Taq polimerasa (5µ/µl), 1.75 µl de MgCl₂ (25Mm) y 24.17µl de agua miliQ estéril. La amplificación del fragmento COI, se realizó de acuerdo a las siguientes condiciones: un ciclo inicial de 5 minutos a 95° C, seguido de 36 ciclos de 30 segundos a 95°C, 1 minuto a 48°C, un minuto a 72°C y por último un paso de extensión de 10 minutos a 72°C. Como testigo se colocó un tubo con todos los componentes anteriormente mencionados pero sin ADN.

Cuadro 3.1. Muestras utilizadas para la extracción de ADN provenientes de diferentes hospedantes y estados.

Especie	Estado	Municipio	Muestras analizadas
<i>Diaphorina citri</i>	Michoacán	Apatzingan	6
	Nuevo León	General Terán	5
	Veracruz	Acahucan	1
		Cazones	48
		Cosoloacaque	1
		Jaltipan	1
		Juan Rdz Clara	1
		Minatitlán	1
<i>Bactericera cockerelli</i>			2
Dcit1-COI NL			1
Dcit4-COI Yuc			1
Total			68

3.4.5. Electroforesis

Los fragmentos amplificados mediante PCR se separaron por su tamaño mediante electroforesis, en geles de agarosa al 2% y se compararon con un marcador de peso molecular conocido (100 pb) para identificar el fragmento amplificado. Posteriormente los productos de amplificación se visualizaron y fotografiaron bajo luz ultravioleta en un transiluminador. Todas las muestras purificadas de reacción de PCR obtenidas de la región COI se enviaron a la compañía Macrogen (Maryland Rockville, USA) para su purificación y secuenciación en ambos sentidos (5'-3': 3'-5').

3.4.6. Alineación de las secuencias

Una vez obtenidas las secuencias de ADN, los productos se revisaron y alinearon manualmente con el programa Mega 5 (Tamura *et al.*, 2011) con la finalidad de identificar si existía variación genética. En el alineamiento de las secuencias COI se incluyeron las muestras de *D. citri* recolectadas por López-Piñón *et al.* (2012) de los estados de Nuevo León, Michoacán, Veracruz y Yucatán recolectados de diferentes hospedantes cítricos, así como ejemplares de *Bactericera cockerelli* Sulc como grupo externo.

3.4.7 Análisis de relaciones filogenéticas entre haplotipos

Se determinó la secuencia genética entre los haplotipos resultantes, se elaboró un árbol filogenético bajo el criterio de Neighbor-Joining (Tamura *et al.*, 2011) tomando el número de diferencias, el cual fue inferido en el mismo programa.

3.5 RESULTADOS

3.5.1. Determinación de la especie

Los especímenes recolectados en la comunidad de Cazonos, Veracruz, México de seis hospedantes rutáceas corresponden a *D. citri*. Con esta prueba molecular, se confirma que es la única especie presente en la región.

3.5.2 Electroforesis

La figura 3.1 muestra una parte de los resultados de amplificación de la región mitocondrial COI en *D. citri*. Los resultados arrojaron bandas con un peso aproximado de 600 pb, aunque de acuerdo a Liu *et al.* (2006) se esperaban bandas de 550 pb aproximadamente.

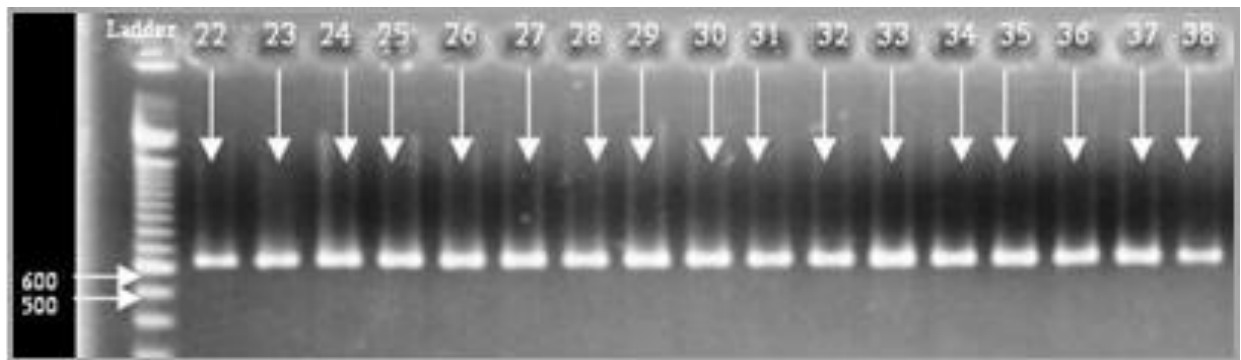


Figura 3.1 Gel de agarosa al 2% que muestra algunos fragmentos de la región COI amplificados.

3.5.3 Alineación de las secuencias

A partir del alineamiento de las secuencias del gen COI de *D. citri*, se encontró similitud en el tamaño de los fragmentos amplificados. No se observaron productos inespecíficos. Aún cuando se analizaron un total de 48 muestras para la región de Cazonos, Veracruz y 20 muestras

recolectadas por López-Piñón *et al.* (2012) y de que el gen COI posee ciertas características que lo hacen particularmente apropiado como marcador molecular en estudios evolutivos (Lunt *et al.*,1996), se obtuvo una variación baja entre las poblaciones procesadas por hospedante y localidad.

3.5.4 Análisis de relaciones filogenéticas entre haplotipos

El dendograma obtenido mediante el método Neighbor-Joining (NJ) se muestra en la Fig. 3.2. Con base en la distancia genética de las secuencias, se infiere que las poblaciones provenientes de la localidad de Cazones, Veracruz pertenecen a una misma rama lo que confirma la existencia de un solo haplotipo (H1) con una confiabilidad del 98%. Las demás secuencias incorporadas en el análisis recolectadas por López-Piñón *et al.* (2012) provenientes de poblaciones de otras localidades se agruparon en otra rama y pertenecen al (H2) diferente a las de Cazones, Veracruz. La secuencia proveniente de poblaciones del estado de Yucatán fue agrupada en otra rama (H3). Las secuencias de las especies utilizadas como grupo externo cumplieron adecuadamente con su función, ya que dichas secuencias se agruparon en un clado completamente distante al resto de los haplotipos incluidos.

Los cambios registrados en las secuencias analizadas se reportan en el Cuadro 3.2, donde se muestra el número de haplotipos encontrados, lugar de procedencia y los puntos de mutación.

Cuadro 3.2 Diferencias nucleotídicas de los haplotipos encontrados mediante el uso del gen mitocondrial COI.

Haplotipo (lugar de procedencia)	Posición nucleotídica (pb)				
	443	472	473	474	477
Haplotipo 1 (Cazones, Ver.)	A	C	T	A	A
Haplotipo 2 (Mich, Ver, NL*)	A	A	C	T	C
Haplotipo 3 (Yuc**)	C	A	C	T	C

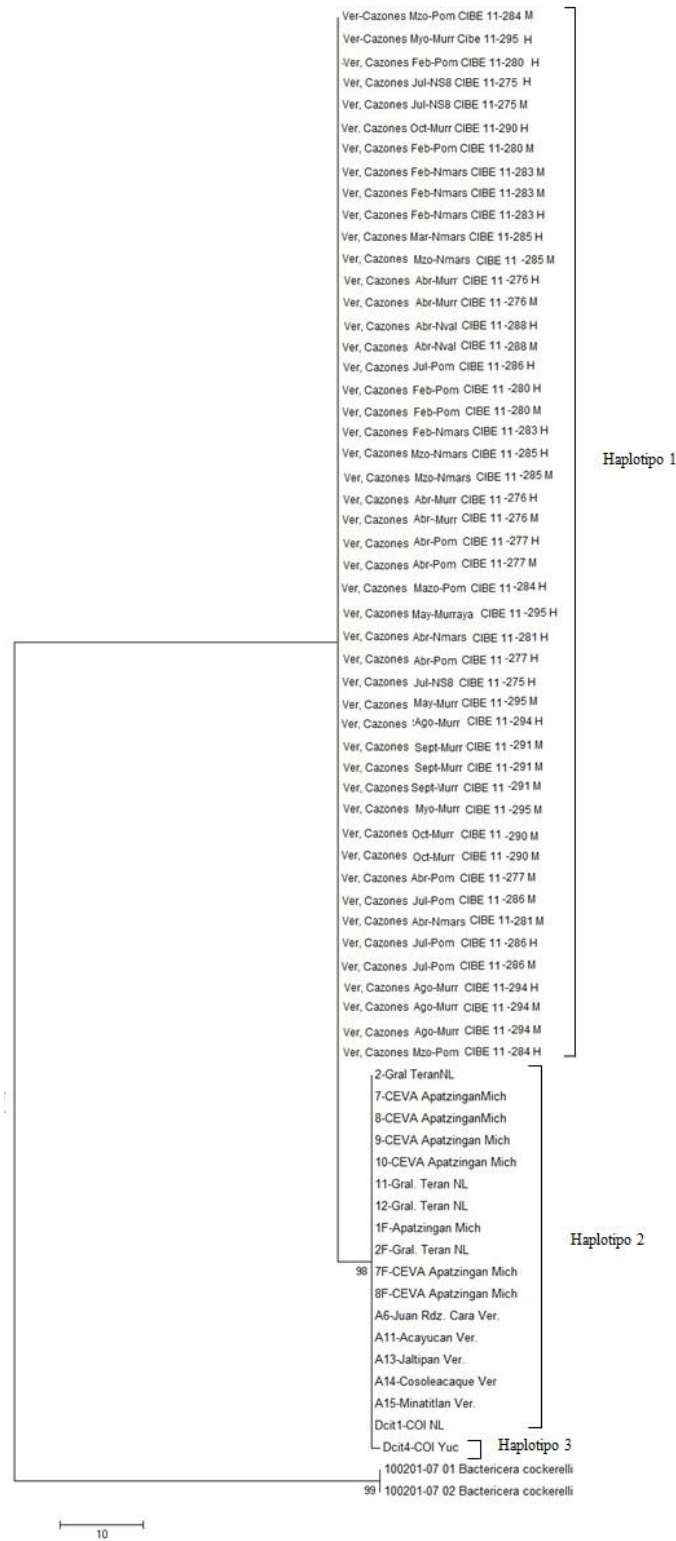


Figura 3.2. Árbol filogenético de Neighbor-Joining inferido de un fragmento del gen mitocondrial COI para poblaciones de *Diaphorina citri*. Incluye a *Bactericera cockerelli* como grupo externo.

3.6. DISCUSIÓN

El análisis de relaciones filogenéticas, a partir del gen mitocondrial COI se ha convertido en un método preferido en la actualidad por su amplio rango en el estudio taxonómico, poblacional, y evolutivo en animales (Lunt *et al.*, 1996) por lo que se considera una herramienta útil en el estudio de la variabilidad genética (Avise, 2000). La variación genética en COI y sus regiones se ha utilizado para caracterizar variaciones intraespecíficas (Palenko *et al.*, 2004) explicar los cambios en la población debido al aislamiento geográfico (Verovnik *et al.*, 2004) y clasificar a los individuos en cepas (Gómez y González, 2004), clados subespecíficos (Shufan, 2003) o haplotipos (Tuda *et al.*, 2004). Por su parte Avise (2000) señala que el gen citocromo de oxidasa I (COI) es uno de los genes más ampliamente utilizados en estudios sistemáticos y poblacionales debido a su alta tasa de mutación, herencia materna y falta de recombinación, así como para definir grupos de haplotipos que podrían corresponder a especies morfológicamente crípticas e identificar las posibles causas de divergencia.

El uso del gen citocromo de oxidasa COI utilizado en este trabajo como marcador molecular fue de gran utilidad, ya que son genes con variabilidad considerable entre especies cercanamente relacionadas y entre poblaciones de la misma especie. En adición, dichos genes son los más ampliamente utilizados en estudios de genética de poblaciones de animales, especialmente insectos como lo mencionan Kohnen *et al.* (2009). Dentro de los estudios para conocer la variabilidad genética en diferentes poblaciones de insectos con el COI se encuentran los realizados por Navajas *et al.* (1998) donde encontraron polimorfismo en *Tetranychus urticae* Koch.; Anderson & Trueman (2000) demostraron que *Varroa jacobsoni* Oudemans es un complejo de dos especies morfológicamente indistinguibles infestando *Apis cerana* Fabricius. De igual forma Toda (2000) utilizó una porción de 546 pb del gen mitocondrial COI para investigar las relaciones filogenéticas de especies del género *Panonychus* de Japón y Salomone *et al.* (2002) utilizaron una porción de 488 pb para examinar las relaciones entre diferentes miembros del género *Steganacarus* en las Islas Canarias. Por su parte Boykin *et al.* (2012) y de León *et al.* (2011) encontraron haplotipos de *D. citri* recolectados en diferentes países.

Con los resultados obtenidos en este estudio mediante el uso del COI se infiere que no hay diferenciación genética entre las poblaciones del psílido. Lo anterior se comprobó mediante la comparación de la distancia genética entre los grupos de individuos y el grupo externo por lo que la información generada en este trabajo puede esclarecer parte de la información sobre la variación genética así como las causas existentes de dispersión, hibridación y especiación que se puede dar entre las poblaciones de una plaga (Austin *et al.*, 2004).

La utilización de fragmentos de genes de COI fue adecuado para explicar la estructura genética de las poblaciones de *D. citri*; sin embargo, a pesar de la importancia en otros estudios y al uso que se le ha dado a COI, en el presente trabajo la variabilidad genética en las poblaciones estudiadas fue muy baja. Al respecto, Lee (2002) menciona que la ausencia de variación genética puede resultar en la carencia de la capacidad adaptativa de la especie a responder a factores ambientales, que podrían llevar a la extinción, además de que la baja variabilidad genética es un punto importante y puede basarse en la teoría del efecto fundador, lo que posteriormente experimentará un cuello de botella genético que dará lugar a una severa disminución de la diversidad genética (Narang *et al.*, 1993; Unruh & Woolley, 1999; Roderick & Navajas, 2003; Roderick, 2004). Por el contrario, un incremento en la variación genética en poblaciones invasivas permitiría que estas se adapten fácilmente a cambios asociados con un nuevo ambiente.

Estudios basados en la diferenciación genética de dos biotipos de *B. cockerelli* demostraron que poblaciones nativas de Texas poseen mayor supervivencia, alto índice de crecimiento y tiempos generacionales cortos para su desarrollo en comparación con las poblaciones invasivas de California. La fecundidad, fue significativamente mayor en psílicos nativos en plantas de tomate que en Chile. Sin embargo, los psílicos de las poblaciones invasivas prefirieron alimentarse de plantas de tomate mostrando en ellas mayor supervivencia e índice de crecimiento (Liu y Trumble, 2007).

El psílido se reportó por primera vez en el estado de Veracruz en el 2004 (SENASICA, 2012) por lo que la baja diversidad genética encontrada en la comunidad concuerda con la reciente introducción de la plaga a esa región. De León *et al.* (2011) mencionan que una plaga migratoria

presenta un bajo flujo génico durante el establecimiento o colonización a un nuevo hábitat, cabe mencionar que los migrantes que no se reproducen en la población a la que migraron no contribuyen al flujo génico como lo menciona Slatkin (1985). Por su parte Mallet (1999) menciona que la migración es el movimiento de poblaciones de una localidad a otra, lo cual muchas veces implica la existencia de flujo genético entre los individuos migrantes y los individuos locales, por lo que este flujo, es una medida indirecta de la capacidad que tienen los individuos de desplazarse y producir progenie.

A pesar de la baja variabilidad genética encontrada en este estudio es de esperarse que dicha variabilidad se incremente a través del tiempo y divergan, por ser una plaga migratoria aislada geográficamente de su lugar de origen. De hecho León *et al.* (2011) demostraron ya la existencia de un alto flujo genético entre poblaciones de *D. citri* al comparar poblaciones provenientes de diferentes países de Sudamérica, Norteamérica y una población de Hawaii, pues el análisis filogeográfico a partir de la utilización del gen mitocondrial COI, indicó la existencia de 23 haplotipos, resultado que indica la plasticidad genética y evolución de la plaga. Interesante resulta mencionar que dentro de los haplotipos reportados por dichos autores, el H9 es común en las poblaciones de Texas y Florida, pero también se encuentra en las poblaciones de México en los estados de San Luis Potosí, Yucatán, Tamaulipas y Nuevo León, por lo que se infiere que es el haplotipo dominante y más estable genéticamente. Esta misma situación fue confirmada por Boykin *et al.* (2012) y López-Piñón *et al.* (2012) al trabajar con colecciones de diferentes países, incluido México. Sin embargo, cabe resaltar que uno de los haplotipos (H3), hasta ahora es exclusivo del país y del estado de Yucatán, y que el haplotipo 1 encontrado en este estudio, en los diferentes hospederos en la región de Cazones, Veracruz, es similar a los haplotipos registrados hasta ahora por los diferentes investigadores, lo cual permite especular la presencia remota (~ 20 años atrás) del psílido en el país y la influencia de factores en la variación genética de la plaga como resultado de su introducción y adaptación local (Boykin *et al.* (2012).

Es probable que los resultados generados a partir del análisis de secuencias no hayan sido suficientes para estudiar genéticamente a los especímenes de *D. citri*. Sin embargo, si se ampliara el número de colecciones observadas es posible se puedan encontrar más sitios de mutación que

nos permitan estudiar la variación de las poblaciones. Incluso en algunos estudios utilizan varios genes individuales para inferir un árbol genético con mayor precisión por lo que será necesario utilizar más marcadores moleculares que permitan elucidar la estructura genética y resolver cuestiones filogeográficas en las poblaciones de *D. citri* (Ballard & Whitlock, 2004; Beebee y Rowe, 2008).

Los estudios genéticos de la población de una especie invasora son de gran importancia ya que dicha información puede ser útil en la búsqueda de agentes de control biológico, debido a que usualmente los enemigos naturales coevolucionan con la plaga, y puede ayudar a explicar la naturaleza de su distribución global, las interacciones con las plantas hospedadoras, su capacidad para transmitir la bacteria *Candidatus Liberibacter* y las diferencias en la efectividad de *T. radiata*, un parasitoide introducido en el Nuevo Mundo para el control de poblaciones invasivas de *D. citri* (Hoy & Nguyen, 2001; Boykin *et al.*, 2007). Cabe mencionar que en este estudio no se tuvieron los elementos suficientes para afirmar que el hospedante, sexo y la época de recolecta tuvieron injerencia directa en la definición de haplotipos.

3.7 CONCLUSIONES

Las secuencias de los fragmentos mitocondriales de los genes mostraron baja variabilidad genética, lo que indica que las poblaciones estudiadas corresponden a la misma especie presente en la localidad de Cazonas, Veracruz. Los resultados arrojaron que las poblaciones de este estudio pertenecen al haplotipo 1 y que difieren del resto de los haplotipos reportados a la fecha, debido a que se ubicó en un clado independiente de los demás. No se obtuvo variación en las secuencias de las poblaciones de Cazonas, Veracruz en relación con el hospedero, sexo y fecha de colecta.

CONCLUSIONES GENERALES Y RECOMENDACIONES

En este estudio fue evidente que *Diaphorina citri* es una especie con variaciones morfométricas atribuidas al hospedante, así como a los factores ambientales que inciden en una región. Las hembras fueron más grandes que los machos, pero estos últimos fueron más variables que las hembras. La mayor talla corporal también estuvo relacionada con una mayor longitud de las alas anteriores y sexo.

En ambos sexos, las variables determinantes para la caracterización morfométrica de *D. citri* fueron la longitud y amplitud de las alas anteriores y la longitud y amplitud de los procesos genales. *Murraya paniculata* y *Citrus sinensis* cultivar ‘Marrs’, fueron los hospederos que soportaron las poblaciones más altas. Los hospedantes donde se recolectaron los individuos con mayores variantes morfométricas fueron *C. limetta* y *C. sinensis* cv ‘Selección 8’.

A partir del gen mitocondrial COI se confirma que la especie presente en la localidad de Cazones, Veracruz es *D. citri*, además de que el haplotipo 1 encontrado en Cazones difiere del resto de los haplotipos analizados en este estudio.

Para complementar los hallazgos del presente estudio se recomienda continuar con la investigación para corroborar si las variaciones morfométricas están relacionadas con el hospedante, por lo que es necesario: 1) estudiar poblaciones de *D. citri* en cada hospedante a través del tiempo, para averiguar si las variaciones morfométricas encontradas son hereditarias y si la frecuencia de los morfos es estable o fluctúa entre generaciones, 2) Realizar bioensayos donde se críe la progenie de ejemplares que presenten anomalías en las alas o con procesos genales diferentes a los registrados y observar si la F1 conserva la variación parental presunta, 3) Criar una población monomórfica del psílido en diferentes hospedantes para averiguar si se producen las variaciones previstas en este trabajo y 4) Realizar análisis moleculares con el fin de ver posibles cambios al nivel del genoma en relación al tiempo.

LITERATURA CITADA

- Albrigo, L. C. 1999. Effects of foliar applications of urea or nutriphite on flowering and yields of Valencia orange trees. *Proceedings Florida State Horticulture Society* 112:1-4.
- Anderson, D., and J. Trueman. 2000. *Varroa jacobsoni* (Acari; Varroidae) is more than one species. *Experimental and Applied Acarology* 24: 165-189.
- Araya, J. E., S. E. Cambron, and R. H. Ratcliffe. 1996. Development and reproduction of two color forms of English grain aphid (Homoptera: Aphididae). *Environmental Entomology* 25:366-369.
- Arakawa, K., and K. Miyamoto 2007. Flight ability of Asiatic citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae), measured by a flight mill. *Research Bulletin of the Plant Protection Service of Japan* 43:23-26.
- Atwal, A. S., J. P. Chaudhary, and M. Ramzan. 1968. Studies on the development and field population of citrus psylla, *Diaphorina citri* Kuwayama (Psyllidae: Homoptera). *Journal of Research Punjab Agricultural University* 7:333-338.
- Aubert, B. 1990. Integrated activities for the control of huanglongbing greening and its vector *Diaphorina citri* Kuwayama in Asia. Pp. 133-44. *In*: B. Aubert, S. Tontyaporn, and D. Buangsuwon (eds.). 4th International Asia Pacific Conference on Citrus Rehabilitation. Chiang Mai, Thailand.
- Aubert, B. 1987. *Trioza erytrae* del Guercio and *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psylloidea), the two vectors of citrus greening disease: Biological aspects and possible control strategies. *Fruits* 42:149-162.
- Aubert, B., and X. Y. Hua. 1990. Monitoring flight activity of *Diaphorina citri* on citrus and *Murraya* canopies. Pp. 181-187. *In*: B. Aubert, S. Tontyaporn, and D. Buangsuwon (eds.). 4th International Asia Pacific Conference on Citrus Rehabilitation . Chiang Mai, Thailand.
- Aubert, B., and S. Quilici, 1988. Monitoring adult psyllas on yellow traps in Reunion Island. Pp. 249-254. *In*: Garnsey, S. M., Timmer, L. W. and Dodds, J. A. (eds.). 10th Conference of International Organization of Citrus Virologists. International Organization of Citrus Virologists, Riverside, CA.
- Aurambout, J. P., K. J. Finlay, J. Luck, and G. A. C. Beattie. 2009. A concept model to estimate the potencial distribution of the Asiatic citrus psyllid (*Diaphorina citri* Kuwayama) in

- Australia under climate change- A means for assessing biosecurity risk. *Ecological Modelling* 220:2512-2524.
- Austin, J. W., A. L. Szalanski, and B. M. Kard. 2004. Distribution and genetic variation of *Reticulitermes* (Isoptera: Rhinotermitidae) in Oklahoma. *Florida Entomologist* 87(2):152-158.
- Avise, J. C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, M. A.
- Badyaev, A. V. 2005. Stress-induced variation in evolution: from behavioural plasticity to genetic assimilation. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 272:877-886.
- Ballard, J., and M. Withlock. 2004. The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology* 13: 729-744.
- Baloch, G. M., and A. Ghaffar 1984. Natural enemies of *Chenopodium* spp. in Pakistan with notes on *Trioza chenopodii*, a promising biocontrol agent. *Entomophaga* 29:409-414.
- Barbier, M. 1981. The status of blue-green bile pigments of butterflies, and their phototransformations. *Experientia* 37:1060-1062.
- Beebe, T., and G. Rowe. 2008. *An introduction to molecular ecology*. New York: Oxford University Press Inc, pp. 400.
- Bekker-Migdisova, E. E. 1985. Iskopaemye nasekomye Psillomorfy [Fossil Psyllomorpha]. *Trudy Paleontologicheskogo Instituta Akademii Nauk SSSR*. 206:1-94.
- Berlocher, S. H., and J. L. Feder 2002. Sympatric speciation in phytophagous insects: Moving Beyond Controversy?. *Annual Review Entomology* 47:773-815.
- Bigornia, A. E., and S. P. Obana. 1974. Studies on the population dynamics of *Diaphorina citri* (Kuway.) and the flushing rhythm of citrus. *Philippine Journal of Plant Industry* 39(1):37-52.
- Boina, D. R., W. L. Meyer, E. O. Onagbola, and L. L. Stelinski. 2009. Quantifying dispersal of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) by immunomarking and potential impact of unmanaged groves on commercial citrus management. *Environmental Entomology* 38:1250-58.
- Bomfin, Z. V., K. M. Lima, J. G. Silva, M. A. Costa, and R. A. Zucchi. 2011. A Morphometric and Molecular Study of *Anastrepha pickelli* Lima (Diptera:Tephritidae). *Neotropical Entomology* 40(5):587-594.

- Boselli, F. B. 1960. Study sugli Psillidi (Homoptera: Psyllidae o Chermidae. XI. Biología e sviluppo di *Diaphorina putonii* Loew, specie nuova per la fauna italiana. Annali della Sperimentazione Agraria 14:139-156.
- Bove, J. M. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. Journal Plant Pathology 88:7-37.
- Boykin, L. M., P. De Barro, D. G. Hall, W. B. Hunter, C. L. McKenzie, C. A. Powell, and R.G. Shatters, Jr . 2012. Overview of worldwide diversity of *Diaphorina citri* Kuwayama mitochondrial cytochrome oxidase 1 haplotypes: two Old World lineages and a New World invasion. Bulletin of Entomological Research 102:573-582.
- Boykin L. M., Bagnall R. A., Frohlich D. R., D. G. Hall, W. A. Hunter, C. S. Katsar, C. L. Mckenzie., R. C. Rosell and R. G. Shatters Jr. 2007. Twelve polymorphic microsatellite loci from the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama, the vector for citrus greening disease, huanglongbing. Molecular Ecology Notes 7:1202-1204.
- Brown, J. K. 2004. Tracing the origin of cryptic insect pests and vectors, and their natural enemies. In: Ehler, L.E., Sforza, R., Mateille, T. (Eds.). Genetics, Evolution, and Biological Control. Wallingford, UK. Pp. 113-132.
- Burckhardt, D. 2007. Order Sternorrhyncha, superfamily Psylloidea. Arthropod fauna of the UAE 1:159-169.
- Burckhardt, D. 1994. Generic key to Chilean jumping plant-lice (Homoptera: Psylloidea) with inclusion of potential exotic pests. Revista Chilena de Entomología 21:57-67.
- Burckhardt, D. 1984. The Mediterranean species of *Diaphorina* Loew (Homoptera, Psylloidea). Phytophaga 2:1-30.
- Burckhardt, D., and D. Ouvrard. 2012. A revised classification of the jumping plant-lice (Hemiptera: Psylloidea). Zootaxa 3509:1-34.
- Caillaud, M. C., and J. E. Losey. 2010. Genetics of color polymorphism in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. Journal of Insect Science 10(95):1-13.
- Campbell, B. C., J. D. Steffen-Campbell, and R. J. Gill. 1994. Evolutionary origin of whiteflies (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodidae) inferred from 18S rDNA sequences. Insect Molecular Biology 3:73-88.

- Cen, Y., L. Zhang, Y. Xia, J. Guo, X. Deng, W. Zhou, R. Sequeira, J. Gao, Z. Wang, J. Yue, and Y. Gao. 2012. Detection of '*Candidatus liberibacter asiaticus*' in *Cacopsylla (psylla) citrisuga* (Hemiptera: Psyllidae). *Florida Entomologist* 95(2):304-310.
- Center, T. D, P. D. Pratt, P. W. Tipping, M. B. Rayamajhi, T. K. Van, S.A. Wineriter, and F. A. Dray. 2007. Initial impacts and field validation of host range for *Boreioglycaspis melaleucæ* Moore (Hemiptera: Psyllidae), a biological control agent of the invasive tree *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) Blake. *Environmental Entomology* 36:569-576.
- Cermeli, M., P. Morales, and F. Godoy. 2000. Presencia del psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) en Venezuela. *Boletín de Entomología Venezolana*. 15:235-243.
- Chakraborty, N. K., P. K. Pandey, S. N. Chatterjee, and A. B. Singh. 1976. Host preference in *Diaphorina citri* Kuwayama, vector of greening disease in India. *Indian Journal of Entomology* 38:196-197.
- Chavan, V. M., and A. S. Summanwar. 1993. Population dynamics and aspects of the biology of citrus psylla, *Diaphorina citri* Kuw., in Maharashtra. Pp. 286-290. *In*: P. Moreno, J. V. da Graça, and L. W. Timmer (eds.). 12 th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. University of California, Riverside.
- Chetry, M., R. Gupta, and J. S. Tara. 2012. Bionomics of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) on *Citrus sinensis* in Jammu Region of J & K State. *Munis Entomol and Zoology* 7(1):304-308.
- Curti-Díaz, S. A., R. X. Loredó-Salazar, U. Díaz-Zorrilla, J. A. Sandoval, and J. Hernández. 1996. Manual de producción de limón Persa. Folleto Técnico 14. INIFAP, Centro de Investigación Regional Golfo Centro, Campo Experimental Ixtacuaco. Tlapacoyán, Ver., México. Pp 145.
- da Graca, J. V., and L. Korsten. 2004. Citrus huanglongbing: review, present status and future strategies. Pp 229-245. *In*: S. A. M. H. Naqvi (ed.). *Diseases of Fruits and Vegetables Vol. I* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
- de León J. H., M. Sétamou, G. A. Gastaminza, J. Buenahora, S. Cáceres, P. T. Yamamoto, J. P. Bouvet, and G. A. Logarzo. 2011. Two Separate Introductions of Asian Citrus Psyllid

- Populations Found in the American Continents. *Annals of the Entomological Society of America* 104(6):1392-1398.
- de León, J. H., G. A. Logarzo, and S. V. Triapitsyn. 2008. Molecular characterization of *Gonatocerus tuberculifemur* (Ogloblin) (Hymenoptera: Mymaridae), a prospective *Homalodisca vitripennis* (Germar) (Hemiptera: Cicadellidae) biological control candidate agent from South America: divergent clades. *Bulletin of Entomological Research* 98:97-108.
- de León, J. H., W. A. Jones, M. Sétamou, and D. J. W. Morgan. 2006. Genetic and hybridization evidence conWrms that a geographic population of *Gonatocerus morrilli* (Hymenoptera: Mymaridae) from California is a new species: Egg parasitoids of the glassy-winged sharpshooter *Homalodisca coagulata* (Homoptera: Cicadellidae). *Biological Control* 38:282-293.
- de León, J. H., W. A. Jones, and D. J. W. Morgan. 2004. Population genetic structure of *Homalodisca coagulata* (Homoptera: Cicadellidae), the vector of the bacterium *Xylella fastidiosa* causing Pierce's disease in grapevines. *Annals of the Entomological Society of America* 97:809-818.
- De Rojas M., C. Riazso, R. Callejón, D. Guevara, and C. Cutillas. 2011. Morphobiometrical and molecular study of two populations of *Demodex folliculorum* from humans. *Parasitology Research* 110:227-233.
- Díaz-Zorrilla, U., H. Cabrera-Mireles, J. A. Villanueva-Jimenez, F. D. Murillo-Cuevas y J. I. López-Arroyo. 2011. Selección de insecticidas y épocas de aplicación para el control del psílido asiático en limón persa en Veracruz. Folleto Técnico No. 6. Pp. 16.
- Donovan, N. J., G. A. C. Beattie, G. A. Chambers, P. Holford, A. Englezou, S. Hardy, Dorjee, P. Wangdi, Thynlay, and N. Om. 2011. First report of "*Candidatus Liberibacter asiaticus* in *Diaphorina communis*. *Australasian Plant Disease. Notes*.
- EPPO. 2005. *Diaphorina citri*. European and Mediterranean Plant Protection Organization. EPP/EPPO Bulletin 35:331-333.
- Étienne, J., S. Quilici, D. Marivala, and A. Franch 2001. Biological control of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Guadeloupe by imported *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae). *Fruits* 56(5):307-315.

- Feldman, S., and A. Ntenda 2011. Phylogenetic analysis of *Myobia musculi* (Schrank, 1781) by using the 18S small ribosomal subunit sequence. *Comparative Medicine* 61:484-491.
- Fernández, M., y I. Miranda. 2005a. Comportamiento de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). Parte I: Características morfológicas, incidencia y enemigos naturales asociados. *Revista Protección Vegetal* 20(1):27-31.
- Fernández, M., y I. Miranda. 2005b. Comportamiento de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). Parte III: Relación entre el ciclo de vida y el brote vegetativo foliar. *Revista Protección Vegetal* 20(3):161-164.
- Fonseca, O., N. Valera, y C. Vásquez. 2007. Registro y ciclo de vida de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) en tres hospederos en el estado Lara, Venezuela. *Entomotropica* 22(3):145-152.
- Fung, Y. C., and C. N. Chen. 2006. Effects of temperature and host plant on population parameters of the citrus psyllid (*Diaphorina citri* Kuwayama). *Formosan Entomología* 26:109-123.
- García-Barros, E. 1999. Implicaciones ecológicas y evolutivas del tamaño en los artrópodos. *Boletín Sociedad de Entomológica Aragonesa* 26:657-678.
- Garnier, M., and J. M. Bové. 2000. Huanglongbing in Cambodia, Laos, and Myanmar. Pp. 378-380. *In*: J. V. da Graça, R. F. Lee and R. K. Yokomi (eds.). *Proceedings of 14th Conference IOCV*, IOCV, Riverside, CA.
- Geiger, C. A., and A. P. Gutierrez. 2000. Ecology of *Heteropsylla cubana* (Homoptera: Psyllidae): psyllid damage, tree phenology, thermal relations, and parasitism in the field. *Environmental Entomology* 29:76-86.
- Gomez, P. I., and M. A. Gonzalez. 2004. Genetic variation among seven strains of *Dunaliella salina* (Chlorophyta) with industrial potential, based on RAPD banding patterns and on nuclear ITS rDNA sequences. *Aquaculture* 233:149-162.
- Gottwald, T. R., J. V. da Graca, R. B. Bassanezi. 2007. Citrus huanglongbing: the pathogen and its impact. Online. *Plant Health Progress* doi:10.1094/PHP-2007-0906-01-RV.
- Grimaldi, D., and M. S. Engel. 2005. *Evolution of the Insects*. Cambridge University Press, Cambridge. [En línea]. Disponible en <http://books.google.com.mx/books?> [Consulta 12 de mayo de 2013].

- Halbert, S. E. 2005. The discovery of huanglongbing in Florida. Pp. 50. In: Tim R. Gottwald, Wayne N. Dixon, James H. Graham, Philip Berger (eds.). Proceedings of 2nd International Citrus Canker and Huanglongbing Research Workshop. Orlando, Florida.
- Halbert, S. E., and Manjunath, K. L. 2004. Asian Citrus Psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: A literature review and assessment of risk in Florida. *Florida Entomologist* 87(3):330-353.
- Halbert, S. E., and C. A. Nuñez. 2004. Distribution of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Rhynchota: Psyllidae) in the Caribbean basin. *Florida Entomologist* 87:401-402.
- Hall, D. G. 2008. Biology, History and World Status of *Diaphorina citri*. Pp. 1-11. In: Mangussi, Da Graca, D. Hall (eds.). Memorias del I Taller Internacional sobre Huanglongbing de los Cítricos (*Candidatus Liberibacter* spp) y el psílido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri*). Hermosillo, Sonora, México.
- Hall, D. G., M. G. Hentz, and R. C. Adair. 2008. Population ecology and phenology of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in two Florida citrus groves. *Environmental Entomology* 37(4):914-924.
- Hernández-Guerra, C.; S. A. Curti-Díaz y J. I. López-Arroyo. 2012. Abundancia de *Diaphorina citri* en cinco áreas agroecológicas, definidas por temperatura en Veracruz, y Puebla, México. In: J. I. López-Arroyo y V. W. González-Lauck (eds.). Memoria del 3er. Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México. Veracruz, México. Pag 159-171.
- Hodkinson, I. D. 2009. Life cycle variation and adaptation in jumping plant lice (Insecta: Hemiptera: Psylloidea): a global synthesis. *Journal of Natural History* 43:1-2, 65-179.
- Hodkinson, I. D. 1988. The Nearctic Psylloidea (Insecta: Homoptera): an annotated check list. *Journal of Natural History* 22:1179-1244.
- Hoffmann, W. E. 1936. *Diaphorina citri* Kuw. (Homoptera: Chermidae), a citrus pest in Kwangtung. *Lingnan Science Journal* 15:127-132.
- Hollis, D. 2004. Australian Psylloidea. Jumping plant lice and lerp insects. Australian Biological Resource Study. Australian Government, Canberra, Australia. 232 pp.

- Hollis, D. 1987. A new citrus-feeding psyllid from the Comoro Islands, with a review of the *Diaphorina amoena* species group (Homoptera). Systematic Entomology 12:47-61.
- Hollis, D. 1985. *Parapsylla*, a Gondwanan element in the psyllid fauna of southern Africa (Homoptera). Zoological Journal of the Linnaean Society 83:325-342.
- Hoy, M. A., and R. Nguyen. 2001. Classical biological control of Asian citrus psylla. Citrus Industry 81: 48-50.
- Huang B. 1990. Citrus Psyllid. Chinese Agricultural Encyclopedia (Volume Insects). Beijing: Agriculture Press. Pp 119-120 (in Chinese).
- Huang J., X. Luo, B. Huang and X. Yao. 1999. Studies on citrus psylla *Diaphorina citri* Kuwayama and its control. Entomological Journal of East China 8:26-34 (in Chinese with English abstract).
- Husain, M. A., and D. Nath 1927. The citrus psylla (*Diaphorina citri*, Kuw.) [Psyllidae: Homoptera]. Memoirs of the Department of Agriculture India, Entomology Series 10 (2):5-27.
- Iglesias, D. J., M. Cercós, J. M. Colmenero-Flores, M. A. Naranjo, G. Ríos, E. Carrera, O. Ruiz-Rivero, I. Lliso, R. Morillon, F. R. Tadeo and M. Talon. 2007. Physiology of citrus fruiting. Brazilian Journal of Plant Physiology 19(4):333-362.
- Inoue, H. 2004. Descriptions of two new and one little known species of the genus *Cacopsylla* (Hemiptera: Psyllidae) on *Sorbus japonica* (Rosaceae) and an observation of their biology. Entomological Science 7:399-413.
- Jenkins, R. L., H. D. Loxdale, C. P. Brookes, and A. F. Dixon. 1999. The major carotenoid pigments of the grain aphid, *Sitobion avenae* (F.) (Hemiptera: Aphididae). Physiological Entomology 24:171-178.
- Kohnen A., V. Wissemann, and R. Brandl. 2009. No genetic differentiation in the rose-infesting fruit flies *Rhagoletis alternate* and *Carpomya schineri* (Diptera: Tephritidae) across central Europe. European Journal Entomology 106: 315-321.
- Kristoffersen, L. 2006. Getting to know *Trioza apicalis* (Homoptera: Psylloidea) - a Specialist Host-Alternating Insect with a Tiny Olfactory System. Ph D. Dissertation. Lund University. Lund, Sweden. Pp 86.

- Krysan, J. L., and B. S. Higbee. 1990. Seasonality of mating and ovarian development in overwintering *Cacopsylla pyricola* (Homoptera: Psyllidae). *Environmental Entomology* 19:544-550.
- Langley, S. A., K. J. Tilmon, B. J. Cardinale, and A. R. Ives. 2006. Learning by the parasitoid wasp, *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae), alters individual fixed preferences for pea aphid color morphs. *Oecologia Berlin* 150:172-179.
- Lee, C. 2002. Evolutionary genetics of invasive species. *Trends in Ecology and Evolution* 17(8): 386-391.
- Lewis-Rosenblum, H. 2011. Seasonal and long-range movement of Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. MS thesis. Univ. Florida, Gainesville. Pp 75.
- Liu, D., and J. Trumble. 2007. Comparative fitness of invasive and native populations of the potato psyllid (*Bactericera cockerelli*). *Entomologia Experimentalis et Applicata* 123: 35-42.
- Liu, D., J. T. Trumble, 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* 118:177-183.
- Liu, Y. H., and J. H. Tsai. 2000. Biology of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) on four host plants. *Journal of Economic Entomology* 93:1722-1725.
- López-Arroyo, J. I., J. Jasso, M. A. Reyes, J. Loera-Gallardo, E. Cortez-Mondaca and M. A. Miranda. 2008. Perspectives for biological control of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Mexico. Pp.329-330. *In*: T. R. Gottwald and J. H. Graham (eds.). *Proceedings of the International Research Conference on Huanglongbing*. Orlando, Florida.
- López-Arroyo, J. I., M. A. Peña, M. A. Rocha-Peña y J. Loera. 2005. Ocurrencia en México del psílido asiático *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae). *In*: *Memorias del VII Congreso Internacional de Fitopatología*. Chihuahua, Chih., México. Pp. C68.
- López-Arroyo, J. I., M.A. Peña, M.A. Rocha-Peña and J. Loera. 2004. Occurrence of the Asiatic citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) in Mexico. Pp. 179. *In*: M. E. Hilf. N. Duran-Vila and M. A. Rocha-Peña (eds.). *XVI Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. Monterrey, Nuevo León, México.
- López-Piñón, J., A. González Hernández y J. I. López Arroyo. 2012. Variación genética de poblaciones de *Diaphorina citri* kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) en México, determinada

- con el marcador COI. Pag 16-22. In: J. Isabel López-Arroyo, Mario A. Rocha-Peña (eds.). 3er. Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México. Veracruz, México.
- Lowe, H. J. B. 1967. Interspecific differences in the biology of aphids (Homoptera: Aphididae) on leaves of *Vicia faba* II Growth and excretion. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 10:413-420.
- Lunt D. H., D. X. Zhang, J. M. Szymura, and G. M. Hewitt. 1996. The insect cytochrome oxidase I gene: Evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Molecular Biology* 5:153-165.
- Mallet, J. 1999. Gene flow. Chapter 16. Insect movement: Mechanism and consequences. Pp. 337-360. In: Woinwod I. P., D. R. Reynolds y C. D. Thomas (eds.). *Symposium Royal Entomological Society of London*. Vol 20.
- Manjunath, K. L., S. E. Halbert, C. Ramadugu, S. Webb, and R. F. Lee. 2008. Detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in *Diaphorina citri* and its importance in the management of citrus huanglongbing in Florida. *Phytopathology* 98:387-396.
- Marutani-Hert, M., W. B. Hunter and D. G. Hall. 2010. Gene response to stress in the Asian Citrus Psyllid (Hemiptera: Psyllidae). *Florida Entomologist* 93(4):519-525.
- Mathur, R. N. 1975. Psyllidae of the Indian Subcontinent. Indian Council of Agricultural Research. New Delhi. [En línea]. Disponible en <http://swfrec.ifas.ufl.edu> [Consulta 10 de junio de 2013].
- Mayr, E. 1968. *Especies Animales y Evolución*. Universidad de Chile & Ariel, S. A. [ed.] Santiago-Barcelona, España. Pp 808.
- McFarland, C., and M. Hoy. 2001. Survival of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae), and its two parasitoids, *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) and *Diaphorencyrtus aligarhensis* (Hymenoptera: Encyrtidae), under different relative humidities and temperature regimes. *Florida Entomologist* 84(2):227-233.
- Mead, F. W. 1977. The Asiatic citrus psylla *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae). *Entomology Circular* 180:1-4.

- Medina U. M., G. E. Zapiaín, M. M. G. Robles., O. Z Pérez, M. S. Orozco, T. Williams, and S. R. Becerra. 2007. Fenología, eficiencia productiva y calidad de fruta de cultivares de naranjo en el trópico seco de México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 30 (2):133 -143.
- Mehrnejad, M. R., and M. J. W. Copland. 2005. The seasonal forms and reproductive potential of the common pistachio psylla, *Agonoscena pistaciae* (Hem., Psylloidea). *Journal of Applied Entomology* 129:342-346.
- Minitab 15 Statistical Software, 2007. [Computer software]. State College, PA: Minitab, Inc.
- Moran, V. C. 1968. The development of the citrus psylla, *Trioza erytrae* (Del Guercio) (Homoptera: Psyllidae), on *Citrus limon* and four indigenous host plants. *Entomological Society of Southern Africa* 31(2):390-402.
- Moran, V. C., and Brown, R. P. 1973. The antennae, host plant chemoreception and probing activity of the citrus psylla *Trioza erytrae* (Del Guercio) (Homoptera: Psyllidae). *Entomological Society of Southern Africa* 36:191-202.
- Moran, V. C., and P. R. Buchan. 1975. Oviposition by the citrus psylla. *Trioza erytrae* (Homoptera: Psyllidae), in relation to leaf hardness. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 18: 96-104.
- Narang, S. K., W. J. Tabachnick, and R. M. Faust. 1993. Complexities of population genetic structure and implications for biological control programs. Pp. 19-52. *In*: S. Karl Narang, Alan C. Barlett, and Robert M. Faust (eds.). *Applications of genetics to arthropods of biological control significance*. CRC, Boca Raton, FL.
- Nava, D. E., M. L. G. Torres, M. D. L. Rodrigues, J. M. S. Bento, and J. R. P. Parra. 2007. Biology of *Diaphorina citri* (Hem. Psyllidae) on different hosts and at different temperatures. *Journal of Applied Entomology* 131(9-10):709-715.
- Navajas, M., J. Lagnel, J. Gutierrez, and P. Boursot. 1998. Species-wide homogeneity of nuclear ribosomal ITS2 sequences in the spider mite *Tetranychus urticae* contrasts with extensive mitochondrial COI polymorphism. *Heredity* 80: 742-752.
- Nehru, R. K., K. C. Bhagat, and V. K. Koul. 2004. Influence of citrus species on the development of *Diaphorina citri*. *Annals of Plant Protection Sciences* 12:436-38.

- Nevo, E., and Coll, M. 2001. Effect of nitrogen fertilization on *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae): variation in size, color, and reproduction. *Journal of Economic Entomology* 94:27-32.
- Ortega-Arenas, L. D., A. Villegas-Monter, A. J. Ramírez-Reyes, y E. E. Mendoza-García. 2013. Fenología de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) en tres plantaciones de cítricos en Cazon de Herrera, Veracruz, México. *Acta Zoologica Mexicana* (en prensa).
- Ouvrard, D. 2013 Psyllist - The World Psylloidea Database. <http://www.hemiptera-databases.com/psyllist> - searched on 05 de Julio 2013.
- Ouvrard, D., D. Burckhardt, D. Azar, and D. Grimaldi. 2010. Non-jumping plant-lice in Cretaceous amber (Hemiptera: Sternorrhyncha: Psylloidea). *Systematic Entomology* 35:172-180.
- Palenko M. V., D. V. Mukha, and I. A. Zakharov. 2004. Intraspecific and interspecific variation of the mitochondrial gene of cytochrome oxidase I in ladybirds (Coleoptera: Coccinellidae). *Russian Journal of Genetics* 40:148-151.
- Peng, W., Y. Huang, Z. Wu, and W. Long. 1996. A study of citrus yellow shoot and its integrated control in Panxi area of Sichuan. *Journal of Southwest Agricultural University* 18(6):527-529 (in Chinese with English abstract).
- Pfeiffer, D. G., and E. C. Burts 1983. Effects of tree fertilization on numbers and development of pear psylla *Psylla pyricola* (Homoptera: Psyllidae) and on fruit damage. *Environmental Entomology* 12:895-901.
- Quaintance, A. L., and A. C. Baker. 1915. Classification of the Aleyrodidae. Government Printing Office, Washington, D C.
- Qureshi, J. A., and P. A. Stansly. 2008. Rate, placement, and timing of aldicarb applications to control Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), in oranges. *Pest Management Science* 64:1159-1169.
- Rapisarda, C. 1993. Seasonal dimorphism in two Acacia-feeding psyllids of the genus *Acizzia* (Homoptera: Psylloidea). *Phytophaga* 3:131-146.
- Rego, C., M. Matos, and M. Santos. 2006. Symmetry breaking in interspecific *Drosophila* hybrids is not due to developmental noise. *Evolution* 60:746-761.

- Robles-González, M. M., J. J. Velázquez-Monreal, M. A. Manzanilla-Ramírez, M. Orozco-Santos, R. Flores Virgen, y J. I. López Arroyo. 2011. Control químico de *Diaphorina citri* en limón mexicano. Folleto Técnico Num. 1. Pp. 35.
- Roderick, G. K. 2004. Tracing the origins of pests and natural enemies: genetic and statistical approaches. Pp. 97-112. *In*: Ehler, L.E., Sforza, R., Mateille, T. (eds.). Genetics, Evolution, and Biological Control CABA International, Wallingford, UK.
- Roderick, G. K., and M. Navajas. 2003. Genes in new environments: genetics and evolution in biological control. *Nature Reviews Genetics* 4:889-899.
- Roistacher, C. N. 1996. The economics of living with citrus diseases: huanglongbing (greening) in Thailand. pp. 279-285. *In*: J. V. Da Garcia, P. Moreno and R. K. Yokomi (eds.). Proceedings of the 13th Conference of the International Organization of Citrus Virologists, Univ. of California, Riverside.
- Ruiz, C. E., J. M. B. Coronado, and S. N. Myartseva. 2006. Situación actual del manejo de las plagas de los cítricos en Tamaulipas, México. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)* 78:94-100.
- Ruiz, C. E., J. M. B. Coronado, and S. N. Myartseva. 2004. The Asian citrus psyllid in Mexico. 52nd Annual Meeting of the Entomological Society of America. Salt Lake City, Utah. [En línea]. Disponible en http://esa.confex.com/esa/2004/techprogram/paper_15993.htm [Consulta 15 de junio de 2013].
- Salcedo, B. D., H. González, y E. Vera. 2012. Análisis de la Campaña contra el HLB en 2008, 2009 y 2010 bajo el enfoque del marco lógico. IICA, SAGARPA, SENASICA, CEF- Profit México: IICA. 126 Pp.
- Salcedo, B. D., R. Hinojosa, G. Mora, I. Covarrubias, F. DePaolis, C. Cántora y S. Mora. 2010. Evaluación del Impacto Económico de Huanlongbing (HLB) en la Cadena Citrícola Mexicana. México: IICA. Pp 124.
- Salomone, N., B. Emerson, G. Hewitt, and F. Bernini. 2002 Phylogenetic relationships among the Canary Island Steganacaridae (Acari, Oribatida) inferred from mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Ecology* 11: 79.

- Santos, M., D. Brites, and H. Laayouni. 2006. Thermal evolution of pre-adult life history traits, geometric size and shape, and developmental stability in *Drosophila subobscura*. *Journal of Evolutionary Biology* 19:2006-2021.
- Schlee, D. 1969. Sperma-U bertragung (und andere Merkmale) in ihrer Bedeutung für das phylogenetische System der Sternorrhyncha (Insecta, Hemiptera). *Phylogenetische Studien an Hemiptera I. Psylliformes (Psyllina und Aleyrodina) als monophyletische gruppe*. *Zeitschrift für Morphologie der Tiere* 64:95-138
- Shcherbakov, D. E. 2007. Extinct four-winged precoccids and the ancestry of scale insects and aphids (Hemiptera). *Russian Entomological Journal* 16:47-62.
- Shufran, K. A. 2003. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphisms identify mtDNA haplotypes of greenbug (Hemiptera: Aphididae). *Journal of the Kansas Entomological Society* 76:551-556.
- SENASICA. 2012. Detección de Huanglongbing (*Candidatus Liberibacter asiaticus*) en el Municipio de Tizimin Yucatán, México Dirección General de Sanidad Vegetal SAGARPA/SENASICA. Organización, Norteamericana de Protección a las Plantas (NAPPO). Notificaciones oficiales de Plagas. [En línea] disponible en: www.pestalert.org [Consulta 12 de junio 2013].
- SIAP. 2013. Producción agrícola por cultivo y por estado. México [En línea]. Disponible en http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=350http://anrcatalog.ucdavis.edu/. [Consulta 15 de junio de 2013].
- Simon, C., F. Frati, A. Bechenbach, B. Crespi, H. Liu, and P. Flook. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America* 87:651-701.
- Skelley, L. H., and M. A. Hoy. 2004. A synchronous rearing method for the Asian citrus psyllid and its parasitoids in quarantine. *Biological Control* 29:14-23.
- Slatkin, M. 1985. Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16:393-430.
- SMN. 2012. Mapa de lluvias de días anteriores. Climatología, CONAGUA [En línea]. Disponible en: ww.smn.conagua.gob.mx [Consulta 01 de Junio de 2013].

- Sohail, A., A. Nisar, and K. R. Rasool. 2004. Studies on population dynamics and chemical control of citrus psylla, *Diaphorina citri*. International Journal of Agricultura and Biology 6:970-973.
- Southwick, S. M., and T. L. Davenport. 1986. Characterization of water stress and low temperature effects on flower induction in Citrus. Plant Physiology 81:26-29.
- Stansly, P. A., and J. A. Qureshi. 2007. Insecticidal control of Asian citrus psyllid through foliar applications on orange. Arthropod Management Tests 32: D10.
- Stoetzel, M. B., and G. L. Miller. 2001. Aerial feeding aphids of corn in the United States with reference to the rootfeeding *Aphis maidiradicis* (Homoptera: Aphididae). Florida Entomologist 84:83-98.
- Svensson, E. I., and J. Abbott. 2005. Evolutionary dynamics and population biology in the polymorphic blue-tailed damselfly (*Ischnura elegans*). Journal of Evolutionary Biology 18(6):1503-1514.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution 28(10):2731-2739.
- Teck, S. L. C., A. Fatimah, A. Beattie, R. K. J. Heng, and W. S. King. 2011. Influence of host plant species and flush growth stage on the asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. American Journal of Agricultural and Biological Science 6:536-543.
- Thomas, D. B. 2008. Psyllids of Citrus Orchards in South Texas. Pp. 254. In: Tim R. Gottwald and James H. Graham (eds.). Proceedings of the International Research Conference on Huanglongbing. Orlando, Florida.
- Thomas, D. B. 2002. Trip report: Status of the brown citrus aphid in the Mexican state of Campeche: April 2002. USDA-ARS. Kika de la Garza Subtropical Agriculture Research Center. Weslaco, Texas. 9. p.
- Thomas, D. B., and J. H. de Leon. 2011. Is the Old World Fig, *Ficus carica* L. (Moraceae), an Alternative Host for the Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Homoptera: Psyllidae)? Florida Entomologist 94(4):1081-1083.

- Toda, S., M. Osakabe, and S. Komazaki. 2000. Interspecific diversity of mitochondrial COI sequences in Japanese *Panonychus* species (Acari: Tranychidae). *Experimental and Applied Acarology* 24:821-829.
- Toros, S., I. Ozdemir, and H. Canakcioglu. 2003. The *Betula* aphids of Turkey. *Anzeiger fuer Schaedlingskunde* 76:173-175.
- Triapitsyn, S. V., G. A., Logarzo, J. H. de León and E. G. Virla. 2008. A new *Gonatocerus* (Hymenoptera: Mymaridae) from Argentina, with taxonomic notes and molecular data on the *G. tuberculifemur* species complex. *Zootaxa* 1949:1-29.
- Tsagkarakis, E. A. and M. E. Rogers. 2010. Suitability of ‘Cleopatra’ mandarin as a host plant for *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *Florida Entomologist* 93(3):451-453.
- Tsagkarakis and M. E. Rogers, 2008. Effects of host plant on fitness of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. Pp. 258. In: Tim R. Gottwald James H. Graham (eds.). International Research Conference of Huanglongbing. Orlando, Florida.
- Tsai, J. H., J. J. Wang, and Y. H. Liu. 2002. Seasonal abundance of the Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) in Southern Florida. *Florida Entomologist* 85 (3): 446-441.
- Tsai, J. H., J. J. Wang and Y. H. Liu. 2000. Sampling of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) on orange jessamine in southern Florida. *Florida Entomologist* 83:446-459.
- Tsai, J. H., and Y. H. Liu. 2000. Biology of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) on four host plants. *Journal of Economic Entomology* 96 (6):1721-1725.
- Tuda, M., N. Wasano, N. Kondo, S. B. Horng, L. Y. Chou, and Y. Tateishi. 2004 Habitat-related mtDNA polymorphism in the storedbean pest *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae). *Bulletin of Entomological Research* 94:75-80.
- Unruh, R. T., and J. B. Woolley. 1999. Molecular methods in classical biological control. Pp. 57-85. In R. G. Van Driesche and T. S. Bellows, Jr. (eds.). *Biological control*. Chapman & Hall, New York.
- van den Berg, M. A., and V. E. Deacon, 1988. Dispersal of the citrus psylla, *Trioza erytreae* (Hemiptera: Triozidae), in the absence of host plants. *Phytophylactica* 20:361-68.
- van Emden, H. F., 1996: Studies on the relations of insect and host plant. III. A comparison of the reproduction of *Brevicoryne brassicae* and *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) on

- brussels sprout plants supplied with different rates of nitrogen and potassium. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 9: 444-460.
- Verovnik R., B. Sket, and P. Trontelj. 2004. Phylogeography of subterranean and surface populations of water lice *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda). *Molecular Ecology* 13:1519-1532
- Villalobos, W., C. Godoy, and C. Rivera. 2004. Occurrence of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae), the vector of Huanglongbing, in Costa Rica. Pp. 509. *In*: M. E. Hilf. N. Duran-Vila and M. A. Rocha-Peña (eds.). Proceedings of the XVI Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Monterrey, México.
- Wang, N., L. Wenbin, M. Irey, G. Albrigo, Kong Bo, and Jeong-soon Kim. 2009. Citrus huanglongbing. *Tree and Forestry Science and Biotechnology* 3: 66-72.
- Wang, Z. 2002. Distribution and spread of citrus huanglongbing in citrus-planting region in Guizhou Province. *Cultivation and Planting* 4:62-63 (in Chinese).
- Weisgraber, K. H., R. J. Lousberg, and U. Weiss. 1971. The chemical basis of the color dimorphisms of an aphid, *Macrosiphum liriodendri* (Monell), and a locust, *Amblycorypha* sp. novel carotenoids. *Experientia* 27:1017-1018.
- Wenninger, E. J., L. L. Stelinski, and D. G. Hall. 2009. Relationships between adult abdominal color and reproductive potential in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *Annals of the Entomological Society of America* 102(3):476-483.
- Wenninger, E. J., and D. G. Hall. 2008. Daily and seasonal patterns in abdominal color in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *Annals of the Entomological Society of America* 101:585-592.
- Wenninger, E. J., and D. G. Hall. 2007. Daily timing of mating and age at Reproductive Maturity in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) *Florida Entomologist* 90(4):715-722.
- Westbrook, C. J., D. G. Hall, E. Stover, and Y. P. Duan. 2011. Colonization of *Citrus* and *Citrus*-related germplasm by *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *HortScience* 46:997-1005.
- White, I. M. and I. D. Hodkinson. 1985. Nymphal taxonomy and systematics of Psylloidea (Homoptera). *Bulletin of the British Museum (Natural History) Entomology* 50:153-301.
- White, T. C. R. 1970. The nymphal stage of *Cardiaspina densitexta* (Homoptera: Psyllidae) on leaves of *Eucalyptus fasciculosa*. *Australian Journal of Zoology* 18:273-293.

- White, T. C. R. 1969. An index to measure weather-induced stress of trees associated with outbreaks of psyllids in Australia. *Ecology* 50:905-909.
- Wilcox, D., B. Dove, D. Mc. David, and D. Greer. 2002. UTHSCSA Image Tool for Windows ver 3.0. The University of Texas Health Science Center in San Antonio, U.S.A.
- Wong, T. T. Y., and H. F. Madsen. 1967. Laboratory and field studies on the seasonal forms of pear psylla in northern California. *Journal of Economic Entomology* 60:163-168.
- Xie, P., C. Su, and Z. Lin. 1990. A study on the cold endurance of the Asian citrus psyllid in Zhejiang. Pp 18-22. *In*: B. Aubert, Ke Chung and C. Gonzales (eds.). Proceedings of the 2nd FAO-UNDP Regional Workshop Lipa Philippines Asian Pacific Citrus Greening.
- Xie, P., C. Su, and Z. Lin. 1988. A study on the cold endurance of the Asian citrus psyllid in Zhejiang. Pp 18-22. *In*: B. Aubert, Ke Chung and C. I. Gonzales (eds.). Proceedings of the 2nd FAO-UNDP Regional Workshop Lipa Philippines Asian/Pacific Citrus Greening.
- Xu, C. 1985. Investigation on citrus psylla, *Diaphorina citri* Kuwayama, and citrus huanglongbing in northern Fujian. *Fujian Agricultural Science and Technology* 4:42 (in Chinese).
- Xu, S., Z. Wang, and W. Zhang. 1994. Studies on the occurrence and control of citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama in Yunnan Province. *Zhejiang Citrus* 1:32-33 (in Chinese).
- Yang, C. T. 1984. Psyllidae of Taiwan. *Taiwan Museum Special Publication Series* 3:1-305.
- Yang, Y., M. Huang, G. Andrew, C. Beattie, Y. Xia, G. Ouyang, and J. Xiong. 2006. Distribution, biology, ecology and control of the psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama, a major pest of citrus: A status report for China. *International Journal of Pest Management* 52(4):343-352.
- Yang, M. M., J. H. Huang, and F. Li. 2004. A new record of *Cacopsylla* species (Hemiptera: Psyllidae) from pear orchards in Taiwan. *Formosan Entomologist* 24: 213-220.
- Yang, Y. 1989. Effects of light, temperature and humidity on the development, reproduction and survival of citrus psylla. *Acta Ecological Sinica* 9(4):348-354 (in Chinese with English abstract).
- Yasuda, K., F. Kawamura, and T. Oishi. 2005. Location and preference of adult Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) on Chinese box orange jasmine, *Murraya exotica* L. and flat lemon, *Citrus depressa*. *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology* 49:146-149.