

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



VARIACIÓN GENÉTICA DE *Bactericera cockerelli* (Sulc)  
(HEMIPTERA: TRIOZIDAE) EN LAS ZONAS PAPERAS DE  
MÉXICO

Por

MC. BEATRIZ LÓPEZ MONROY

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS con acentuación en  
MANEJO Y ADMINISTRACIÓN DE RECURSOS VEGETALES

Mayo, 2012

VARIACIÓN GENÉTICA DE *Bactericera cockerelli* (Sulc)  
(HEMIPTERA: TRIOZIDAE) EN LAS ZONAS PAPERAS DE  
MÉXICO

Por

**MC. Beatriz López Monroy**

Candidato a obtener el Grado de Doctor en Ciencias Biológicas con acentuación en  
Manejo y Administración de Recursos Vegetales

**Comité Doctoral**



---

**Dra. Adriana E. Flores Suárez**  
Director de Tesis



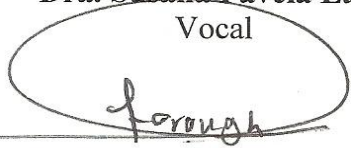
---

**Dr. Gustavo Ponce García**  
Secretario



---

**Dra. Susana Favela Lara**  
Vocal



---

**Dr. Rahim Foroughbakhch Pournavab**  
Vocal



---

**Dr. Marco Antonio Aylarado Vázquez**  
Vocal

## TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
<b>LISTA DE TABLAS.....</b>	i
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	ii
<b>GLORARIO.....</b>	iv
<b>NOMENCLATURA.....</b>	viii
<b>RESUMEN.....</b>	x
<b>ABSTRACT.....</b>	xi
<b>1.- INTRODUCCIÓN.....</b>	1
<b>2.- HIPÓTESIS.....</b>	3
<b>3.- OBJETIVO.....</b>	4
3.1.- General	4
3.2.- Particulares	4
<b>4.- ANTECEDENTES.....</b>	5
4.1.- Bionomía de <i>B. cockerelli</i> (Sulc) .....	5
4.2.- Importancia de <i>B. cockerelli</i> como plaga agrícola.....	6
4.3.- Variación genética en <i>B. cockerelli</i> .....	10
4.4.- Biotipo.....	11
4.5.- Marcadores moleculares en el estudio de la variación genética.....	13
4.5.1.- Marcadores proteicos y aloenzimas.....	13
4.5.2.- RFLP.....	14
4.5.3.- RAPD.....	14
4.5.4.- AFLP.....	15
4.5.5.- SSR.....	16
4.5.5.1.-ISSR.....	16
4.5.6.- Secuenciación de ADN.....	20
4.5.6.1. Uso de secuencias génicas de ADN mitocondrial en el estudio de la variación genética.....	20
4.6.- Componentes de la variación.....	22
4.6.1.- Diversidad genética.....	23
4.6.1.1.- Porcentaje de loci polimórfico (P).....	23
4.6.1.2.- Diversidad genética de Nei.....	23
4.6.1.3.- Índice de Shannon.....	24
4.6.2.- Diferenciación genética.....	25

4.6.2.1.- Coeficiente de diferenciación de Nei ( $G_{ST}$ )....	25
4.6.2.2.- Análisis Molecular de Varianza (AMOVA)...	26
4.6.2.3.- Migración (Nm).....	26
4.6.3.- Distancia genética.....	29
4.6.3.1.- Análisis de coordenadas principales.....	30
4.6.3.2.- Construcción de dendrogramas.....	30
4.7.- Implicaciones de la variación genética en insectos plaga.....	31
<b>5.- MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
5.1.- Área de estudio.....	33
5.2.- Muestreo de <i>Bactericera cockerelli</i> .....	35
5.3.- Caracterización molecular de <i>B. cockerelli</i> .....	36
5.3.1.-Extracción de ADN.....	36
5.3.2.- Amplificación de las regiones mitocondriales Citocromo oxidasa subunidad I (COI) y Citocromo b (CytB).....	37
5.3.2.1. Electroforesis, detección y procesamiento de los productos de PCR Citocromo oxidasa subunidad I (COI) y Citocromo b (CytB) de <i>B.</i> <i>cockerelli</i> .....	38
5.3.2.2. Alineamiento y análisis de secuencias Citocromo oxidasa subunidad I (COI) y Citocromo b (CytB) de <i>B. cockerelli</i> .....	39
5.3.3.-Amplificación con marcadores ISSR.....	40
5.3.3.1.- Electroforesis, detección y procesamiento de los productos de PCR con marcadores ISSR...	41
5.3.3.2.- Conteo de bandas.....	41
5.3.3.3. Medidas de variación genética.....	41
5.3.3.4. Medidas de distancia genética.....	42
5.3.3.5. Medidas de estructura genética.....	42
<b>6.- RESULTADOS .....</b>	<b>43</b>
6.1. Colecta de <i>B. cockerelli</i> .....	43
6.2. Caracterización molecular de <i>B. cockerelli</i> .....	43
6.2.1. Extracción de ADN a partir de <i>B. cockerelli</i> .....	43
6.2.2. Amplificación de COI en <i>B. cockerelli</i> .....	44
6.2.3. Alineamiento y análisis de las secuencias COI de <i>B.</i> <i>cockerelli</i> .....	44
6.2.4. Amplificación de CytB en <i>B. cockerelli</i> .....	46
6.2.5. Alineamiento y análisis de las secuencias CytB de <i>B.</i> <i>cockerelli</i> .....	46
6.2.6. Amplificación con marcadores ISSR.....	47
6.2.6.1. Variación genética.....	51
6.2.6.2. Distancia genética.....	52
6.2.6.3. Estructura genética.....	56

<b>7.- DISCUSIÓN.....</b>	<b>58</b>
<b>8.- CONCLUSIONES.....</b>	<b>66</b>
<b>9.- LITERATURA CITADA.....</b>	<b>67</b>
<b>APÉNDICE.....</b>	<b>75</b>
<b>RESUMEN BIOGRÁFICO.....</b>	<b>77</b>

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Coordenadas geográficas de los sitios de recolecta de <i>B. cockerelli</i> en México.....	34
2.	Características físicas de los sitios de recolecta.....	34
3.	Secuencias de marcadores ISSR (UBC) utilizados en el presente estudio.....	40
4.	Estimadores de diversidad genética para cada una de las 7 poblaciones de <i>B. cockerelli</i> de México a partir de datos ISSR.....	51
5.	Estimadores de diversidad genética para cada uno de los marcadores ISSR utilizados en 7 poblaciones de <i>B. cockerelli</i> en México.....	52
6.	Medidas de identidad y distancia genética de Nei (1972) entre par de poblaciones de <i>B. cockerelli</i> .....	54
7.	Comparación de los estimadores de diversidad genética para cada uno de los marcadores ISSR utilizados en los grupos de poblaciones de <i>B. cockerelli</i> .....	55
8.	Distancia geográfica (km) y genética (Nei, 1972) entre pares de poblaciones de <i>B. cockerelli</i> .....	56
9.	AMOVA basado en el análisis de marcadores ISSR a partir de siete poblaciones de <i>B. cockerelli</i> .....	57

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Huevos, ninfas y adulto de <i>B. cockerelli</i> .....	5
2. Amarillamiento causado por <i>B. cockerelli</i> en plantas de papa.....	8
3. Síntomas de la punta morada de la papa.....	9
4. Papas fritas con la enfermedad de papa rayada “zebra chip”.....	10
5. Dendrograma de poblaciones de <i>B. cockerelli</i> basado en marcadores genéticos (Liu et al. 2006).....	11
6. Esquema mostrando el alineamiento de los iniciadores ISSR no anclados con respecto a un ADN molde (Chia, 2009).....	17
7. Esquema mostrando el alineamiento de los iniciadores ISSR anclados con respecto a un ADN molde (Chia, 2009).....	18
8. PCR utilizando marcadores ISSR.....	19
9. Áreas de recolecta de <i>B. cockerelli</i> .....	33
10. Colecta de ninfas y adultos <i>B. cockerelli</i> en cultivo de papa.....	36
11. Extracción de ADN de <i>B. cockerelli</i> y preparación de reacciones para PCR.....	37
12. Electroforesis en gel de agarosa con muestras de <i>B. cockerelli</i> .....	37
13. Ninfa de <i>B. cockerelli</i> en hoja de chile completando su desarrollo en insectario.....	43
14. Adulto de <i>B. cockerelli</i> .....	43
15. Gel de agarosa 1.4% (1-7) mostrando la extracción de ADN de <i>B. cockerelli</i> .....	44
16. Gel de agarosa 1.4% mostrando los productos de amplificación por PCR de la región mitocondrial citocromo oxidasa subunidad I (COI) en <i>B. cockerelli</i> . .....	44

17.	Árbol consenso Neighbor Joining para <i>B. cockerelli</i> a partir de secuencias COI.....	45
18.	Gel de agarosa 1.4% mostrando los productos de amplificación por PCR de la región mitocondrial citocromo b (CytB) en <i>B. cockerelli</i> .....	46
19.	Árbol consenso Neighbor Joining para <i>B. cockerelli</i> a partir de secuencias CytB.....	47
20.	Gel de agarosa 2% mostrando los productos de amplificación por PCR con el marcador UBC-818 en <i>B. cockerelli</i> .....	48
21.	Gel de agarosa 2% mostrando los productos de amplificación por PCR con el marcador UBC-829 en <i>B. cockerelli</i> .....	49
22.	Gel de agarosa 2% mostrando los productos de amplificación por PCR con el marcador UBC-841 en <i>B. cockerelli</i> . ....	49
23.	Gel de agarosa 2% mostrando los productos de amplificación por PCR con el marcador UBC-847 en <i>B. cockerelli</i> .....	50
24.	Gel de agarosa 2% mostrando los productos de amplificación por PCR con el marcador UBC-847 en <i>B. cockerelli</i> .....	50
25.	Gráfico de coordenadas principales basado en la distancia de pares derivado del análisis de marcadores ISSR en siete poblaciones de <i>B. cockerelli</i> .....	53
26.	Dendrograma UPGMA basado en la distancia genética de Nei (1972) de poblaciones de <i>B. cockerelli</i> derivado del análisis de marcadores ISSR (Modificado del procedimiento NEIGHBOR de PHYLIP Versión 3.5)...	54
27.	Prueba de Mantel para evaluar el aislamiento por distancia entre cada par de poblaciones de <i>B. cockerelli</i> de México, obtenida a partir de las distancias genéticas de Nei (1972) y las distancias geográficas.....	57



## GLOSARIO

**Aloenzima o isozima:** Proteínas con diferente estructura pero que catalizan la misma reacción

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

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

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

**Biotipo:** Población con alguna diferenciación genética o fenotípica con respecto a otra población, la cual está en el mismo rango polimórfico de lo que taxonómicamente se define como especie.

**Ciclos touchdown:** Se basa en la utilización de una temperatura de hibridación decreciente 1°C en cada ciclo hasta alcanzar una temperatura que se mantiene los últimos ciclos.

**Clado:** Un grupo monofilético en un cladograma.

**Clorótica:** Plantas en condición fisiológica anormal en la que follaje produce insuficiente clorofila.

**Dendograma:** Cualquier diagrama semejante a un árbol.

**Ecomorfos:** Grupo o población local cuya apariencia está determinada por factores ecológicos.

**Equilibrio de Hardy-Weinberg:** En una gran población con apareamiento al azar. El H-W equilibrio se producirá después de una generación, siempre que las mismas frecuencias génicas ocurren en ambos sexos. El equilibrio de Hardy-Weinberg implica que las frecuencias génicas y el genotipo son constantes de generación tras generación. Si se produce un desequilibrio, el equilibrio se restablecerá después de una generación de apareamiento al azar. El equilibrio H-W también implica que cuando las frecuencias génicas son  $p$  y  $q$ , los genotipos, respectivamente, las frecuencias serán  $p^2$ ,  $2pq$  y  $q^2$  para los dominantes, los heterocigotos y los recesivos en un sistema con dos alelos.

**Fenética:** (=sistemática fenética, taxonomía numérica) Procede de Sokal y Sneath (1963); Sneath y Sokal (1973). Surgió por oposición al evolucionismo y se considera un método libre de cualquier teoría. Se fundamenta en una evaluación del parecido global de los organismos.

**Fenocopias:** Individuo o grupo de individuos de una población que, careciendo de un genotipo dado posee el mismo fenotipo que aquél que si posee dicho genotipo. Esto es, que expresa un carácter independientemente de su dotación de genes debido a la injerencia de un factor del medio ambiente y que dicha expresión es compartida por otro tipo de individuos en los cuales el origen es endógeno.

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

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

**Filograma:** Un árbol que muestra relaciones genealógicas entre organismos. Difiere del cladograma en que las ramas se dibujan proporcionales a la cantidad de cambio evolutivo. Es propio del evolucionismo. También se le llama dendrograma tipológico.

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

**Flujo genético:** Proporción de nuevos genes inmigrantes moviéndose dentro de una población

**Grupo externo (*outgroup*):** Es cualquier grupo usado en el análisis que no es incluido en el taxón bajo estudio. Se utiliza para fines comparativos y debe ser lo más cercano posible al grupo interno, preferentemente su grupo hermano.

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

**Interpoblacional:** Entre poblaciones.

**Intrapoblacional:** Dentro de una población.

**Loci:** Plural de locus.

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

**Marcador Codominante:** Pueden observarse los genotipos de las clases genotípicas (dos homocigotos y el heterocigoto).

**Marcador Dominante:** Pueden observarse sólo dos clases genotípicas: AA + Aa y aa; es decir, una de las clases homocigóticas se confunde con el heterocigoto.

**Marcador molecular:** Biomoléculas pueden ser relacionadas con un rasgo genético

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

**Microsatélite:** Secuencia corta de ADN, generalmente de 1 a 4 pares de bases (una unidad de ADN), que se repiten juntas en una fila a lo largo de la molécula de ADN.

**Mutación:** Cualquier cambio en la secuencia de nucleótidos del ADN.

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

**Población panmíctica:** Cuando los individuos de la población aparean totalmente al azar y las frecuencias genotípicas se pueden calcular a partir de las gaméticas.

**Politomía:** un nodo sin bifurcación en un cladograma (tritomía, tetratomía, etc.). Se les llaman también "nodos sin resolver".

## NOMENCLATURA

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
AMOVA	Análisis Molecular de Varianza
ATP sintasa	Adenosina Trifosfato sintasa
bp	Pares de bases
COI	Citocromo oxidasa subunidad I
CytB	Citocromo B
DE	Desviación Estándar
EICA	Evolution of Increased Competitive Ability
EUA	Estados Unidos de América
Fst	Índice de fijación de Wright
g	Gramos
Gst	Coefficiente de diferenciación
H	Diversidad de Nei
I	Índice de Shannon
ISSR	Inter Simple Sequence Repeats
ITS2	Internal Transcribed Spacer 2
kb	Kilobases
km	Kilómetros
L	Litro
M	Concentración Molar
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mtADN	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
N	Concentración Normal
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleótida
nADN	Ácido desoxirribonucleico nuclear
ng	Nanogramos
ng/ul	Nanogramos por microlitro

Nm	Flujo genético
OTU's	Operational Taxonomic Units
P	Loci Polimórfico
PCA	Análisis de Componentes Principales
PCO	Coordenadas Principales
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PMP	Punta Morada de la Papa
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
seg	Segundos
SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
spp	Especies
SSR	Simple Sequences Repeat
tARNs	Ácido ribonucleico de transferencia
UBC	University British Columbia
uL	Microlitro
uM	Micromolar
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic averages
v/v	Volumen sobre volumen
wsp	<i>Wolbachia</i> surface protein

## RESUMEN

*Bactericera cockerelli* (Sulc) ha sido considerado una plaga primaria en México y Estados Unidos, en cultivos de Solanáceas desde 1970. Sin embargo, a partir del 2001 comienzan brotes subsecuentes de relevante importancia en zonas donde infestaciones de este insecto eran históricamente raras. Estudios moleculares revelaron que esto se debía al desarrollo de un nuevo biotipo de *B. cockerelli* adaptado a dichas zonas, demostrándose posteriormente que esta diferenciación genética se ve reflejada en la supervivencia, ciclo de desarrollo, fecundidad e índice de crecimiento tanto del biotipo nativo como el recién reportado. Es por ello que el objetivo del presente estudio se centró en identificar diferencias genéticas entre poblaciones de *B. cockerelli* provenientes de Sinaloa, Nuevo León Guanajuato, Michoacán, Edo. de México, Morelos y Oaxaca mediante el análisis de fragmentos de los genes mitocondriales citocromo oxidasa I (COI) y citocromo B (CytB), así como marcadores moleculares ISSR.

De acuerdo con las comparaciones de COI solo se encontró una variación del 0.8% en fragmentos de 501 pb de longitud. Mientras que el 1.2% de variación se encontró en los fragmentos analizados de CytB, los cuales tuvieron una longitud de 1028 pb. Sin embargo, tales resultados no fueron suficientes para inferir las relaciones genéticas entre las poblaciones de estudio con este tipo de marcadores.

Por otro lado y basados en los análisis de marcadores ISSR, los resultados muestran que poblaciones de *B. cockerelli* del centro y noreste de México (Guanajuato, Morelos, Edo. de México y Nuevo León) son más similares genéticamente, mientras que *B. cockerelli* del noroeste, suroeste y sureste del país (Sinaloa, Michoacán y Oaxaca) son distintas genéticamente entre sí y con respecto al resto de las poblaciones incluidas en el estudio evidenciando el posible resurgimiento de biotipos distintos a los ya reportados en México en estas regiones del país.

## ABSTRACT

*Bactericera cockerelli* (Sulc) has been considered the primary pest in Mexico and the United States, in Solanaceae crops, since 1970. However, subsequently since 2001 significant outbreaks of outstanding importance were observed in areas where infestations of this insect were historically rare. Molecular studies revealed that this was due to the development of a new biotype of *B. cockerelli* that had become adapted to these areas, further demonstrating that this genetic differentiation was reflected in the survival, development cycle, fertility and growth rate of both the native biotype as well as the one recently reported. To determine whether the populations of *B. cockerelli* from different geographic regions of Mexico are different biotypes, mitochondrial genes cytochrome oxidase I (COI), cytochrome B (cytB), as well as inter simple sequence repeat (ISSR) markers were used in this study to molecularly characterize the different populations of this insect. According to COI comparisons we found 0.8% variation in the 501 bp-long COI fragments. While 1.2% of variation was found in the 1028 bp-long CytB fragments. However, such results were not sufficient to infer the genetic relationships among the study populations with these markers.

Based on ISSR markers, the populations of *B. cockerelli* in central and northeastern Mexico (Guanajuato, Morelos Edo. of Mexico and Texas) show greater genetic similarity, while *B. cockerelli* found in the northwest, southwest and southeast of the country (Sinaloa, Michoacan and Oaxaca) are genetically distinct from each other and from the rest of the populations included in the study. The ISSR data, therefore, indicate the development of new psyllid biotypes of *B. cockerelli*, other than those already reported in Mexico.



## 1. INTRODUCCIÓN

En México el cultivo de papa *Solanum tuberosum* L., es considerado uno de los más importantes debido a la derrama económica que genera, ya que representa el 1% del Producto Interno Bruto Total y el 2.6% del Producto Agropecuario del país (Parga *et al.* 2011). Sin embargo, el cultivo de este tubérculo se enfrenta a una serie de problemas que merman su producción. Uno de los principales problemas fitopatológicos es el síndrome de punta morada de la papa, el cual es ocasionado por fitoplasmas (Maramorosh, 1988) que son transmitidos por el insecto *Bactericera cockerelli* (Sulc) (Hemiptera:Triozidae). A quien recientemente se le ha asociado como vector de una bacteria del genero *Candidatus Liberibacter psyllaurous*, la cual se relaciona con los síntomas de la enfermedad conocida como “Zebra Chip” en Estados Unidos de América (Hansen *et al.* 2008). Los síntomas característicos de esta enfermedad son el manchado interno de los tubérculos en forma de estrías, el cual se intensifica después de freírlos (Rubio *et al.* 2011), haciéndolos poco atractivos para su comercialización. Actualmente tanto el vector como los patógenos asociados a los síndromes de punta morada de la papa y “zebra chip” se encuentran en México, principalmente en Estados del Noreste (Parga *et al.* 2011; Rubio *et al.* 2011) y en valles y sierras del eje neo volcánico en donde se presentan altas incidencias y son una amenaza a la producción nacional de este cultivo (Díaz *et al.* 2010).

*B. cockerelli* es un insecto migratorio, siendo la temperatura un factor crítico en los brotes y rangos de distribución del mismo. Cada año, las altas temperaturas del verano en Arizona y Nuevo México y las frías temperaturas de invierno en el centro de Norteamérica previenen la supervivencia de este insecto, por lo que las poblaciones requieren re-establecer su rango nativo en el sur de Texas y Noreste de México. En México y Centro América, no pueden sobrevivir las altas temperaturas del verano por lo que migran al norte hacia las grandes planicies y los corredores de la costa oeste, al incrementarse la temperatura y disminuirse las solanáceas locales y hospederas de primavera, donde su dispersión es facilitada por el viento, que le permite ser transportado grandes distancias.

Relativamente, poca información estaba disponible sobre los patrones de movimiento de esta plaga dentro de Norte América, hasta que Liu *et al.* (2006)

examinaron colecciones de insectos provenientes del oeste de Estados Unidos y México usando marcadores moleculares (COI, ITS2, ISSR) elucidando con base en sus resultados que un nuevo biotipo del psílido pudo haber emergido ahí en campos de tomate y chile. Con ello, demostraron que los brotes en la parte oeste de Estados Unidos de América, zonas donde históricamente estas infestaciones son raras, corresponden a un nuevo biotipo, el cual tiene sus orígenes en Baja California, México. Dicho trabajo confirma también las migraciones de *B. cockerelli*, al agruparse las poblaciones del este de México y centro de EUA.

La repercusión de esta variación genética radica en que la historia de vida, preferencia de hospederos, la habilidad en la transmisión de patógenos, entre otros puede cambiar. Ante este respecto Liu y Trumble (2007) basados en la variación genética de ambos biotipos reportaron que existen diferencias en la biología tanto del biotipo nativo como del recientemente reportado.

Sin embargo, a la fecha no existen reportes de las relaciones genéticas existentes entre las poblaciones de *B. cockerelli* del norte, centro y sur de México. De ahí la importancia de evaluar diferencias genéticas potenciales entre poblaciones de *B. cockerelli* provenientes de diferentes regiones geográficas de México a través del análisis de secuencias génicas de regiones mitocondriales y marcadores ISSR, buscando con ello, proveer información sobre el movimiento y las relaciones genéticas entre las poblaciones de este insecto en México, presentando evidencia de la presencia de biotipos distintos a los ya reportados en México y Estados Unidos.

## **2. HIPÓTESIS**

Las poblaciones de *B. cockerelli* en las zonas paperas ubicadas en diferentes regiones geográficas de México, exhiben diferencias genéticas significativas para considerarlas como nuevos biotipos.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. GENERAL**

Identificar las diferencias genéticas entre poblaciones de *B. cockerelli* de diferentes regiones geográficas en México mediante el análisis de fragmentos de los genes mitocondriales citocromo oxidasa I (COI) y citocromo B (CytB), así como marcadores moleculares ISSR.

#### **3.2. PARTICULARES**

1. Comparar genéticamente las poblaciones *B. cockerelli* de México con los biotipos ya reportados y las secuencias depositadas en GenBank de la misma especie, mediante el análisis de secuencias de COI y CytB.

2. Estimar los índices de variación genética en poblaciones de *B. cockerelli* proveniente de diferentes zonas geográficas de México mediante el uso de marcadores ISSR.

3. Evaluar la variación genética entre las poblaciones de *B. cockerelli* proveniente de diferentes regiones geográficas en México.

4. Inferir las relaciones genéticas entre las poblaciones de *B. cockerelli* de México, mediante los marcadores ISSR.

## 4.- ANTECEDENTES

### 4.1. Bionomía de *B. cockerelli* (Sulc)

El psílido de la papa es un insecto migratorio que no sobrevive a los inviernos en las Grandes Llanuras de los Estados Unidos sin refugio artificial, particularmente los Altos Llanos ubicados en Nebraska, Colorado, Kansas y Dakota del Sur. La temperatura es un factor crítico en brotes de este insecto pues no toleran altas temperaturas, prefiriendo 26°C. Se ha mostrado alta mortalidad en huevos y ninfas a una exposición continua por 2 horas a 38°C, mientras que temperaturas mayores a 30°C reducirán o cesarán la ovoposición, incubación y supervivencia de ninfa (Abdullah, 2008). En el sur de México y Centroamérica, no puede sobrevivir a temperaturas de verano por lo que migra al norte por los Grandes Llanos y la costa occidental. Es capaz de sobrevivir un año al sur de Texas y Norte de México donde las temperaturas son óptimas y el alimento está disponible continuamente. El hábito característico, sin embargo, ha sido la migración hacia el norte durante la primavera y el verano, y su dispersión es facilitada enormemente por el viento que le permite ser llevado a grandes distancias (Abernathy, 1991; Knowlton and Janes, 1931).

El ciclo de desarrollo de *B. cockerelli* consiste en tres etapas: huevo, ninfa y adulto. De acuerdo con Abdullah (2008), el período de pre-cópula de *B. cockerelli* varía de 3.8 - 5 días, el período de pre-ovoposición va desde 5.9 a 8.0 días. El período de incubación para la etapa de huevo es de 6.7 días (5.7 - 8.2 días), con un período ninfal de 21.9 (19.1 - 23.8 días) teniendo un período total de desarrollo en promedio de 28 días. La supervivencia de huevos, ninfa y el total (todas las etapas) es de 62.7, 47.3 y el 40.6 %, respectivamente. El ciclo de vida completo a 26 °C requiere 35 días. En lo que respecta a la fecundidad, la hembra puede poner 230 huevos, viviendo la hembra un promedio de 45 días, mientras que el macho solo 22 días (Abdullah, 2008).



Fuente: [http://ceventura.ucdavis.edu/Vegetable\\_Crops/Tomato\\_Psyllid.htm](http://ceventura.ucdavis.edu/Vegetable_Crops/Tomato_Psyllid.htm)

**Figura 1.** Huevos, ninfas y adulto de *B. cockerelli*

La etapa adulta de *B. cockerelli* es parecida a una chicharrita y mide aproximadamente 3 mm de largo y mantienen sus alas en forma de techo sobre su cuerpo. Poseen una coloración verde los dos primeros días para posteriormente cambiar a una tonalidad negra con marcas color blanco, una franja paralela sobre el primer segmento abdominal y otra marca en forma de “Y” invertida cerca de la orilla del abdomen. El fémur de las patas posteriores se encuentra agrandado lo que les permite saltar al ser molestados. En general son muy activos por lo que se les conoce también como pulgón saltador (Mena, 2004).

Los huevos son de color amarillo-naranja de forma ovoide que se encuentran suspendidos individualmente de filamentos delgados por lo regular a lo largo de los márgenes de la hoja apareciendo al final de tallos cortos (Mena, 2004).

Las ninfas, además del adulto son la forma perjudicial de este insecto. Son diminutas de color café claro cambiando posteriormente a verde pálido a medida que crecen, son planas, oblongas o redondas. Pasa por cinco estadios ninfales y pueden encontrarse en el envés de las hojas (Mena, 2004).

#### **4.2. Importancia de *B. cockerelli* como plaga agrícola**

El psílido de la papa, *B. cockerelli* (Hemiptera: Triozidae) también conocida como *Paratrioza cockerelli* Sulc. (Arslan *et al.* 1985), pertenece a la superfamilia Psylloidea que junto con las familias Cicadellidea y Fulgoridea, se han descrito como vectores de procariotas (Garzón *et al.* 2009).

En los Estados Unidos de Norteamérica, el psílido de la papa fue colectado por primera vez en Colorado por T. D. Cockerell y descrito por Sulc en 1909. Subsecuentemente fue nombrado *Trioza cockerelli*, posteriormente, en 1911 asignado al género *Paratrioza* por Crawford y recientemente reasignado al género *Bactericera* encontrándose como una de las principales plagas en EUA (Abdullah, 2008). infestando papa, chile y tomate en Arizona, California, Idaho, Kansas, Nevada, Nuevo México, Carolina del Norte, Oklahoma, Dakota del Sur, Texas, Utah y Wyoming (Blood *et al.* 1933; Carter, 1950; Pletsch, 1947). Sin embargo, este insecto posee un amplio rango de plantas hospederas incluyendo especies vegetales en 20 familias prefiriendo principalmente especies de solanáceas (Abdullah, 2008).

El primer brote del psílido de la papa se registró en California en 1940 y el segundo fue reportado en el medio este de los Estados Unidos en 1970. Hasta el 2001 no se habían reportado brotes de relevante importancia, sin embargo, es a partir de este

año que comienzan a darse una serie de brotes subsecuentes en papa y tomate (Al-Jabar, 1999; López *et al.* 2002; Hamm *et al.* 2003; Liu y Trumble, 2004 y 2005) incluyendo casos en Canadá (Ferguson y Shipp, 2002).

En el 2006 *B. cockerelli* represento un serio problema en cultivos de papa de Guatemala y Honduras donde fue asociado con la decoloración y daño de tubérculos (Abdullah, 2008).

En México se documentó la presencia de *B. cockerelli* en 1947, con efecto en solanáceas en Durango, Estado de México, Guanajuato, Michoacán y Tamaulipas (Plesch, 1947). A partir de 1970 esta especie se considera una plaga primaria de la papa *Solanum tuberosum* L., chile *Capsicum* spp. y tomate *Lycopersicon esculentum* Mill. (Garzón *et al.*, 1992; Garzón, 2003). En el Estado de Guanajuato *B. cockerelli* mermó 60% de la producción de tomate en 1990. En los años siguientes la superficie cultivada se redujo 85% (Garzón, 2003). En San Luis Potosí, se ha comportado como plaga primaria de los cultivos de chile y tomate donde los daños se han calculado en un 65% (Díaz *et al.*, 2005). A finales de los 90's en el noreste de México, se reportaron pérdidas del 35% en la calidad del producto, destinado tanto al mercado fresco como a la industria por el manchado interno del tubérculo debido al síndrome de la punta morada (Rubio *et al.* 2011).

Uno de los daños que este insecto caEUA a las plantas es provocado al succionar la savia de la planta y la subsecuente producción de toxinas dentro de la misma (Munyanza *et al.*, 2007), sin embargo, esa “toxina” nunca ha sido aislada y el desorden metabólico pudiera ser debido a la posible presencia de metabolitos producidos por las ninfas del insecto e introducidos por éste al momento de alimentarse (Richards y Blood, 1933; Rubio *et al.* 2006). Dicha enfermedad es reportada como amarillamiento del psílido “psyllid yellows” (Figura 2). La saliva del insecto contiene peroxidadas,  $\beta$ -glucosidasas, y otras enzimas potenciales que generan una señal (Miles, 1999) que parece inducir la transcripción de genes asociados con la producción de ácido salicílico o jasmónico, (Millas, 1999) así como la transcripción de genes relacionados con el estrés (Moran y Thompson, 2001). El grado del daño depende de la cantidad de toxina, relacionada con la infestación del insecto y la etapa de crecimiento de la planta. Estudios previos revelan que al menos 30 ninfas del psílido por planta pueden caEUArle los síntomas (Blood *et al.* 1933), mientras que Carter (1950) indica que los síntomas pueden ocurrir sobre plantas alimentadas de una sola ninfa. Los síntomas tóxicos aparecen al cabo de cuatro a seis días después de la inyección en una infestación alta

pero por lo general esto toma de dos a tres semanas. Cuando la planta es joven, aun en crecimiento, esta será atrofiada y clorótica. Los entrenudos serán más cortos caUsando un aspecto de roseta, mientras que los nudos espesarán. En ocasiones, tubérculos aéreos aparecerán en nodos. Los efectos fitotóxicos del insecto sobre el floema varían debido a la poca difusión de la toxina y la destrucción localizada de la clorofila, provocando malformaciones de tejido como el rizar de la hoja (Chapman, 1985). Sin embargo, el daño caEUAdo por este psílido es uno de los pocos casos donde los efectos tóxicos son sistémicos y la planta entera es afectada (Carter, 1939).



Fuente: [www.sciencedaily.com](http://www.sciencedaily.com) (Crédito: A. Hansen, UC Orilla)

**Figura 2.** Amarillamiento caEUAdo por *B. cockerelli* en plantas de papa.

\* La sustancia blanca que se observa es excretada por el insecto.

Además se ha relacionado a *B. cockerelli* con dos enfermedades denominadas, permanente del tomate (Garzón, 1984; Becerra, 1986) y punta morada de la papa (PMP) (Salas, 2006) cuyos síntomas se observaron en México desde 1948 y en los últimos 10 años se ha visto un incremento acelerado de la enfermedad, especialmente en la región centro del país (Cadena *et al.* 2003), donde los tubérculos infectados pierden valor en el mercado por la necrosis interna y baja calidad industrial, imposibilitando la comercialización para consumo en fresco así como su uso en semilla. Dichos síntomas se caracterizan por una disminución del tamaño de la planta, abultamiento del tallo en los lugares de inserción de las hojas, formación de tubérculos aéreos y una decoloración en las hojas superiores, las cuales tienden a tornarse moradas en algunas variedades (Figura 3). Los tubérculos provenientes de plantas con síntomas de PMP desarrollan un pardeamiento interno y generalmente no brotan, o si lo hacen, sus brotes son muy delgados o ahilados (Rubio *et al.* 2006). Los haces vasculares presentan ataque por hongos de tipo *FEUArum*, entre otros y ocasionan el bloqueo de la savia (floema) entre planta y tubérculos, deteniendo así el crecimiento. Se ha demostrado que los síntomas descritos previamente pueden estar asociados con la presencia de fitoplasmas (Almeyda



*et al.* 1999; Maramorosch, 1998; Cadena *et al.* 2003). El uso de técnicas moleculares para el estudio de fitoplasmas ha permitido distinguir siete diferentes tipos de fitoplasmas asociados con la punta morada de la papa en Estados Unidos de América, Japón y Malasia, mientras que en México se han detectado al menos dos tipos de fitoplasmas relacionados con dicha enfermedad (Rubio *et al.* 2011). Almeyda *et al.* (2001) indican que *B. cockerelli* colectado en cultivos de tomate del Edo. de Morelos que presentaban síntomas de permanente del tomate resultó positivo a un fitoplasma del grupo I, el cual es considerado uno de los agentes caEUales de la punta morada de la papa. En Coahuila y Nuevo León se encontró que son dos los fitoplasmas implicados como agentes etiológicos en el síndrome de punta morada y que es *B. cockerelli* quien incuba y transmite principalmente dichos patógenos en estos estados (Almeyda *et al.* 2008). Recientemente se ha documentado una nueva enfermedad en papa asociada a *B. cockerelli* denominada “zebra chip”, “papa manchada” o “papa rayada”, registrada al sureste de los EUA, México y Centro América cuyos síntomas son similares a la enfermedad de punta morada de la papa (Rubio *et al.* 2011) además del desarrollo de líneas semejantes a las de una cebra en el tubérculo al freírse (Figura 4). Esto no tiene consecuencias en la salud humana, sin embargo, papas con la enfermedad se vuelven poco atractivas bajando drásticamente su comercialización (Munyanza *et al.* 2007). Esta enfermedad se ha encontrado en Nueva Zelanda (Liefting *et al.* 2008) en el suroeste y noroeste de Estados Unidos, México y Centro América causando pérdidas de millones de dólares (Munyanza *et al.* 2007, 2008; Secor *et al.* 2009). Tal enfermedad ha sido relacionada en Estados Unidos con una bacteria denominada *Candidatus Liberibacter psyllae* siendo *B. cockerelli* vector de la misma (Hansen *et al.* 2008).



Fuente: [www.todopapa.com](http://www.todopapa.com).

**Figura 3.** Síntomas de la punta morada de la papa



Fuente: [www.ars.usda.gov](http://www.ars.usda.gov)

**Figura 4.** Papas fritas con la enfermedad de papa rayada “zebra chip”

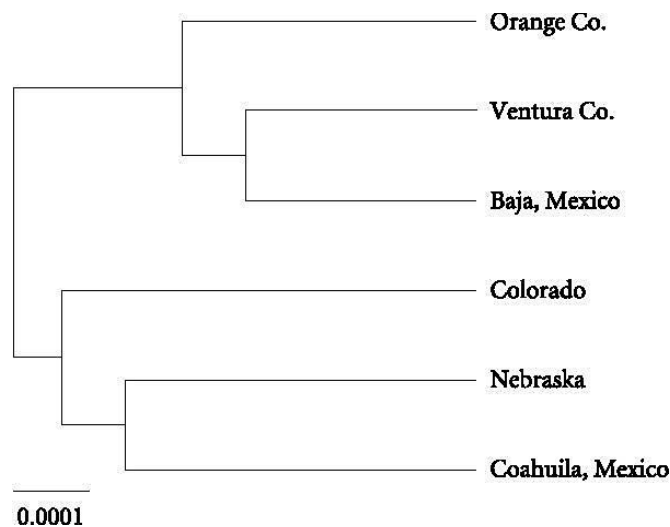
### 4.3. Variación genética en *B. cockerelli*

Romney (1939) indicó que este insecto desarrolló grandes poblaciones con migraciones primaverales en el sur de Arizona de Enero a Mayo sobre plantas silvestres del género *Lycium*. Típicamente, *B. cockerelli* luego migró a Colorado, Nebraska y otros estados del norte. Pletsch (1947) después indicó que el origen anual de las poblaciones ocurrió mucho más lejos y migraron del sur de Texas (cerca del Río Grande) o incluso de México que posteriormente migraron a Arizona y Nuevo México. Sin embargo, a partir del 2001 comienzan a presentarse brotes al sur de California, zonas donde infestaciones de este insecto son históricamente raras. Se plantean dos hipótesis para el origen de estos: 1) que las poblaciones a lo largo de la costa oeste de Norte América pudieron haberse originado en Baja California, México (posiblemente por movimientos de trasplantes de México) o 2) de mucho más lejos, al este cercano al sur de Texas.

Estos antecedentes llevaron a investigaciones que tenían por finalidad el determinar si estos nuevos brotes eran el resultado de un simple rango de expansión en su distribución o la evolución de un nuevo biotipo de *B. cockerelli*. Esto fue posible utilizando secuencias repetidas de marcadores (ISSR) así como las secuencias del gen mitocondrial citocromo oxidasa I (COI), un espaciador interno transcrito (ITS2) y del gen *wsp* (Liu *et al.* 2006) el cual codifica para una proteína de superficie que ha sido utilizado en la caracterización de diferentes líneas del endosimbionte *Wolbachia*, (Van Meer *et al.* 1999) cuyo árbol filogenético derivado de ADN ribosomal 16S-23S concuerda con el filograma derivado del hospedero *B. cockerelli*, demostrando una co-especiación de los endosimbiontes con sus hospederos (Thao *et al.* 2001). Para ello se estudiaron poblaciones de *B. cockerelli* provenientes de California, Colorado y

Nebraska, EUA, así como Baja California y Coahuila, México. Encontrando que las poblaciones de estudio se encuentran divididas en dos grupos (Figura 5), uno formado por las poblaciones del centro de Estados Unidos y este de México y el otro formado por el oeste de Norte América. Con ello, corroboraron su hipótesis inicial que establecía que los nuevos brotes en la parte oeste de Estados Unidos de América corresponden a un nuevo biotipo el cual tiene sus orígenes en Baja California, México. Dicho trabajo confirma también las migraciones de *B. cockerelli*, al agruparse las poblaciones del este de México y centro de EUA.

En un estudio posterior Jackson *et al.* (2009) demostraron mediante el uso de marcadores ISSR la cercanía genética entre *B. cockerelli* de Coahuila, México y Texas, EUA, evidenciando con ello las migraciones que este insecto realiza al norte entrada la primavera, así como las diferencias genéticas estadísticamente significativas entre dichas poblaciones y *B. cockerelli* de Guatemala.



**Figura 5.** Dendrograma de poblaciones de *B. cockerelli* basado en marcadores genéticos (Liu *et al.* 2006)

#### 4.4. Biotipo

En el estudio de poblaciones que presentan un proceso de especiación, se pueden encontrar una gran variedad de términos utilizados por diferentes autores, uno de ellos es el término biotipo. De acuerdo con Drés y Mallet, (2002) el término biotipo

se refiere a una población con alguna diferenciación genética o fenotípica con respecto a otra población, la cual está en el mismo rango polimórfico de lo que taxonómicamente se define como especie. Los autores encuentran que esta diferenciación genética implica la diferenciación en genes de uno o dos marcadores moleculares y no es tan evidente si se compara con la diferenciación genética en las razas hospederas, las cuales se diferencian en una gran cantidad de genes nucleares y mitocondriales. Además los autores aclaran que la asociación a hospedero no es tan específica ya que la población, que se encuentra en el proceso de diferenciación genética, puede tener más de un hospedero y a su vez, los biotipos no presentan un aislamiento reproductivo tan marcado como las razas asociadas a hospederos (Salinas, 2010). Adicionalmente, Diehl y Bush (1984) definieron cinco categorías en las que un biotipo puede ser clasificado: fenocopias o ecomorfos no genéticos (cuando el mismo genotipo produce fenotipos diferentes bajo diferentes condiciones ambientales), polimorfismos genéticos (fenotipos discontinuos entre individuos con entrecruzamiento libre y que son el resultado de la variación alélica de una frecuencia más alta que no puede ser mantenida por mutación recurrente), razas geográficas (organismos similares en morfología, ecología o comportamiento los cuales comparten el mismo hábitat pero se encuentran en diferentes localidades), razas hospederas (población de especies que reproductivamente, están parcialmente aisladas de otras poblaciones como consecuencia de la adaptación a un hospedero específico) y especies. Los organismos pueden ser clasificados en alguno de estos grupos, debido a que se encuentran en diferentes estados de divergencia evolutiva (Diehl y Bush 1984),

Dentro de los biotipos se pueden encontrar diferencias a nivel molecular que generan haplotipos (Lewter *et al.* 2006, Nagoshi *et al.* 2007 a y b). Un “haplotipo” es definido básicamente como una única forma genética que difiere de cualquier otra forma por variaciones en las posiciones individuales (al menos en un nucleótido) en una secuencia de ADN (Templeton 2006).

Aunque se puedan encontrar diferencias a nivel fisiológico o reproductivo dentro de los biotipos, las similitudes en características a nivel morfológico hacen imposible su separación. Sin embargo, los biotipos difieren en varias características a nivel molecular que permiten su diferenciación de manera rápida y efectiva. Dentro de estas características, se pueden incluir las variaciones en aloenzimas electroforéticas, en particular las esterasas, polimorfismos de ADN mitocondrial, RFLP's, AFLP's, así como las diferencias en las secuencias de ADN repetitivo (Salinas, 2010).

#### **4.5. Marcadores moleculares en el estudio de la variación genética**

El análisis de la diversidad genética y relaciones entre y dentro de diferentes poblaciones, especies e individuos representa una tarea central en muchas disciplinas de las ciencias biológicas en las últimas tres décadas y las estrategias clásicas para la evaluación de la variabilidad genética como son: la anatomía comparada, morfología, embriología y fisiología han sido fuertemente complementadas por las técnicas moleculares (Weising *et al.* 2005). En donde los marcadores moleculares resultan una herramienta al describir y estimar la variación genética.

Los marcadores moleculares son biomoléculas como proteínas (antígenos e isozimas) y el ADN (genes conocidos o fragmentos de secuencia y función desconocida) que se pueden relacionar con un rasgo genético (Weising *et al.* 2005). Hoy en día representan una herramienta necesaria en muchos campos de la biología como evolución, ecología, biomedicina, ciencias forenses y estudios de diversidad, existiendo diferentes técnicas moleculares que nos permiten conocer cómo se encuentran las proporciones de genes en las poblaciones naturales de manera indirecta (Eguiarte *et al.* 2007). Las propiedades que generalmente deben cubrir dichos marcadores son las siguientes: moderado o altamente polimórfico, de herencia codominante (es decir que nos permita discriminar de homo y heterocigotos en organismos diploides), asignación inequívoca de alelos, ocurrencia frecuente dentro del genoma, distribución en todas partes del genoma, comportamiento selectivamente neutral, acceso fácil, ensayos fáciles y rápidos, alta reproducibilidad, intercambio de datos fácil entre laboratorios, bajo costo tanto para el desarrollo de los marcadores como para los ensayos (Weising *et al.* 2005). Sin embargo, un solo tipo de marcador no reúne todos estos criterios por lo que se puede elegir entre los diferentes tipos o una combinación de ellos dependiendo del objetivo del estudio. A continuación se presenta una breve descripción de los marcadores moleculares más utilizados en el estudio de la variación genética.

##### **4.5.1. Marcadores proteicos y aloenzimas**

La técnica se basa en el uso de proteínas no desnaturizables con diferente carga neta que migran diferencialmente a través de un gel cuando una corriente eléctrica es aplicada. Una isozima es más que una forma de una enzima codificada por diferentes loci y una aloenzima es más que una enzima codificada por diferentes alelos en el mismo locus. La mayoría de aloenzimas muestran herencia codominante, y las

variaciones son atribuidas a sustituciones nucleotídicas causando el remplazo de aminoácidos cargados (Lowe *et al.* 2004). La principal ventaja en el uso de estos marcadores es su naturaleza codominante, la simplicidad de la técnica y su bajo costo. Sin embargo, desafortunadamente hay un número restringido de loci adecuado en el genoma, se requiere tejido fresco y algunas veces la variación es limitada (Weising *et al.* 2005). En su mayoría son selectivamente neutras y se utilizan como marcadores hereditarios para cuantificar las frecuencias alélicas y genotípicas de los individuos, que son los estimadores básicos de la composición genética de una población. La aplicación de las aloenzimas está dirigida a la cuantificación de heterocigosis, diversidad genética, diferenciación genética y otras medidas de variación genética intra e interpoblacional, para evaluar y entender aspectos de biología evolutiva como los sistemas de reproducción y patrones de fecundación cruzada, relaciones entre fenotipo y ambiente, filogenias, endemismo, interacciones planta-animal (Eguiarte *et al.* 2007).

#### **4.5.2. RFLP**

Polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción. Esta técnica se basa en la detección de fragmentos de ADN de distinto peso molecular, por digestión con una enzima de restricción (Weising *et al.* 2005). Estas enzimas de restricción (endonucleasas de origen bacteriano) reconoce y corta solamente una secuencia específica de bases nitrogenadas en el ADN, siempre y cuando éstas no estén protegidas (metiladas). Por consiguiente cualquier ADN que no este metilado puede ser reconocido y cortado en fragmentos de longitud definida; y cualquier mutación dentro de estos sitios, podría cambiar el patrón del fragmento y permitir que se detecte un RFLP al comparar dos o más genomas. Para detectar dichos RFLP's existen dos técnicas: southern blots e hibridación y PCR (Eguiarte *et al.* 2007). Los marcadores RFLP son de naturaleza codominante y es posible detectar polimorfismos en ADN nuclear y de organelos. Sin embargo requiere de grandes cantidades de ADN, usualmente hay una necesidad por acceder a radioisótopos y un limitado número de marcadores de nADN adecuados están disponibles (Lowe *et al.* 2004).

#### **4.5.3. RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar)**

Esta técnica utiliza oligonucleótidos individuales de 10 nucleótidos y un contenido de GC de la menos el 50% (Weising *et al.* 2005) para amplificar regiones del genoma utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (Lowe *et al.* 2004). Los

productos de PCR son separados en geles de agarosa y detectados por tinción por ejemplo con bromuro de etidio (Weising *et al.* 2005).

Los RAPD's se basan en la probabilidad estadística de que se presenten sitios complementarios al oligonucleótido de pares de bases a lo largo del genoma. El polimorfismo de las bandas entre los individuos se debe a cambios en la secuencia de los nucleótidos en los sitios de acoplamiento del oligonucleótido y por inserción o deleción de los fragmentos en estos sitios. Estos marcadores son dominantes, es decir, no pueden discernir los homocigotos dominantes de los heterocigotos para un segmento particular (Eguiarte *et al.* 2007).

Entre las principales ventajas de los RAPDs está que amplifican regiones tanto codificantes del ADN como las no codificantes y revelan niveles de variación más altos que los RFLP's y aloenzimas; es una técnica relativamente fácil que no necesita conocimiento previo de la secuencia de ADN, no requiere la construcción o el mantenimiento de una librería genómica, el número de loci que puede ser examinado es ilimitado y no requiere de pruebas radioactivas. Sin embargo, los problemas prácticos detectados con los RAPD's son la presencia de bandas "erróneas" (artefactos), la reproducibilidad de los resultados y la co-migración de bandas. Así mismo, muchos de los alelos raros presentes en las poblaciones estudiadas con RAPD's no son detectados o pueden ser mal interpretados. Por otro lado como los loci son dominantes, los RAPD's dan menos información genética por locus que los marcadores codominantes (Eguiarte *et al.* 2007).

#### **4.5.4. AFLP (Polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados)**

Esta técnica combina el uso de enzimas de restricción y oligonucleótidos para PCR, de manera que se obtienen marcadores moleculares muy específicos sin necesidad de conocer la secuencia con anterioridad. El DNA se corta con dos enzimas de restricción, una de corte muy frecuente, y otra de corte poco frecuente. A los fragmentos se les ligan oligonucleótidos de extremos compatibles con las enzimas EUAdas y se amplifica por PCR. Jugando con la complementariedad del oligonucleótido con el sitio de restricción se puede disminuir o aumentar el número de bandas amplificadas (Lowe *et al.* 2004). Detecta múltiples loci polimórficos y es útil para generar huellas genéticas y mapeo, caracterización de germoplasma, estudios filogenéticos en plantas, bacterias, hongos y en estudios de genética de poblaciones. Entre las ventajas que se pueden encontrar a los AFLP's está que no requieren ninguna información previa de la

secuencia para su análisis; se producen una gran cantidad de bandas polimórficas; la técnica es altamente reproducible y existen kits estandarizados. Sin embargo, requiere gran número de pasos para producir resultados (Eguiarte *et al.* 2007).

#### **4.5.5. SSR (Secuencias simples repetidas)**

En los genomas existe un ADN ubicuo y abundante denominado "microsatélite" que consiste en mono-, di, tri- y tetra nucleótidos repetidos en tándem. Este ADN, que es muy polimórfico, se ha utilizado como marcador molecular cuando la secuencia del motivo repetido se clona y secuencia para evaluarla en el análisis de poblaciones. Estos loci se encuentran en regiones codificantes y no codificantes del ADN y es probable que se formen por eventos de rompimiento que generan polimorfismos con valores superiores al 90% (Eguiarte *et al.* 2007).

Los marcadores SSR's son de naturaleza codominante y es posible detectar polimorfismo tanto en nADN como ADN de organelos. Sin embargo la identificación inicial de SSR's es cara y requiere tanto de clonación como secuenciación, mientras que los pares de primers SSR tienden a ser específicos a nivel de especie (Lowe *et al.* 2004).

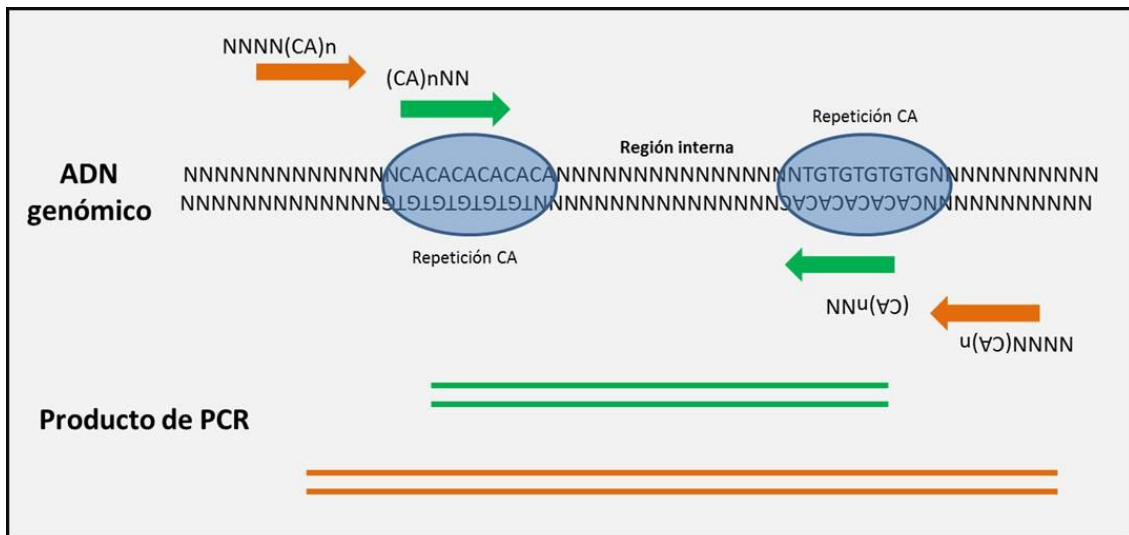
Una modificación a este tipo de marcadores son los marcadores ISSR, los cuales hacen uso de la distribución aleatoria de SSR's a través del genoma, a continuación se describen dichos marcadores.

**4.5.5.1. ISSR (Inter Simple Sequence Repeats).** Son un tipo de marcador genético que nos permite obtener los niveles de variación en las regiones microsatélites que se encuentran dispersas en varios genomas, particularmente el nuclear. Estas regiones consisten en repeticiones en tandem de motivos simples como (CT) o (CA), ubicadas entre secuencias no repetitivas del genoma nuclear eucarionte. Los motivos repetidos llamados también SSR's (simple sequence repeats) pueden ser -penta, -tetra, -tri o dinucleótidos. La longitud de las secuencias de microsatélites tiende a ser altamente variable entre individuos debido a las altas tasas de mutación que experimentan, ya que cuando el ADN se replica durante la meiosis, la ADN polimerasa puede "tartamudear" hacia delante o hacia atrás en las unidades repetidas, eliminando o agregando unidades a la cadena. Las cadenas resultantes pueden entonces presentar menos o más unidades de repetición (o pares de bases) que las cadenas parentales (Eguiarte *et al.* 2007).









**Figura 8.** PCR utilizando marcadores ISSR.

\* Elaboración propia basada en:  
[http://www.cdfd.org.in/SILKSAT/index.php?f=protocol\\_issr](http://www.cdfd.org.in/SILKSAT/index.php?f=protocol_issr)

La molécula generada con un tamaño particular (peso molecular), se considera un locus que representa el segmento de ADN entre los microsatélites pudiendo amplificar de 25 a 50 bandas en una sola reacción. Las bandas de ISSR's son consideradas marcadores dominantes. La presencia de la banda representa el genotipo dominante (homocigoto o heterocigoto) mientras que su ausencia representa el genotipo homocigoto recesivo, asumiendo que existen dos alelos por locus. La ausencia de una banda puede deberse a varios factores como son: la no existencia de un sitio de unión completo al primer debido a una mutación; re arreglos estructurales en el cromosoma durante la meiosis; inserciones o deleciones suficientemente grandes como para aumentar o disminuir el tamaño de la banda, de manera que se identifica como un locus diferente (Eguiarte *et al.* 2007).

Las ventajas que ofrece esta técnica se centran principalmente en la alta variación que detecta, así como en su reproducibilidad debida principalmente a las altas temperaturas de alineación utilizadas en la PCR. Así mismo, no son necesarias altas concentraciones de ADN. Por otro lado no se requiere de un conocimiento previo de la secuencias del genoma del organismo en estudio para el diseño de primers. Finalmente, son sencillos de llevar a cabo, rápidos, eficientes y poco costosos (Eguiarte *et al.* 2007).

#### 4.5.6. Secuenciación de ADN

La estrategia más directa en la detección de polimorfismos a nivel de ADN es la determinación de la secuencia nucleotídica de una región definida y el alineamiento de dicha secuencia a una región ortóloga en el genoma de otro organismo más o menos relacionado (Weising *et al.* 2005). Este método incluye cuatro pasos principales: 1) identificar secuencias que tengan la variación necesaria; 2) aislar y purificar un número elevado de la secuencia (ya sea por clonación o amplificación); 3) secuenciar; 4) alinear la secuencia (con algún programa computacional) (Eguiarte *et al.* 2007).

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

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

**4.5.6.1. Uso de secuencias génicas de ADN mitocondrial en el estudio de la variación genética.** Para el análisis molecular en estudios de diversidad genética se han utilizado regiones conservadas de ADN nuclear, ADN mitocondrial y ADN ribosomal.

El ADN mitocondrial (mtADN) en particular, ha sido utilizado como una poderosa herramienta en el estudio de estructuras de poblaciones y flujo de genes, hibridación, biogeografía y relaciones filogenéticas (Kambhampati y Smith, 1995). Esto, debido a que el mtADN es pequeño comparado con el genoma nuclear, un rango relativamente rápido de cambio evolutivo, es heredado de la madre y tanto el orden como la composición de genes se hayan generalmente conservadas (Hoy, 1994). Además el alto número de copias de genes mitocondriales hace mucho más fácil el trabajo a diferencia de las copias individuales de genes nucleares y su herencia materna ha sido particularmente útil a nivel infraespecífico (Cruickshank, 2002).

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

secuencias cuando Kocher *et al.* (1989) publicaron que primers altamente conservados podrían ser utilizados para amplificar por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) el ADN de un amplio rango de taxa.

El mtADN en animales consiste en una molécula circular variando de 14 a 17 kb en longitud, de los 37 genes encontrados en el mtADN de animales, 13 genes codifican para proteínas, consistiendo de 3 subunidades de citocromo oxidasa (*COI*, *COII* y *COIII*), 2 subunidades de ATP sintasa (*atp6* y *atp8*), 7 subunidades de NADH deshidrogenasa (*ND1*, *ND2*, *ND3*, *ND4*, *ND4L*, *ND5*, *ND6*) y citocromo b (*cytB*). Dos genes que codifican para la larga subunidad de RNA ribosomal (16S) y la pequeña subunidad de RNA ribosomal (12S), además hay 22 tARNs, 2 leucinas y 2 serinas (Thao *et al.* 2004).

El análisis del genoma mitocondrial de insectos es una poderosa herramienta en el estudio de genética de poblaciones y relaciones filogenéticas. Su característica y rápida evolución sumada a la herencia materna y recombinación limitada, hacen que el ADN mitocondrial sea un marcador ideal para la solución de muchas preguntas a nivel de especie (Salinas, 2010). Como ejemplo, Moriyama y Powel (1997) compararon rangos de sustituciones sinónimas, definidas como el número de mutantes que llegan a fijarse por generación, en genes mitocondriales y nucleares de *Drosophila*. Ellos encontraron que los genes mitocondriales tienen 1.7 - 3.4 veces más sustituciones sinónimas que los genes nucleares más rápidos, ó 4.5 - 9.0 veces más alto que el promedio de genes nucleares.

Debido a la importancia de las funciones mitocondriales, cambios en la secuencia de mtADN pueden tener substanciales impactos sobre el estado físico de organelos (dentro de individuos) o incluso sobre el estado del organismo hospedero.

El impacto directo de haplotipos mitocondriales sobre la aptitud o el estado físico ha sido medido en copépodos, ratones y moscas del género *Drosophila*. En el caso particular de *Drosophila* se encontró que diferencias en el genoma mitocondrial trae como consecuencia haplotipos que se desarrollaban más rápido pero con mayor rango de mortalidad (James y Ballard, 2003). Los efectos en el estado físico debido a diferencias en el genoma mitocondrial pueden depender del ambiente que el organismo encuentra en sí mismo, así como del genotipo nuclear del hospedero (Ballard y Whitlock, 2004).

Dentro de las subunidades del ADN mitocondrial, el gen *citocromo oxidasa I* (*COI*), posee varias características que lo convierten en uno de los mejores marcadores

moleculares disponibles para estudios relacionados con la evolución (Salinas, 2010). Entre ellas se encuentran su tamaño y estructura, las cuales son características conservadas en la mayoría de organismos que se han estudiado; así como la longitud del gen, la cual es mayor dentro de las tres subunidades del *citocromo oxidasa*, que permite amplificar y secuenciar muchos más caracteres o nucleótidos; la presencia de extremos altamente conservados que permite el uso de cebadores universales para generar comparaciones y conclusiones robustas en diferentes tipos de análisis (Salinas, 2010). Además de lo anterior, el gen COI posee un rango amplio de señales filogenéticas, particularmente en la tercera posición de las tripletas de codones, lo que genera que la tasa de evolución molecular sea casi tres veces mayor comparada con otros genes tales como 12S o 16S permitiendo la discriminación no solo de especies cercanamente relacionadas, sino además de grupos filogeográficos dentro de una misma especie. Así mismo, al poseer una tasa de mutación más rápida, comparada con otros genes mitocondriales, permite el análisis de polimorfismos nucleotídicos dentro de una misma especie, a diferencia del ND4 que es utilizado para analizar diferencias nucleotídicas a nivel de género o familia (Salinas, 2010).

Por otro lado, otro de los marcadores moleculares más utilizados en cuanto a subunidades mitocondriales se refiere, es el gen *citocromo B (CytB)* el cual, ha sido extensamente estudiado por ser componente obligatorio en la cadena respiratoria. Dicho gen ha sido utilizado como un indicador poderoso en la identificación de especies, además de utilizarse en estudios de evolución molecular y medicina legal (Prusak *et al.* 2005).

#### **4.6. Componentes de la variación genética**

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

- i) Diversidad genética : cantidad de variación genética
  - ii) Diferenciación genética: distribución de la variación genética entre poblaciones.
  - iii) Distancia genética: cantidad de variación genética entre pares de población.
- (Lowe *et al.* 2004).

#### **4.6.1. Diversidad genética**

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

**4.6.1.1. Porcentaje de loci polimórfico (P).** El enfoque más sencillo en las medidas de diversidad genética es el producir un estimado de la diversidad alélica, el cual involucra el número de alelos por locus o el número de loci polimórfico (Lowe *et al.* 2004), que en ocasiones suele expresarse como el porcentaje de todos los loci registrados en un set de muestras (Weising *et al.* 2005).

Un locus es definido como polimórfico de acuerdo a un criterio predeterminado, por ejemplo, la frecuencia de los alelos más comunes a un locus es  $<0.95$ . Esta medida es sensible a la definición arbitraria del criterio. Sin embargo, en literatura contemporánea loci es tratado como polimórfico si exhiben cualquier variación independiente (Lowe *et al.* 2004).

**4.6.1.2. Diversidad genética de Nei.** El termino diversidad genética fue utilizado por primera vez por Nei (1973), sin embargo, Marshall y Allard (1970) utilizaron el mismo método para calcular su “índice polimórfico”. La diversidad genética de Nei, toma en cuenta las frecuencias alélicas y consiste en la probabilidad que dos alelos elegidos al azar (o haplotipos) son diferentes en las muestras (Lowe *et al.* 2004). Utilizando la heterocigosidad esperada entre el total de las especies.

Es calculado por el locus como:

$$h = 1 - \sum p_i^2$$

La diversidad genética es sumada de  $i=1$  a  $k$ , donde  $p_i$  es la frecuencia del alelo  $i$  y  $k$  es el número de alelos. La diversidad genética  $h$  es el promedio sobre todo el loci y en ocasiones es denotado como  $H$  (Weising *et al.* 2005).

En el caso de marcadores dominantes con datos bialelicos, la diversidad genética de Nei puede ser también calculada:

$$h = 1 - p_i^2 - q_i^2$$

Donde  $p$  representa la frecuencia de los alelos visibles y  $q$  es la frecuencia de los alelos nulos para el marcador  $i$  (Weising *et al.* 2005).

La diversidad genética de Nei es ampliamente utilizada, sin embargo tiene sus inconvenientes. Por ejemplo, este varía entre 0 y 1, y mientras las frecuencias de alelos en un locus se aproximan a la igualdad, la medida se vuelve menos sensible (Lowe *et al.* 2004).

**4.6.1.3. Índice de Shannon.** Continuando con otra medida de diversidad, que en ocasiones es utilizada con marcadores dominantes está el índice de Shannon. El cual generalmente se calcula como:

$$H' = -\sum p_i \log_2(p_i)$$

Donde  $p_i$  es la frecuencia del alelo  $i$  en la población, y ambos alelos (presencia y ausencia) de cada locus debe ser tomado en cuenta (Weising *et al.* 2005).

El efecto de utilizar el índice de Shannon antes que cualquier otro es que el uso de logaritmo natural reduce la importancia de los valores más abundantes. El índice de Shannon toma valores en el rango de cero al infinito, siendo el número de loci muestreado el que determine el límite superior. Sin embargo, los valores pueden estar muy cercanos al promedio estimado a través de los loci. Este índice generalmente es preferido debido a que los resultados tienen una distribución normal, lo que permite aplicar pruebas estadísticas más refinadas a los datos (Lowe *et al.* 2004).

Debido a que el índice de Shannon utiliza datos binarios y el número de loci que es tomado en cuenta afecta el valor máximo de la medida, es muy importante que se utilicen números de loci similares si se desean hacer comparaciones válidas. En particular, es necesario considerar los efectos de datos faltantes o equívocos en cada locus cuando se hacen comparaciones entre poblaciones. Mientras que en comparaciones entre estudios se debe revisar cómo se convino el locus individual (Lowe *et al.* 2004).



#### 4.6.2. Diferenciación genética

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

A continuación se describen algunas de las medidas de diferenciación más utilizadas:

**4.6.2.1. Coeficiente de diferenciación de Nei ( $G_{ST}$ ).** El total de la diversidad genética ( $H_T$ ), medida en términos del total de la heterocigosidad esperada, puede ser desglosada con el objetivo de determinar la proporción de la diversidad genética de las especies que están presentes dentro de una población ( $H_S$ ) y entre poblaciones ( $D_{ST}$ , Nei 1973), indicando la diferenciación genética entre poblaciones.

$$H_T = D_{ST} + H_S$$

Estos índices de diversidad ( $H_T$ ,  $H_S$ ,  $D_{ST}$ ) pueden ser utilizados para calcular medidas de diferenciación genética.  $G_{ST}$ , es denominado coeficiente de diferenciación genética (Nei 1973) donde:

$$G_{ST} = D_{ST} / H_T$$

Para entender la relación entre  $H_T$ ,  $H_S$  y los estimadores de diferenciación habrá que considerar sus valores máximos y mínimos. En un sistema di alélico, con dos alelos a frecuencias iguales en todas las poblaciones el valor máximo de  $H_T$  es 0.5. Si los dos alelos están a frecuencias iguales dentro de una población, entonces el valor máximo de  $H_S$  es también 0.5 (Lowe *et al.* 2004).

Si comparamos los valores  $G_{ST}$  estos pueden variar entre 0 y 1.  $G_{ST}$  es 0 cuando el total de la diversidad genética ( $H_T$ ) es igual a la heterocigosidad esperada ( $H_S$ ) en cada población, lo que significa que las frecuencias alélicas son idénticas a través de todas las poblaciones.  $G_{ST}$  es 1 cuando el total de la diversidad genética ( $H_T$ ) es 0, es decir que no hay variación dentro de las poblaciones, pero que dichas poblaciones están fijadas por diferentes alelos y por lo tanto las poblaciones están máximamente diferenciadas y toda la variación detectada está dividida entre las poblaciones (Lowe *et al.* 2004).

**4.6.2.2. Análisis Molecular de Varianza (AMOVA).** El método de análisis molecular de varianza fue desarrollado por primera vez por Excoffier *et al.* 1992 como un sistema para analizar datos moleculares que fueran lo suficientemente flexibles a ser aplicados a una amplia variedad de tipos de datos sin violar suposiciones inherentes de muchos otros modelos, como la independencia del loci molecular, la variación debida solamente a la deriva genética o al hecho de que no haya migración (Lowe *et al.* 2004).

El AMOVA, disponible en el programa computacional Arlequin, es generalmente utilizado con datos de marcadores dominantes (Weising *et al.* 2005). Esto debido al hecho de que las frecuencias alélicas no son calculadas (Lowe *et al.* 2004).

Este análisis trabaja con distancias entre individuos y calcula la varianza entre y dentro de grupos predefinidos, permitiendo probar varias estructuras genéticas. Los componentes de varianza pueden ser calculados para cada nivel jerárquico. Originalmente, se prefiere el cuadrado de las distancias Euclidianas, pero los resultados son muy similares a los obtenidos con el coeficiente de similitud de Jaccard (Lowe *et al.* 2004).

Los niveles de significancia para AMOVA son computados por permutaciones no paramétricas del set de datos con 1000 permutaciones. Se generan estadísticos- $\Phi$ , los cuales son correlacionados directamente con los estadísticos análogos  $F$  y derivados de los componentes de la varianza computados durante el AMOVA. Estos expresan la correlación de un par de individuos tomados al azar de un subgrupo del set de datos en particular, con respecto a un par de individuos tomados de un grupo más amplio, indicando la partición relativa de la variación entre los niveles jerárquicos que están siendo analizados (Lowe *et al.* 2004).

**4.6.2.3. Migración (Nm).** Endler (1977), describe el flujo genético como la proporción de nuevos genes inmigrantes moviéndose dentro de una población, con el propósito del movimiento genético, la cual se refiere al fenómeno de intrapoblación. El flujo genético es un aspecto esencial de la proliferación y dispersión de especies, y migración de genes. Sin flujo genético las poblaciones divergirían y se diferenciarían a través del tiempo, cuya última consecuencia podría ser la especiación (Lowe *et al.* 2004). Si el flujo genético entre poblaciones de una especie es alto, todas ellas

evolucionan de manera conjunta (a menos que sea contrarrestado por selección o deriva genética), pero si es muy bajo, empiezan a divergir lo que puede contribuir al aislamiento reproductivo y al establecimiento de linajes evolutivamente independientes (Eguiarte *et al.* 2007).

Cuando el flujo genético es extenso y de manera natural éste es altamente dependiente de dos características intrínsecas de los organismos: modo de reproducción, la movilidad de los organismos y sus propágulos (mecanismos de dispersión y comportamiento). Sin embargo, en poblaciones naturales, hay otras características biológicas que influyen dramáticamente en la repartición de la variación genética, incluyendo: tiempo de reproducción, que aísla temporalmente las poblaciones y afecta los patrones potenciales de flujo genético; densidad individual; comportamiento; sobrevivencia y establecimiento de la progenie, dependiente de su adaptación a las condiciones del micro sitio. En adición a estas características intrínsecas, es claro que la magnitud y rango de flujo genético están fuertemente influenciados por el ambiente donde habitan los organismos. Tal es el caso donde rasgos topográficos e hidrológicos del ambiente de los organismos tienen efecto en la escala y dirección de la conectividad genética entre individuos y poblaciones de las especies. De manera que las presiones de selección ambiental al limitar la distribución de los taxa, limitan el flujo genético a través del paso adaptativo (Lowe *et al.* 2004).

A la fecha se han desarrollado una serie de métodos y modelos para estudiar el flujo genético, y pueden ser clasificados como métodos indirectos e indirectos.

Los métodos directos se basan en observaciones o experimentos que miden el grado de dispersión de gametos o individuos, por ejemplo con la captura y recaptura de individuos marcados. Este método concluye que en la mayoría de las especies la dispersión es muy localizada, aunque esto no quiere decir necesariamente que el flujo genético en poblaciones sea muy restringido. Esto se debe a que se subestima la frecuencia de la dispersión a larga distancia, que puede ser difícil de detectar, no se toman las extinciones y recolonizaciones como una fuente de flujo genético. Asimismo, las estimaciones del flujo genético obtenidas con este tipo de datos no pueden ser interpretadas como flujo genético entre poblaciones, ya que miden la migración en un área determinada que no necesariamente es una población, y en un periodo dado, por lo que no puede ser considerado flujo genético en una escala evolutiva (Eguiarte *et al.* 2007).

Los métodos indirectos, por su parte, se basan principalmente en observar la distribución espacial de alelos en las poblaciones para hacer inferencias de los niveles o patrones de flujo genético en las poblaciones (Eguiarte *et al.* 2007). Estos no dependen de estudios de individuos que se dispersan, sino que conducen a estimaciones del nivel promedio de flujo genético a partir de un modelo matemático de la interacción del flujo genético y otras fuerzas para predecir cuanto flujo genético debe haber estado ocurriendo para que los patrones observados estén presentes en los datos (Slatkin, 1994).

A pesar de las limitaciones en el uso de marcadores dominantes debido al desconocimiento de la proporción de heterocigotos, pueden ser utilizados en estimados directos de flujo genético.

El método indirecto más comúnmente utilizado se basa en el estadístico  $F_{ST}$  de Wright, el cual es una medida de la correlación entre los genes en una subpoblación en relación a la población entera (Slatkin, 1994). Esta medida de diferenciación de la población permite estimar el rango de migración entre poblaciones, asumiendo que estas poblaciones están en equilibrio.

$$F_{ST} = 1/1 + 2Nm$$

Donde  $N$  es el tamaño de la población,  $m$  es el rango de migración y  $Nm$  es el número de individuos migrando por generación.

Usando  $F_{ST}$  como una medida de subdivisión de la población y notando que las poblaciones con alta diferenciación deben tener bajos niveles de flujo genético entre ellas a diferencia de aquellas con baja diferenciación; Wright (1931) deriva un parámetro para el flujo genético, número de migrantes por generación,  $Nm$ , el cual puede ser calculado directamente del  $F_{ST}$  como:

$$Nm = (1-F_{ST})/4F_{ST}$$

Con valores  $Nm$  menores a 1, se espera que las poblaciones diverjan genéticamente sobre el tiempo, ya que la deriva actúa en forma casi independientemente en cada población; pero donde  $Nm$  es mayor a 1 se espera que las poblaciones conserven conectividad genética, pues el flujo genético sobrepasa los efectos de la deriva e impide la diferenciación local (Slatkin, 1994).

El principio de un migrante por generación es además independiente del tamaño de la población. Para poblaciones grandes la deriva sería menor, así que las poblaciones divergirían lentamente, así que un migrante por generación es efectivo en respuesta a esta lenta deriva. Para poblaciones pequeñas donde se espera que la deriva

sea alta, un migrante es una contribución relativamente alta y en ocasiones compensa el efecto de la deriva (Lowe *et al.* 2004).

En la situación donde todas las poblaciones de una especie no son completamente panmícticas, habría diferenciación genética sobre la escala espacial debido a la pérdida de flujo genético. Si hay bajo flujo de genes entre las poblaciones más distantes, las cuales consecuentemente exhibirían alta diferenciación, este efecto se denomina como aislamiento por distancia. En ausencia de barreras, las poblaciones que están muy cercanas, en general, pueden experimentar mayor flujo genético que aquellas más distantes. Este efecto es conocido como aislamiento por distancia (IBD). La escala a la cual IBD ocurre es fuertemente dependiente sobre las características de las especies respectivas (Weising *et al.* 2005).

Un análisis de Mantel comúnmente es utilizado para detectar la posible correlación geográfica y la distancia genética. La prueba original de Mantel involucra dos matrices de distancia que son multiplicadas elemento por elemento. La suma de estos productos es tratada en contra de un valor esperado bajo la suposición de que no existe asociación entre las dos matrices (Weising *et al.* 2005).

#### **4.6.3. Distancia genética**

La distancia genética cuantifica el grado de similitud entre dos individuos, o grupos de individuos. Una medida de distancia genética debe ser métrica, es decir: los valores deben ser positivos, simétricos, distintivos y satisfacer la desigualdad triangular. Conceptualmente, la distancia genética mide que tan alejados están dos individuos o poblaciones en un hiperespacio n-dimensional marcado, donde cada eje corresponde a la variación en un marcador individual. Idealmente, el método de distancia genética debe producir valores que varíen entre cero y uno (Lowe *et al.* 2004).

Numerosos métodos han sido desarrollados para medir la distancia genética entre población e individuos. Para un mejor entendimiento de dichos métodos estos han sido divididos en dos grupos: aquellos que usan datos desordenados y estiman la distancia genética basados en el criterio de alelos compartidos; y aquellos otros que utilizan datos ordenados (Lowe *et al.* 2004).

Entre los métodos que utilizan datos desordenados se tienen los valores  $F_{ST}$  (*pairwise*). Este es uno de los métodos más utilizados cuya ventaja es que todos los tipos de datos pueden ser analizados (haploides, codominantes y dominantes) Usando la medida de diferenciación apropiada (Weising *et al.* 2005). Sin embargo, uno de los

métodos para el cálculo de distancia genética más conocido es el estimador de Nei, el cual se basa en la probabilidad de que al escoger un alelo al azar de cada dos poblaciones, este sea diferente con respecto a la probabilidad de que al escoger dos alelos de una misma población sean diferentes (Weising *et al.* 2005).

Para estimar la distancia genética para datos dominantes se puede hacer uso de la medida de similitud de Jaccard (Lowe *et al.* 2004), el cual confía en el número de bandas registradas entre dos individuos, como una proporción del número total de bandas que estos dos individuos demuestran:

$$S_J = n_{ab} / n_a + n_b - n_{ab}$$

Aquí  $n_a$  y  $n_b$  representan El número de bandas presentes en las líneas a y b, respectivamente, y  $n_{ab}$  representa el número de bandas registradas por ambas líneas (Weising *et al.* 2005).

**4.6.3.1. Análisis de coordenadas principales.** Una matriz de presencia-ausencia de bandas de las muestras analizadas puede servir como punto de inicio para las técnicas de ordenamiento. Este tipo de datos de matriz deben ser tratados como datos no paramétricos y pueden ser sujetos a un análisis de coordenadas principales (PCO) y funciones discriminantes. En este tipo de análisis, los datos de la matriz no son derivados de la presencia o ausencia de todas las bandas en todos los OTU's (unidades taxonómicas operacionales), sino más bien las distancias (o similitudes) entre los OTU's. Dado que una matriz de distancia es el punto de inicio PCO no requiere de mucha información, comparado con otros análisis como el de análisis de componentes principales (PCA). Los datos puntuados describen una hiperelipsoide en un espacio multidimensional. Para simplificar la descripción de estas nubes de puntos, los ejes principales por la hiperelipsoide son calculados. Un gráfico de dispersión de los datos representa la variación de los niveles de similitud entre las entidades. Uno puede calcular, además, que tan bien fueron agrupadas las muestras de acuerdo a un significado biológico, como la región de origen (Weising *et al.* 2005).

**4.6.3.2. Construcción de dendrogramas.** El objetivo de producir un dendrograma es visualizar la mejor representación de las relaciones fenéticas (sobre toda la similitud) o filogenética (historia evolutiva) entre un grupo denominado unidades de operación taxonómica (OTU's). Dos de los algoritmos de matrices de

distancia más utilizados es el llamado UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic average) y Neighbor-Joining (Lowe *et al.* 2004). UPGMA asume un rígido reloj molecular, lo que significa que los rangos evolutivos a lo largo de todas las ramas del árbol necesitan ser idénticas (Weising *et al.* 2005). Este método produce un árbol ultra métrico, donde todas las taxa terminales son equidistantes de la raíz. En contraste con el método de Neighbor Joining, donde las distancias a los nodos internos son calculados directamente y no se asume que todos los taxa son equidistantes de la raíz (Lowe *et al.* 2004).

#### **4.7. Implicaciones de la variación genética en insectos plaga**

En los ecosistemas naturales, los organismos muestran una estructura de variación espacial y temporal, la cual puede influenciar profundamente en su genética. De manera similar, dentro de una especie, la variación genética tiene una estructura jerárquica, que puede ocurrir dentro y entre poblaciones o regiones. Estos procesos ecológicos y genéticos, como los patrones de flujo genético y la extinción localizada, influyen en los patrones de variación genética (Lowe *et al.* 2004).

La ausencia de variación genética puede resultar en la carencia de la capacidad adaptativa de la especie a responder a las perturbaciones del ambiente, las cuales podrían finalmente llevar a la extinción. 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 (Lee, 2002).

La hipótesis del EICA (Evolution of Increased Competitive Ability) indica que estados de poblaciones invasivas de especies son más robustas (cuerpos de gran tamaño, desarrollo rápido, producen más descendientes, viven más, etc.) que las poblaciones en el rango nativo. Aunque esta hipótesis fue originalmente desarrollada en plantas, el concepto ha sido extendido hasta incluir insectos invasivos como lo es la hormiga argentina (Tsutsui *et al.* 2000).

Estudios basados en la diferenciación genética de los dos biotipos de *B. cockerelli* demostraron que poblaciones nativas (Texas) poseen mayor supervivencia, alto índice de crecimiento y requiere de tiempos más cortos para su desarrollo a diferencia de poblaciones invasivas (California). En cuanto a fecundidad se refiere esta fue mayor significativamente en psílicos nativos en plantas de tomate más no en Chile. Sin embargo los psílicos de las poblaciones invasivas prefirieron alimentarse de plantas

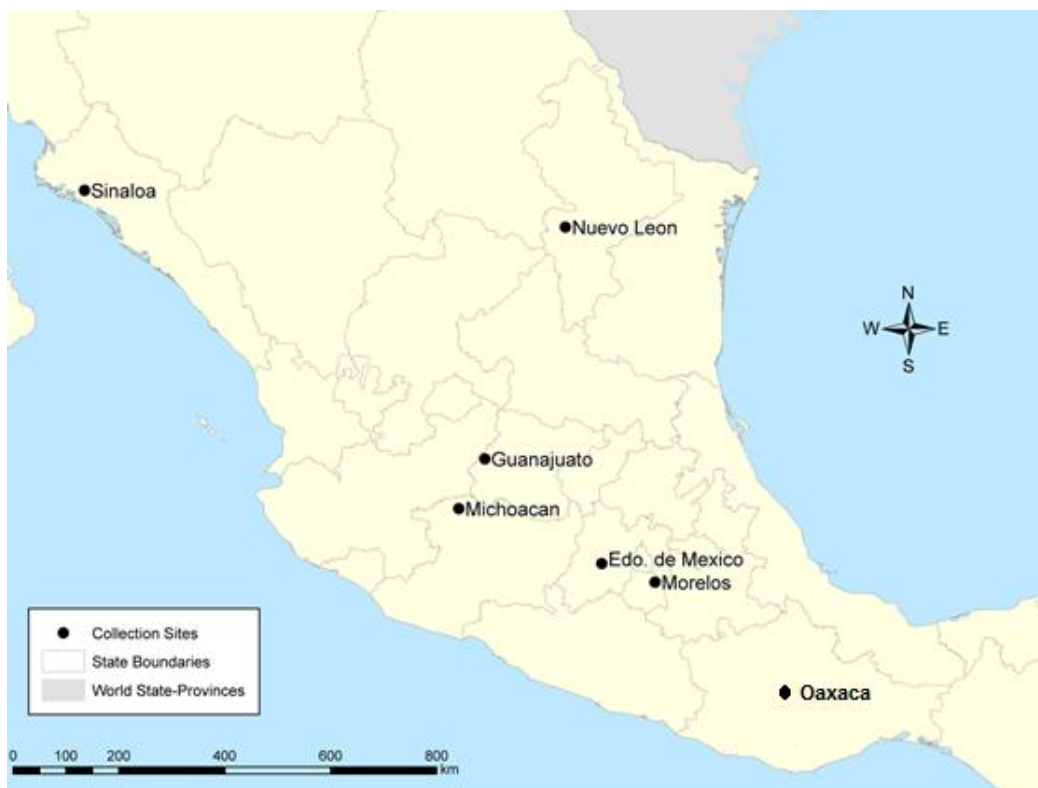
de tomate mostrando en ellas mayor supervivencia e índice de crecimiento (Liu y Trumble, 2007).



## 5. MÉTODOS

### 5.1. Área de estudio

La recolecta del insecto *Bactericera cockerelli* se realizó en las principales zonas de cultivo de papa de México, específicamente en los estados de Sinaloa, Nuevo León, Guanajuato, Estado de México, Michoacán, Morelos y Oaxaca que de acuerdo con datos del Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) de la SAGARPA son los principales estados productores de papa en México concentrando el 93.6% de la producción nacional.



**Figura 9.** Áreas de recolecta de *B. cockerelli*

Los sitios de recolecta en los estados designados como área de estudio fueron seleccionados con base en los registros que se tenían de la plaga en el cultivo. El nombre de la localidad y las coordenadas geográficas de cada sitio de colecta se muestran en la Tabla 1; mientras que en la Tabla 2 se muestra una breve descripción de algunos factores físicos y ambientales de los mismos.

**Tabla 1.** Coordenadas geográficas de los sitios de recolecta de *B. cockerelli* en México.

Localidad	Coordenadas	
	N	W
Galeana, Nuevo León	24°55' 51.4''	100° 25' 35''
León, Guanajuato	20° 59' 35.88''	101° 47' 36.48''
Tanhuato, Michoacán	20° 09' 7.86''	102° 14' 14.88''
Zinacantepec, Edo. de México	19° 13' 6.78''	99° 48' 28.38''
Cuautla, Morelos	18° 54' 4.44''	98°54' 20.94''
Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca	17° 01' 42.56''	96° 43' 14.82''
Guasave, Sinaloa	25° 33' 26.02''	108° 35' 31.33''

**Tabla 2.** Características físicas de los sitios de recolecta

Localidad	Altura (msnm)	Clima	Temperatura media anual	Tipo de Suelo	Vegetación
Galeana, Nuevo León	1885	Seco estepario frío/templado o con lluvias en verano	19°C	Castañozem, rendzina, feozem y en mayor escala por litosol y fluvisol.	Pino, encino, oyamel, decro, mezquite, palma, lechuguilla, maguey, nopal.
León, Guanajuato	1773	Templado/subhúmedo con lluvias en verano	18°C	Predominan Vertisol y feozem	Pastizales, bosques de pino-encino, matorrales con cactáceas y agaves.
Tanhuato, Michoacán	1582	Templado con lluvias en verano	21°C	Chernozem	Pradera predominando huisache, nopal y mezquite.
Zinacantepec, Edo. de México	3122	Templado subhúmedo	12°C	Migajón, arcillo-arenoso y limoso	Bosque de pino, encontrándose también cedros, oyameles, sauce llorón, encinos y robles.
Cuautla, Morelos	1534	Cálido subhúmedo	21°C	Regovol, vertisol,	Pastizal/selva baja

		con lluvias en verano		redzina	caducifolia
Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca	1530	Templado		Vertisol pélico	Xerófila, asociada al chaparral, especialmente por guamúchiles, mezquites, cactáceas, agaves y pastos.
Guasave, Sinaloa	50	Seco cálido	24°C	Castañozem	Bosque espinoso

## 5.2. Muestreo de *B. cockerelli*

Se realizó una recolecta dirigida de ninfas y adultos de *B. cockerelli*. En cada sitio de muestreo se localizaron las plantas de papa en las que hubiera ninfas de *B. cockerelli* observando el envés de cada hoja en al menos 20 plantas. La recolecta se realizó manualmente extrayendo las hojas infestadas del cultivo, recolectando para cada sitio al menos 100 hojas, las cuales fueron depositadas en bolsas plásticas colocadas posteriormente en una hielera para su traslado al laboratorio. Para la obtención de adultos se utilizaron redes de golpeo entomológicas, realizando aproximadamente 100 golpes de red sobre el cultivo por sitio. Los adultos recolectados fueron colocados en etanol al 100%, posteriormente se trasladaron al laboratorio de Entomología Médica de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. En el laboratorio el material fue separado e identificado por morfología para posteriormente almacenarse a una temperatura de -20°C hasta su procesamiento.

Las ninfas se llevaron al insectario del laboratorio de Entomología Médica FCB, UANL y fueron depositadas en plantas de chile, con aproximadamente 90 días, colocadas en jaulas (30 x 30 x 30 cm) bajo condiciones controladas de temperatura 23±3 °C, 70% humedad relativa y fotoperiodo (14 horas luz :10 oscuridad) para que una vez completado su desarrollo obtener los adultos. Los cuales se colocaron en tubos con etanol al 100% integrándolos a la población respectiva de campo.



**Figura 10.** Recolecta de ninfas y adultos *B. cockerelli* en cultivo de papa.

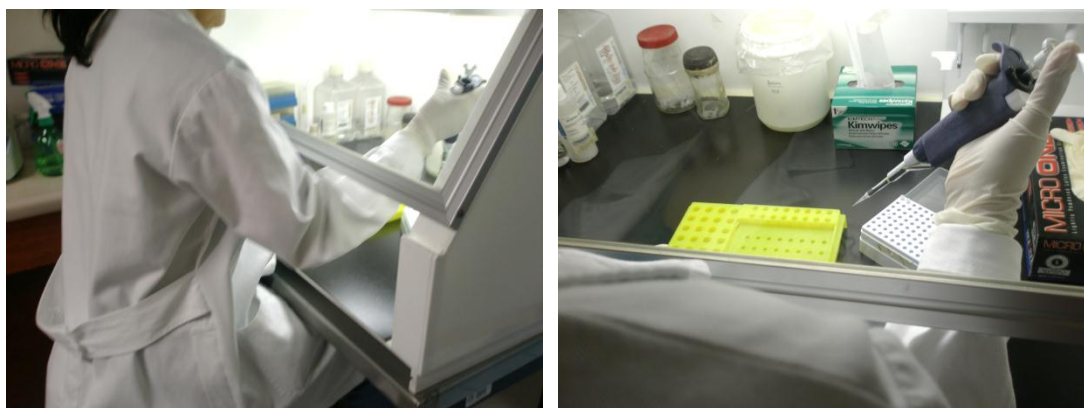
### 5.3. Caracterización molecular de *B. cockerelli*

#### 5.3.1. Extracción de ADN

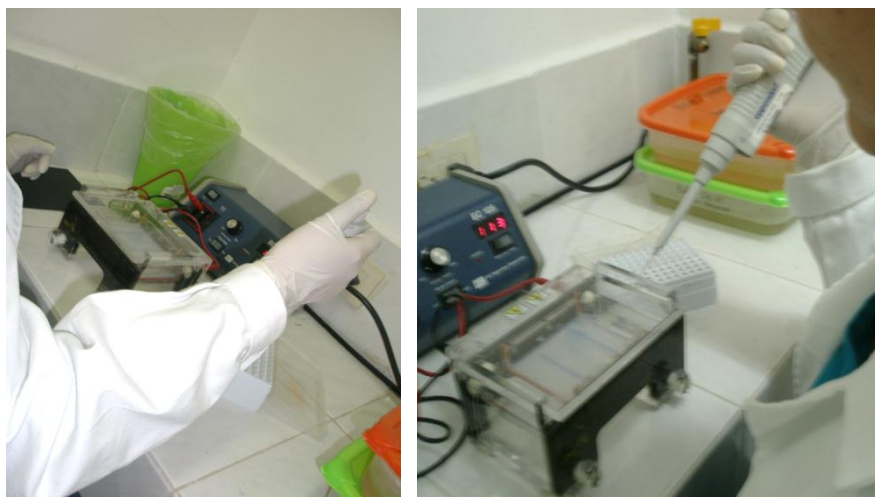
El ADN fue extraído individualmente de 50 adultos por sitio de recolecta de *B. cockerelli* preservados en etanol al 100%. Previo a la extracción de ADN, los especímenes fueron lavados con 20 uL de agua durante 10 segundos, realizando dicho procedimiento por triplicado, con la finalidad de eliminar el alcohol. El procedimiento de extracción de ADN que se siguió fue modificado de Navajas *et al.* (1998). Donde una vez eliminado el alcohol, el insecto fue macerado a 60°C con ayuda de un pistilo de plástico en un tubo de 1.5 mL con 200 uL de buffer de extracción (2% CTAB, 1.4 M NaCl, 0.2% 2-b mercaptoetanol, 20 mM EDTA, 100 mM TRIS-HCl pH 8.0). El tubo

se incubo a 60°C durante 1 hora. Las proteínas fueron removidas con un volumen de cloroformo/alcohol isoamílico. El DNA se precipito con un volumen de isopropanol, y el pellet fue lavado con etanol (76% v/v conteniendo 10 mM de acetato de amonio) y resuspendido en 20 uL de agua bidestilada.

Posteriormente se cuantifico la concentración y se determinó la pureza del ADN extraído de cada una de las muestras en el equipo NanoDrop 2000® (UV-Vis Spectrophotometer, Thermo Scientific).



**Figura 11.** Extracción de ADN de *B. cockerelli* y preparación de reacciones para PCR



**Figura 12.** Electroforesis en gel de agarosa con muestras de *B. cockerelli*

### 5.3.2. Amplificación de las regiones mitocondriales Citocromo oxidasa subunidad I (COI) y Citocromo b (CytB)

El ADN de 10 individuos de cada población fue utilizado para amplificar el fragmento COI. Dicha región fue amplificada utilizando el primer forward 5'-

CAACACCTATTCTGATTT-TTTGG-3' y el primer reversa 5'-TGTTGAGGAAAAATGTTAGGTTTAC-3' ambos reportados por Liu *et al.* (2006).

La reacción en cadena de la polimerasa fue realizada en un volumen de 25  $\mu$ l conteniendo 2.5  $\mu$ l Buffer (Invitrogen 10X), 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.22 mM de dNTP's, 0.2  $\mu$ M de primers, 40ng de ADN genómico y 0.5 unidades de Taq polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Un tubo de PCR control conteniendo todos los componentes excepto el ADN genómico se corrió con cada primer para descartar contaminación. La amplificación del ADN se llevó a cabo en un termociclador programable (iCycler®, BioRad, EUA). El programa térmico utilizado fue de 95°C (5 min) para la separación inicial de las cadenas de ADN, seguidos por 36 ciclos de 95°C (30 seg), 46.4°C (1 min), 72°C (1 min) seguido de un ciclo a 72°C (10 min) para la extensión final.

Para la amplificación de la región CytB se diseñaron primers específicos basados en la secuencia del genoma mitocondrial de *B. cockerelli* depositada en GenBank con número de acceso AY601890 (Thao *et al.* 2004). Para el diseño de primers se utilizaron las herramientas del IDT Technologies (<http://www.idtdna.com/SCITOOLS/Applications>) y BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast>), así como su comprobación en el programa AmplifX Versión 1.5.4. Las secuencias de los primers utilizados fueron 5'-CCTTGGAGAAACAATAGTCCTTTGG -3' para el forward y para el primer reversa 5'-TAGGTAGCATGCGAGTTGTAGC -3'.

La reacción en cadena de la polimerasa fue realizada en un volumen de 25  $\mu$ L conteniendo 2.5  $\mu$ l Buffer (Invitrogen 10X), 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.22 mM de dNTP's, 0.2  $\mu$ M de primers, 40ng de ADN genómico y 0.5 unidades de Taq polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Un tubo de PCR control conteniendo todos los componentes excepto el ADN genómico se corrió con cada primer para descartar contaminación. La amplificación del ADN se llevó a cabo en un termociclador programable (iCycler®, BioRad, EUA). El programa térmico utilizado fue de 94°C (3 min) para la separación inicial de las cadenas de ADN, seguidos por 22 ciclos de 94°C (30 seg), 58°C (30 seg), 72°C (1 min) seguido de un ciclo a 72°C (10 min) para la extensión final.

### **5.3.2.1. Electroforesis, detección y procesamiento de los productos de PCR Citocromo oxidasa subunidad I (COI) y Citocromo b (CytB) de *B. cockerelli***

Los fragmentos amplificados mediante PCR fueron separados por su tamaño mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa al 1.4% preparados con TBE

(Tris 0.044 M, ácido bórico 0.044 M, EDTA 1.0 mM, pH 8.3). En el primer carril del gel se colocó paralelo con las muestras un marcador de ADN de peso molecular conocido (Molecular Weight Marker, DNA 100 bp Ladder, AMRESCO®).

La electroforesis se llevó a cabo con una diferencia de potencial constante de 100 voltios durante 30 minutos. Para monitorear la migración del ADN en el gel se utilizó el azul de bromofenol, que migra aproximadamente con los fragmentos de 0.5 Kb.

Tras la electroforesis, los geles fueron teñidos al depositarlos durante 15 minutos en buffer SB 1X conteniendo bromuro de etidio. Posteriormente los productos de amplificación se visualizaron y fotografiaron bajo luz ultravioleta en un transiluminador (MultiDoc-It™ ImagingSystem, UVP®, EUA). Luego de su verificación fueron enviados a purificar y secuenciar a la compañía Macrogen Corp (Rockville, MD, EUA).

**5.3.2.2. Alineamiento y análisis de secuencias Citocromo oxidasa subunidad I (COI) y Citocromo b (CytB) de *B. cockerelli*.** La visualización, edición y alineamiento tanto de las secuencias de COI como de CytB de *B. cockerelli* se llevó a cabo en el programa MEGA versión 5.

En el alineamiento de secuencias COI se incluyeron también las secuencias depositadas en GenBank con números de acceso AY971885 - AY971890 y que corresponden a las secuencias reportadas por Liu *et al.* (2006) de *B. cockerelli* proveniente de Baja California y Coahuila, México; así como Colorado, Nebraska, Ventura y Orange, County, EUA, con la finalidad de comparar la variabilidad de las secuencias COI obtenidas con las ya reportadas. De la misma manera se incluyó al alineamiento la secuencia de COI de *Diaphorina citri*, la cual fue utilizada como grupo externo en el análisis.

El alineamiento de secuencias CytB por su parte, incluyó la secuencia depositada en GenBank con número de acceso AY601890, además de incluir la secuencia de *Glycaspis brimblecombei* (AY601889) asignada como grupo externo.

Las secuencias alineadas mostraron sitios conservados, variables y parsimoniosos.

Bajo el algoritmo del método Neighbor Joining se infirieron y construyeron árboles, basados en las distancias que existan entre las secuencias analizadas y colapsando la información de cada carácter en una única medida de distancia. Los

árboles resultantes fueron sometidos a un análisis “*bootstrap*” con 500 réplicas de donde se obtuvo un árbol consenso. Dicho análisis se llevó a cabo en MEGA 5.

### 5.3.3. Amplificación con marcadores ISSR

El ADN de 30 insectos por población se utilizó como templado para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con marcadores ISSR.

Para la amplificación con dichos marcadores se seleccionaron 5 primers del Biotechnology Laboratory, University of British Columbia (UBC) correspondientes al set No.9, los cuales produjeron bandas claras y reproducibles.

**Tabla 3.** Secuencias de marcadores ISSR (UBC) utilizados en el presente estudio

<b>Primer</b>	<b>Secuencia</b>
<b>818</b>	5'-CACACACACACACAG
<b>829</b>	5'-TGTGTGTGTGTGTGTGC
<b>847</b>	5'-CACACACACACACARC
<b>873</b>	5'-GACAGACAGACAGACA
<b>841</b>	5'-GAGAGAGAGAGAGAYC

R= Purina; Y= Pirimidina

La reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo en reacciones de 12.5 ul conteniendo 1.25 ul de Buffer (Invitrogen 10X), 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.22 mM de dNTP's, 0.2 uM de primers, 2% de formamida, 20ng de ADN genómico y 4 unidades de Taq polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Un tubo de PCR control conteniendo todos los componentes excepto el ADN genómico se corrió con cada primer para descartar contaminación.

La amplificación del ADN se llevó a cabo en un termociclador programable (iCycler, BioRad®, EUA). Las reacciones ISSR se llevaron a cabo de la siguiente manera: 94°C (2 min) para la separación inicial de las cadenas de ADN, posteriormente se agregaron 3 ciclos “touchdown” donde la temperatura de alineamiento de la reacción decreció 0.5°C cada ciclo, luego 36 ciclos de 94°C (30 seg), 51-61°C (818 a 61.0°C, 829 a 59.5°C, 847 a 56.0°C, 873 a 51.0°C y 841 a 51.0°C) (45 seg), 72° C (1.5 min) y 72° C (20 min) para la extensión final.



**5.3.3.1. Electroforesis, detección y procesamiento de los productos de PCR con marcadores ISSR.** Los fragmentos amplificados mediante PCR fueron separados por su tamaño mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa al 2% preparados con TBE (Tris 0.044 M, ácido bórico 0.044 M, EDTA 1.0 mM pH=8.3). En el primer y último carriles del gel se colocaron paralelo con las muestras un marcador de ADN de peso molecular conocido (Molecular Weight Marker, DNA 100 bp Ladder, AMRESCO®).

La electroforesis se llevó a cabo con una diferencia de potencial constante de 100 voltios durante 1 hora 45 minutos. Para monitorear la migración del ADN en el gel se utilizó el azul de bromofenol, que migra aproximadamente con los fragmentos de 0.5 Kb.

Tras la electroforesis, los geles fueron teñidos al depositarlos durante 15 minutos en buffer SB 1X conteniendo bromuro de etidio. Posteriormente los productos de amplificación se visualizaron y fotografiaron bajo luz ultravioleta en un transiluminador (MultiDoc-It™ ImagingSystem, UVP®, EUA).

**5.3.3.2. Conteo de bandas.** De las tres clases genotípicas potenciales en un individuo diploide (AA, Aa, aa) únicamente dos estados de carácter pueden ser registrados con este tipo de marcadores. La banda presente se registra como 1 y representa todos los homocigotos dominantes (AA) y heterocigotos (Aa), mientras que la banda ausente se registra como 0 y corresponde a lo homocigotos recesivos (aa) (Hollingsworth and Ennos, 2004). Se construyó una matriz binaria de bandas presentes y ausentes, la cual fue utilizada para medir la variabilidad y estructura genética dentro y entre las poblaciones de estudio.

**5.3.3.3. Medidas de variación genética.** La matriz binaria fue analizada usando POPGENE versión 32 (Yeh *et al.* 1997) para medir la variabilidad genética. Las medidas de variación genética obtenidas de cada población fueron: diversidad genética  $H$  (Nei, 1973), índice de diversidad de Shannon  $I$  y porcentaje de loci polimórfico  $P$ . El estadístico de la diversidad genética de Nei fue utilizado posteriormente para calcular la diferenciación genética entre poblaciones ( $G_{st}$ ). La cantidad de flujo genético entre poblaciones fue calculada usando  $N_m = (0.5 (1-G_{st}))/G_{st}$  (McDermott and McDonald, 1993).

**5.3.3.4. Medidas de distancia genética.** A partir de la matriz binaria se calculó la distancia genética (Jaccard). La matriz de distancia genética generada fue sujeta a un análisis de Coordenadas Principales (PCO) en el programa PAST ver.3 (Hammer *et al.* 2001), el cual produce una representación visual de la relación genética dentro y entre las poblaciones.

Además se construyó un dendrograma utilizando el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic averages) basado en la distancia genética de pares (Nei, 1972) en PHYLIP versión 3.5 (Felsenstein, 1993).

Así mismo para estimar el aislamiento por distancia se utilizó la prueba de Mantel (1967), la cual nos permitió evaluar la correlación entre la distancia genética, dada por el estadístico de Nei (1972) y la distancia geográfica. Para dicho análisis se utilizó el programa XLSTAT versión 2012.

**5.3.3.5. Medidas de estructura genética.** Con base al patrón de agrupamiento entre las poblaciones, generado tanto en el gráfico de coordenadas principales como el dendrograma (UPGMA) se condujo un Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) utilizando ARLEQUIN versión 3.1 (Schneider *et al.*, 2000) con el objetivo de calcular los componentes de la varianza dentro y entre las poblaciones de estudio.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Recolecta de *B. cockerelli*

En cada sitio de recolección se extrajeron un promedio de 100 insectos, de los cuales aproximadamente el 20% correspondieron a estadios ninfales. Las ninfas posteriormente en el insectario completaron su desarrollo hasta adulto para incorporarse a la localidad específica. Las Figuras 13 y 14 muestran parte del material colectado e identificado como *B. cockerelli*.



**Figura 13.** Ninfa de *B. cockerelli* en hoja de chile completando su desarrollo en insectario

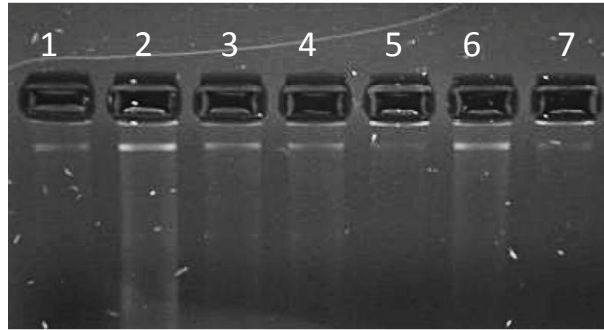


**Figura 14.** Adulto de *B. cockerelli*

### 6.2. Caracterización molecular de *B. cockerelli*

#### 6.2.1. Extracción de ADN a partir de *B. cockerelli*.

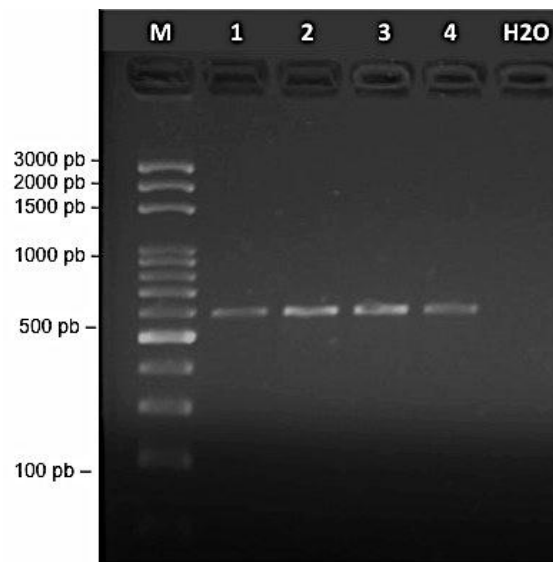
La Figura 15 muestra la extracción de ADN a partir de insectos adultos de *B. cockerelli*. En total se aisló el ADN de 350 individuos. La concentración y pureza del ADN aislado en promedio fue de 20 ng/uL y 2.00 respectivamente.



**Figura 15.** Gel de agarosa 1.4% (1-7) mostrando la extracción de ADN de *B. cockerelli*.

### 6.2.2. Amplificación de COI en *B. cockerelli*.

La Figura 16 muestra los resultados de amplificación de la región mitocondrial COI en *B. cockerelli* proveniente de: Nuevo León, Sinaloa, Guanajuato, Michoacán, Edo. de México, Morelos y Oaxaca. El tamaño de los fragmentos amplificados fue de aproximadamente 600 pb nucleotídicas.



**Figura 16.** Gel de agarosa 1.4% mostrando los productos de amplificación por PCR de la región mitocondrial citocromo oxidasa subunidad I (COI) en *B. cockerelli*. (M): marcador de peso molecular, (1-4): muestras de *B. cockerelli*, (H2O): Control negativo de la reacción de PCR.

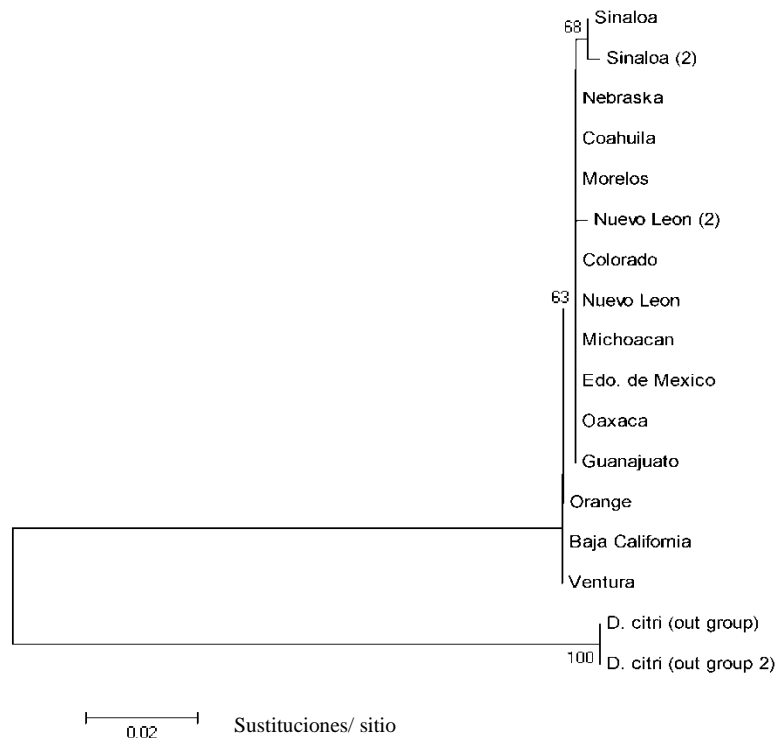
### 6.2.3. Alineamiento y análisis de las secuencias COI de *B. cockerelli*

Se obtuvieron y alinearon 43 secuencias de *B. cockerelli* provenientes de 7 Estados de México. Para el alineamiento de las secuencias de la región mitocondrial COI de *B. cockerelli* se seleccionó como grupo externo al psílido *Diaphorina citri*. Además de realizar un alineamiento con secuencias depositadas en GenBank

correspondientes a los trabajos de Liu *et al.* (2006) con *B. cockerelli* proveniente de Coahuila y Baja California México; Colorado, Nebraska, Orange County y Ventura, EUA (números de acceso AY971885 - AY971890).

Del total de 501 caracteres evaluados, se observaron 497 constantes, resultando un 0.8% de variación, habiendo una máxima diferencia entre variantes de 4 pb. Dicha variación se encontró principalmente entre las secuencias del presente estudio con respecto a las secuencias de *B. cockerelli* proveniente del noroeste de Estados Unidos de América, así como de la secuencia obtenida de *B. cockerelli* proveniente de Sinaloa.

A partir del alineamiento de secuencias, se realizó la construcción de un dendrograma utilizando el algoritmo de Neighbor Joining en MEGA versión 5. La Figura 17 muestra el árbol consenso donde el porcentaje de réplicas de los árboles en el cual se asoció *B. cockerelli* proveniente de diferentes regiones de México fue mediante una prueba bootstrap de 500 réplicas. Las ramas correspondiendo a las particiones reproducidas en menos del 50% de las réplicas bootstrap se colapsaron.

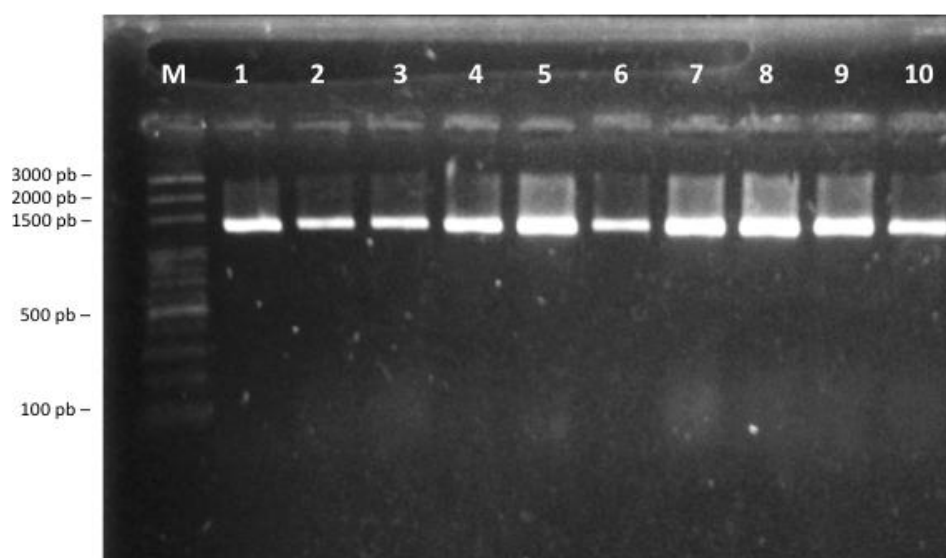


**Figura 17.** Árbol consenso Neighbor Joining para *B. cockerelli* a partir de secuencias COI. Los valores bootstrap que se reprodujeron en más del 50% de después de 500 réplicas se muestran en las ramas.

En el dendrograma (Figura 17) puede observarse como las secuencias obtenidas de *B. cockerelli* de Sinaloa, así como las secuencias obtenidas de GenBank correspondientes a *B. cockerelli* de Baja California, México y California, EUA; quedaron agrupadas en clados independientes.

#### 6.2.4. Amplificación de CytB en *B. cockerelli*.

La Figura 18 muestra los resultados de amplificación de la región mitocondrial CytB en *B. cockerelli* proveniente de: Nuevo León, Sinaloa, Guanajuato, Michoacán, Edo. de México, Morelos y Oaxaca. El tamaño de los fragmentos amplificados fue de aproximadamente 1300 pb nucleotídicas.



**Figura 18.** Gel de agarosa 1.4% mostrando los productos de amplificación por PCR de la región mitocondrial citocromo b (CytB) en *B. cockerelli*. (M): marcador de peso molecular, (1-10): muestras de *B. cockerelli*.

#### 6.2.5. Alineamiento y análisis de las secuencias CytB de *B. cockerelli*

Se alinearon y analizaron un total de 14 secuencias de la región CytB de *B. cockerelli*. En dicho análisis se seleccionó como grupo externo a la especie *Glycaspis brimblecombei* cuya secuencia se haya depositada en GenBank (AY601889) además de incluirse una secuencia de *B. cockerelli* depositada en GenBank con número de acceso AY601890 (Thao *et al.* 2004).

De los 1028 sitios evaluados, 999 permanecieron constantes resultando el 1.2% de variación, habiendo una máxima diferencia entre variantes de 12 pb. Dicha variación

se encontró principalmente entre las secuencias obtenidas en el presente estudio con respecto a la secuencia de *B. cockerelli* depositada en GenBank (AY601890).

A partir del alineamiento de secuencias, se realizó la construcción de un dendrograma utilizando el algoritmo de Neighbor Joining en MEGA versión 5. La Figura 19 muestra el árbol consenso después de un análisis bootstrap de 500 réplicas. Las ramas correspondientes a las particiones reproducidas en menos del 50% de las réplicas bootstrap se colapsaron. De dicho análisis podemos destacar el que la secuencia tomada del GenBank (AY601890) queda en un clado independiente, a diferencia de las poblaciones en estudio que resultaron en politomía.



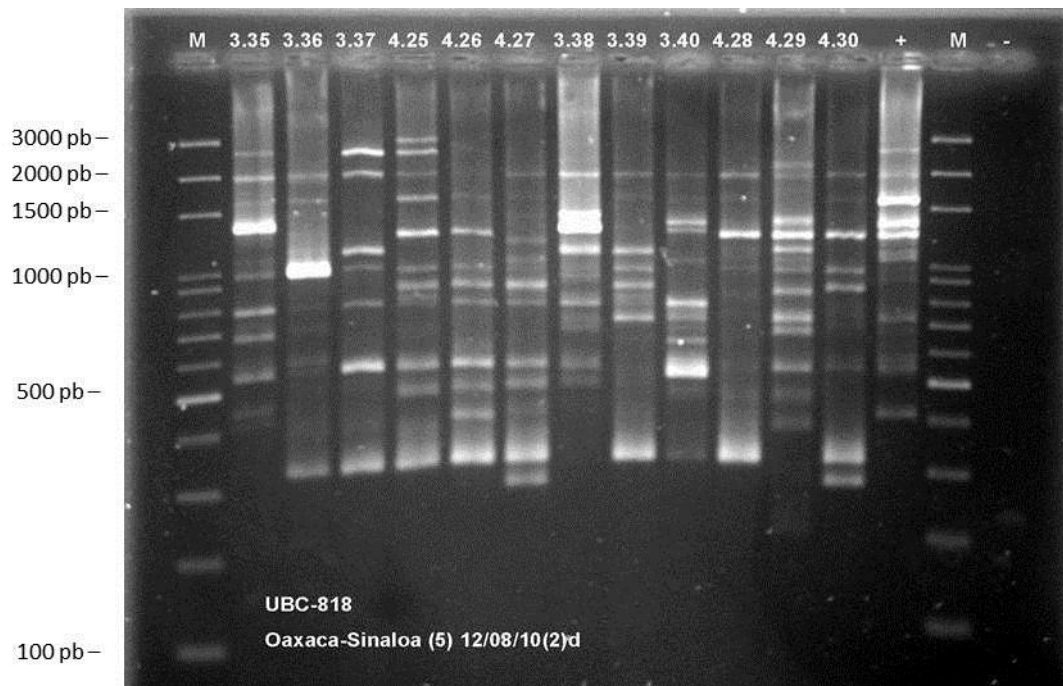
**Figura 19.** Árbol consenso Neighbor Joining para *B. cockerelli* a partir de secuencias CytB. Los valores bootstrap que se reprodujeron en más del 50% después de 500 réplicas se muestran en las ramas.

#### 6.2.6. Amplificación con marcadores ISSR

Los patrones de bandeo generados a partir de la amplificación con los 5 marcadores ISSR en *B. cockerelli* se muestran en las Figuras 20 a 24. Los 5 primers ISSR utilizados produjeron 172 loci (UBC-818: 31; UBC-847: 48; UBC-829: 29; UBC-873: 33 y UBC-841: 31) en 188 individuos correspondientes a 7 poblaciones de *B. cockerelli* de México. El tamaño de los fragmentos osciló entre 400 y 3000 pb.

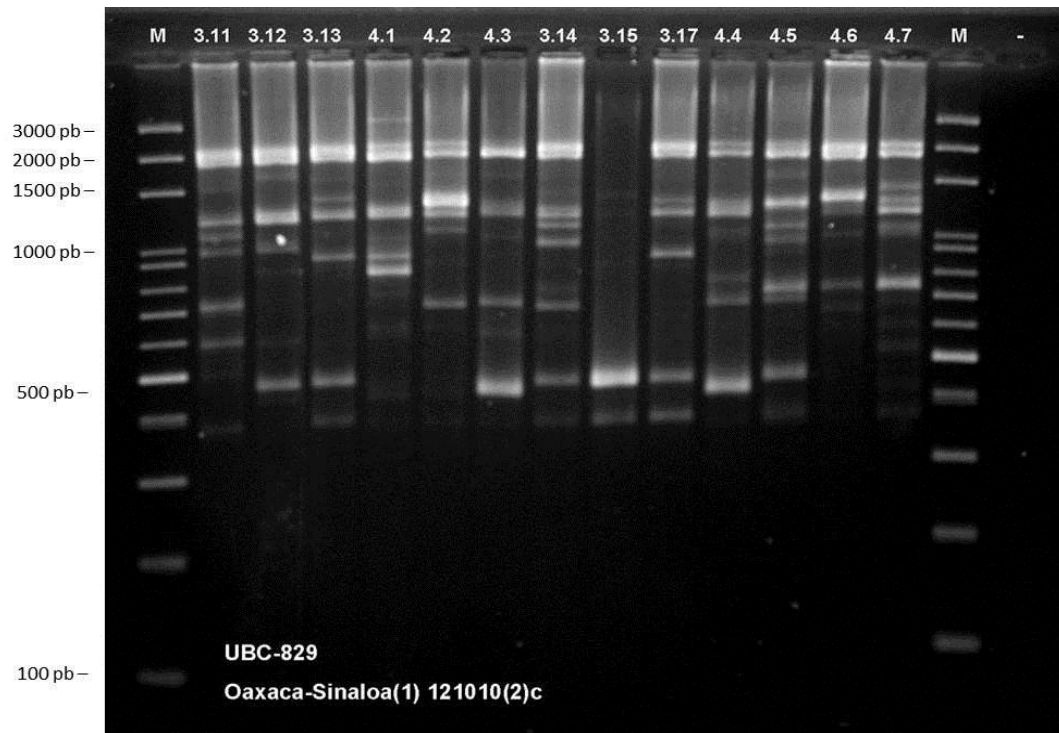
De los 172 loci amplificados la mayoría de las poblaciones estudiadas presentó más del 80% de loci polimórfico, siendo la población de Sinaloa la que presentó el

mayor porcentaje con 87.8%; mientras que la población con el menor porcentaje de loci polimórfico fue Michoacán con 69.2%. Los porcentajes de cada una de las poblaciones en estudio se muestran en la tabla 2.

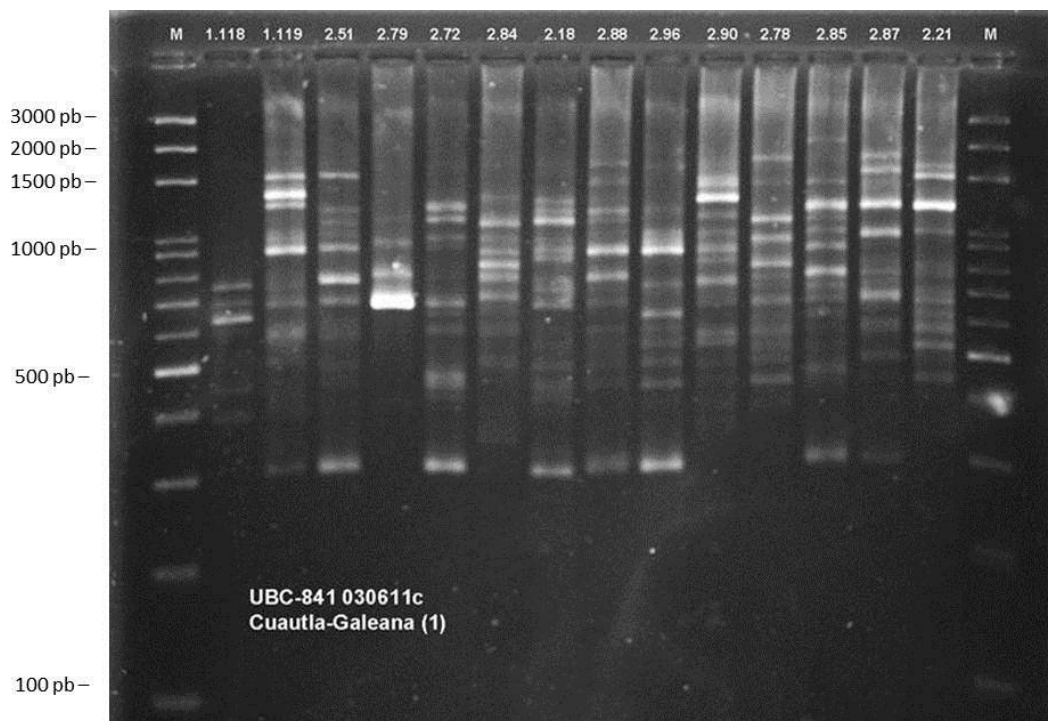


**Figura 20.** Gel de agarosa 2% mostrando los productos de amplificación por PCR con el marcador UBC-818 en *B. cockerelli*. (M): marcador de peso molecular, (3.35 - 4.30): muestras de *B. cockerelli*, (+) (-): controles positivo y negativo de la reacción de PCR.

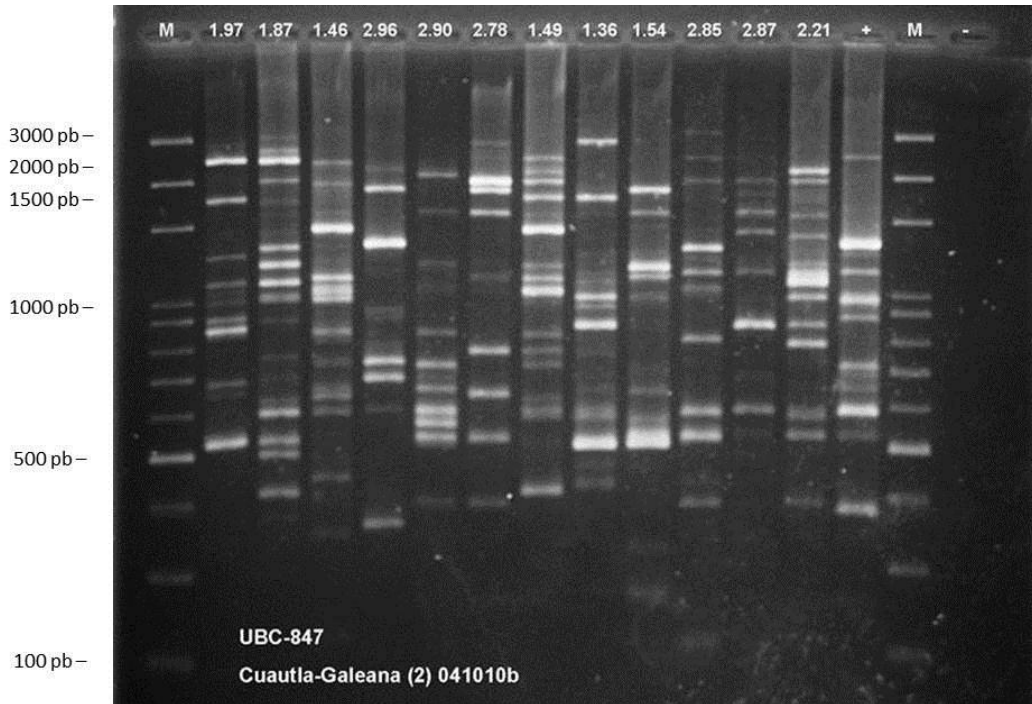




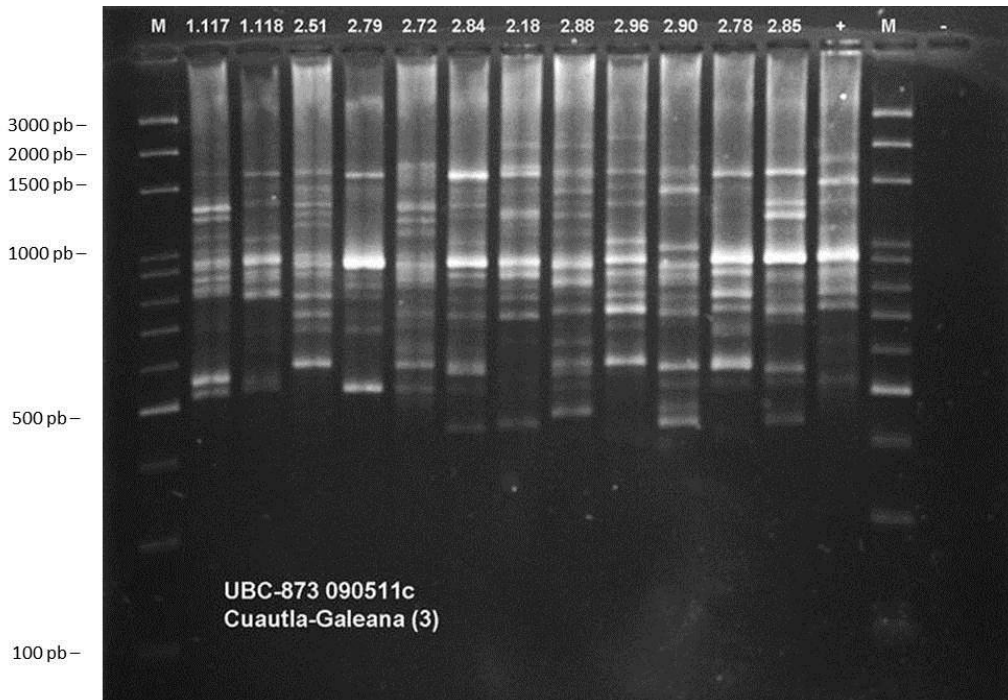
**Figura 21.** Gel de agarosa 2% mostrando los productos de amplificación por PCR con el marcador UBC-829 en *B. cockerelli*. (M): marcador de peso molecular, (3.11 - 4.7): muestras de *B. cockerelli*, (-): control negativo de la reacción de PCR.



**Figura 22.** Gel de agarosa 2% mostrando los productos de amplificación por PCR con el marcador UBC-841 en *B. cockerelli*. (M): marcador de peso molecular, (1.118 - 2.21): muestras de *B. cockerelli*.



**Figura 23.** Gel de agarosa 2% mostrando los productos de amplificación por PCR con el marcador UBC-847 en *B. cockerelli*. (M): marcador de peso molecular, (1.97 – 2.21): muestras de *B. cockerelli*. (+) (-): controles positivo y negativo de la reacción de PCR.



**Figura 24.** Gel de agarosa 2% mostrando los productos de amplificación por PCR con el marcador UBC-847 en *B. cockerelli*. (M): marcador de peso molecular, (1.117 – 2.85): muestras de *B. cockerelli*. (+) (-): controles positivo y negativo de la reacción de PCR.

**6.2.6.1. Variación genética.** Los estimadores de diversidad genética obtenidos para cada población se muestran en la Tabla 4. La población de Sinaloa tuvo una diversidad genética ligeramente más alta al mostrar los valores más altos de H e I (H = 0.1973, I = 0.3192). La menor diversidad genética se encontró en la población del Edo. de México (H = 0.1832, I = 0.2980).

De la misma forma se obtuvieron los valores de variación genética por marcador ISSR para todas las poblaciones, presentándose la mayor variación en el primer UBC-873, mientras que la menor variación genética para el total de las poblaciones se obtuvo con el primer UBC-847.

Los valores de diversidad para cada primer se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 4.** Estimadores de diversidad genética para cada una de las 7 poblaciones de *B. cockerelli* de México a partir de datos ISSR.

Población	N	Diversidad genética (H)	DE	Índice de Shannon (I)	DE	Porcentaje de loci polimórfico (P)
Morelos	30	<b>0.1907</b>	0.1542	<b>0.3102</b>	0.2169	<b>83.1%</b>
Nuevo León	30	<b>0.1854</b>	0.1525	<b>0.3032</b>	0.2149	<b>84.3%</b>
Oaxaca	30	<b>0.1971</b>	0.1621	<b>0.3179</b>	0.2234	<b>85.5%</b>
Sinaloa	31	<b>0.1973</b>	0.1615	<b>0.3192</b>	0.2206	<b>87.8%</b>
Guanajuato	30	<b>0.1903</b>	0.1604	<b>0.3082</b>	0.2228	<b>83.1%</b>
Edo.de México	27	<b>0.1832</b>	0.1552	<b>0.2980</b>	0.2228	<b>79.7%</b>
Michoacán	10	<b>0.1922</b>	0.1750	<b>0.3017</b>	0.2493	<b>69.2%</b>
<b>Total</b>	188	<b>0.2043</b>	0.1453	<b>0.3366</b>	0.1934	<b>100%</b>

N: Número de individuos utilizados en el análisis en cada población

DE: Desviación estándar

En gris se muestran los valores máximos de cada uno de los estimadores de diversidad y porcentaje de loci polimórfico.

**Tabla 5.** Estimadores de diversidad genética para cada uno de los marcadores ISSR utilizados en 7 poblaciones de *B. cockerelli* en México.

Marcador ISSR	Diversidad genética (H)	DE	Índice de Shannon (I)	DE
UBC-818	<b>0.1961</b>	0.1418	<b>0.3250</b>	0.1944
UBC-847	<b>0.1738</b>	0.1256	<b>0.2997</b>	0.1685
UBC-829	<b>0.1794</b>	0.1355	<b>0.6045</b>	0.1835
UBC-873	<b>0.2468</b>	0.1616	<b>0.3915</b>	0.2061
UBC-841	<b>0.2380</b>	0.1589	<b>0.3773</b>	0.2141

DE: Desviación estándar

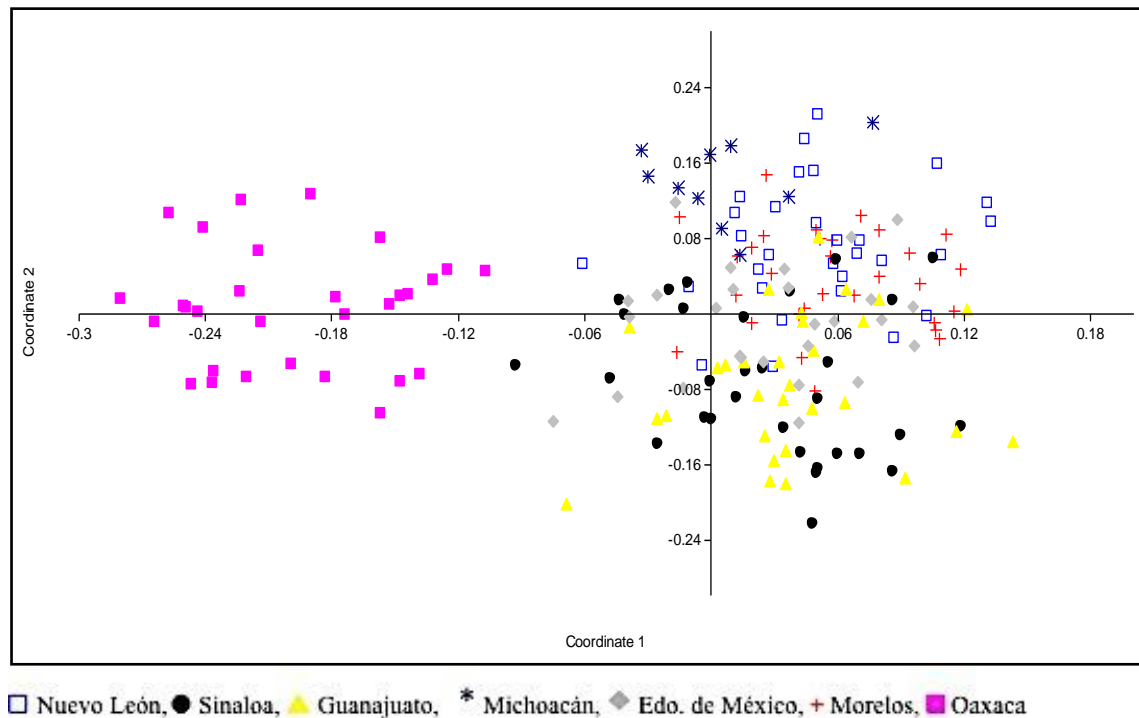
En gris se muestran los valores máximos de los estimadores de diversidad

Partiendo de los estimados de diversidad de Nei (1972) fue posible calcular el coeficiente de diferenciación genética ( $G_{st}$ ), el cual describe como la variación encontrada, es repartida entre las poblaciones en estudio. De la misma forma, dicho parámetro fue utilizado en el cálculo del flujo genético entre las poblaciones utilizando la siguiente fórmula:

$$Nm = 0.5 (1-G_{st})/G_{st}$$

El valor estimado de  $G_{st}$  entre las poblaciones de *B. cockerelli* fue de 0.0770, mientras que flujo genético calculado fue de 5.99 (Tabla 7).

**6.2.6.2. Distancia genética.** Con la finalidad de examinar la relación entre las 7 poblaciones de *B. cockerelli* con base en la distancia genética entre pares de poblaciones dado por el coeficiente de similitud de Jaccard se condujo el análisis de coordenadas principales (PCO). En el gráfico de PCO (Figura 25) puede distinguirse claramente como la población de *B. cockerelli* proveniente de Oaxaca se separa del resto de las poblaciones en un grupo distinto. Mientras que en la población de Michoacán se observa la tendencia a separarse del resto de las poblaciones en un grupo distinto.



**Figura 25.** Gráfico de coordenadas principales basado en la distancia de pares derivado del análisis de marcadores ISSR en siete poblaciones de *B. cockerelli*.

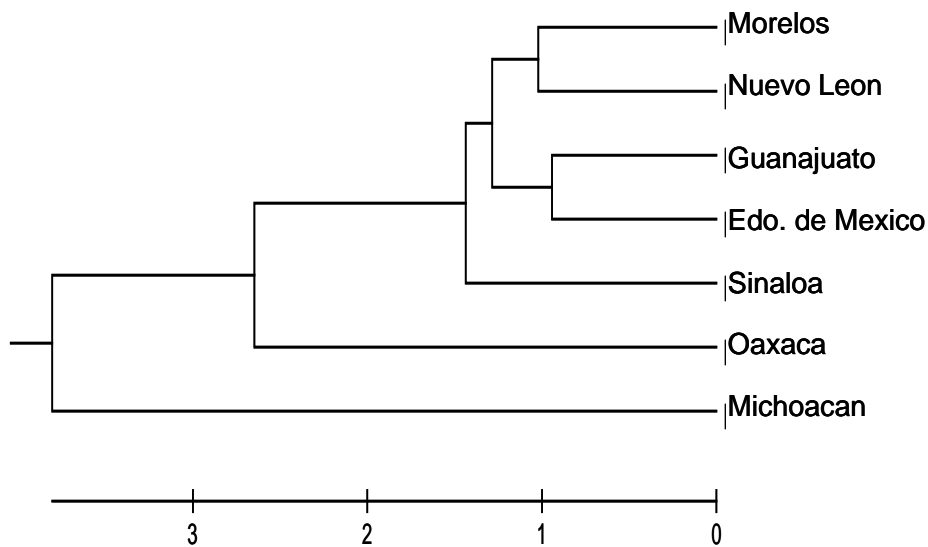
Además se calcularon las distancias genéticas de las poblaciones en base a la distancia no sesgada de Nei (1972) con el programa POPGEN ver.32 obteniendo una distancia mínima de 0.0099 y una máxima 0.0457, siendo la población del Edo. de México más cercana genéticamente a las poblaciones de Morelos y Guanajuato, mientras que las poblaciones de Michoacán y Oaxaca mostraron ser las más alejadas genéticamente. En la Tabla 5, debajo de la diagonal se pueden observar las distancias genéticas entre cada par de poblaciones.

Basados en las distancias genéticas dadas por el estadístico de Nei (Tabla 6) se construyó un dendrograma con el método UPGMA (Figura 26). En él, se muestran 5 grupos principales de poblaciones, el grupo 1 incluyendo a las poblaciones de Morelos y Nuevo León, el grupo 2 incluyendo las poblaciones Guanajuato y Edo. de México, el grupo 3 formado por la población de Sinaloa, el grupo 4 por Oaxaca y el grupo 5 más alejado genéticamente del resto de las poblaciones con la población de Michoacán.

**Tabla 6.** Medidas de identidad y distancia genética de Nei (1972) entre pares de poblaciones de *B. cockerelli*

Población	1	2	3	4	5	6	7
1	****	0.9898	0.9745	0.9851	0.9855	0.9901	0.9654
2	0.0103	****	0.9740	0.9836	0.9849	0.9894	0.9682
3	0.0259	0.0263	****	0.9753	0.9737	0.9777	0.9554
4	0.0150	0.0165	0.0250	****	0.9851	0.9855	0.9624
5	0.0146	0.0152	0.0267	0.0150	****	0.9902	0.9591
6	0.0099	0.0106	0.0226	0.0146	0.0099	****	0.9627
7	0.0352	0.0323	0.0457	0.0383	0.0418	0.0380	****

\*\*\*Por encima de la diagonal se muestra la identidad genética, mientras que debajo de la misma se muestra la distancia genética  
 Los valores mínimos y máximos de distancia genética entre poblaciones se muestran en color azul y rojo, respectivamente.



**Figura 26.** Dendrograma UPGMA basado en la distancia genética de Nei (1972) de poblaciones de *B. cockerelli* derivado del análisis de marcadores ISSR (Modificado del procedimiento NEIGHBOR de PHYLIP versión 3.5)

Dichos resultados se confirman al evaluar el grado de diferenciación y flujo genético existente entre las poblaciones dentro de los grupos formados. A diferencia del coeficiente de diferenciación genética obtenido entre todas las poblaciones (0.0770) este

fue menor entre las poblaciones de los grupos 1 y 2 (0.0216 y 0.0209 respectivamente). Por otro lado el flujo genético entre las poblaciones de Morelos y Nuevo León (grupo 1) es de 22.66, mientras que entre las poblaciones de Guanajuato y Edo. de México (grupo 2) el flujo genético es de 23.37, en ambos casos mayor al flujo genético encontrado entre todas las poblaciones. Las medidas de diversidad y diferenciación genética, como el porcentaje de loci polimórfico de los grupos formados se muestran en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Comparación de los estimadores de diversidad genética para cada uno de los marcadores ISSR utilizados en los grupos de poblaciones de *B. cockerelli*.

Población	Diversidad genética (H)	DE	Índice de Shannon (I)	DE	Porcentaje de loci polimórfico (P)	Coefficiente de diferenciación genética (Gst)	Flujo genético (Nm)
Oaxaca	0.1971	0.1621	0.3179	0.2234	85.5%		
Sinaloa	0.1973	0.1615	0.3192	0.2206	87.8%		
Michoacán	0.1922	0.1750	0.3017	0.2493	69.2%		
Grupo 1	0.1922	0.1486	0.3157	0.2062	90.7%	0.0216	22.66
Grupo 2	0.1909	0.1537	0.3124	0.2121	89.5%	0.0209	23.37
Total	0.2043	0.1453	0.3366	0.1934	100%	0.0770	5.99

DE: Desviación estándar

Grupo 1= poblaciones de Nuevo León y Morelos.

Grupo 2= poblaciones de Guanajuato y Edo. de México.

En el análisis de aislamiento por distancia realizado mediante la prueba de Mantel con el programa XLSTAT, los valores obtenidos de  $r = -0.118$  y  $p = 0.615$  indican que no hay una correlación significativa entre las distancias genéticas y las distancias geográficas presentes en cada par de poblaciones, es decir que las poblaciones en estudio no siguen un modelo de aislamiento por distancia (Figura 27). Tanto la distancia geográfica como genética entre pares de poblaciones se muestran en la Tabla 8.

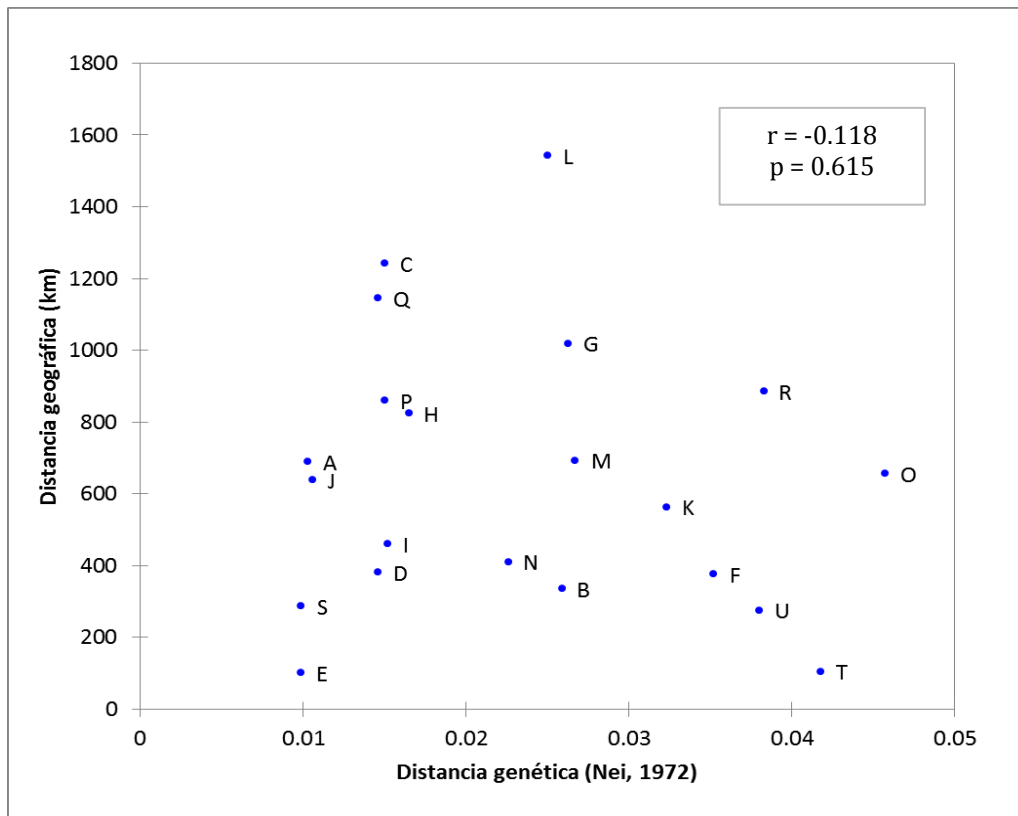
**Tabla 8.** Distancia geográfica (km) y genética (Nei, 1972) entre pares de poblaciones de *B. cockerelli*

<b>ID</b>	<b>Pares de poblaciones</b>		<b>Distancia geográfica (km)</b>	<b>Distancia genética</b>
A	Morelos	Nuevo León	688.6	0.0103
B	Morelos	Oaxaca	334.3	0.0259
C	Morelos	Sinaloa	1241	0.0150
D	Morelos	Guanajuato	381.1	0.0146
E	Morelos	Edo. México	101.2	0.0099
F	Morelos	Michoacán	375.8	0.0352
G	Nuevo León	Oaxaca	1019	0.0263
H	Nuevo León	Sinaloa	824.1	0.0165
I	Nuevo León	Guanajuato	459.7	0.0152
J	Nuevo León	Edo. México	638.4	0.0106
K	Nuevo León	Michoacán	563	0.0323
L	Oaxaca	Sinaloa	1542	0.0250
M	Oaxaca	Guanajuato	692.5	0.0267
N	Oaxaca	Edo. México	410.4	0.0226
O	Oaxaca	Michoacán	656.4	0.0457
P	Sinaloa	Guanajuato	859.8	0.0150
Q	Sinaloa	Edo. México	1145	0.0146
R	Sinaloa	Michoacán	885.8	0.0383
S	Guanajuato	Edo. México	286.2	0.0099
T	Guanajuato	Michoacán	104.3	0.0418
U	Edo. México	Michoacán	274.7	0.0380

**6.2.6.3. Estructura genética.** Para analizar la distribución de la variación genética jerárquicamente, se realizó el Análisis Molecular de Varianza (AMOVA), utilizando ARLEQUIN versión 3.1 (Schneider *et al.* 2000). Para dicho análisis se evaluó la variación dentro y entre poblaciones de los 5 grupos formados con base en los resultados obtenidos en el análisis de coordenadas principales y el dendrograma construido.

El AMOVA (Tabla 9) Usando los datos ISSR indicó que alrededor del 91.2% del total de la varianza podría ser explicada como diferencias dentro de las poblaciones ( $p < 0.001$ ), 3.4% de la variación es debida a diferencias entre poblaciones dentro de los grupos ( $p < 0.001$ ), mientras que el 5.4 % de la variación se debe a la diferenciación entre Oaxaca, Michoacán, Sinaloa y el resto de los grupos formados ( $p < 0.005$ ).





\*Las letras indican cada par de poblaciones (ver Tabla 6).

**Figura 27.** Prueba de Mantel para evaluar el aislamiento por distancia entre cada par de poblaciones, obtenida a partir de las distancias genéticas de Nei (1972) y las distancias geográficas (en Kilómetros).

**Tabla 9.** AMOVA basado en el análisis de marcadores ISSR a partir de siete poblaciones de *B. cockerelli*

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación (%)	p <sup>a</sup>
Entre grupos	4	373.578	1.37060	5.40	<0.005
Entre poblaciones dentro de grupos	2	96.974	0.86702	3.41	<0.001
Dentro de poblaciones	181	4192.150	23.16105	91.19	<0.001
Total	187	4662.702	25.39867		

<sup>a</sup> Niveles de significancia basado en 1000 iteraciones.

## 7. DISCUSIÓN

Determinar polimorfismos mitocondriales, los cuales son en su mayoría sustituciones puntuales, permite identificar diferentes haplotipos dentro de una población. Dicho análisis debería realizarse a partir del genoma completo mitocondrial. Sin embargo, a nivel de la población, estos enfoques no resultan prácticos debido al elevado número de muestras que puedan existir y a la presencia de regiones del ADN mitocondrial con poca variabilidad. Por tanto, es de utilidad definir los haplotipos mitocondriales mediante el estudio de las regiones más variables y más informativas en un número elevado de individuos (Salinas, 2010).

Ante este respecto resulta relevante destacar el estudio de regiones mitocondriales como *Citocromo Oxidasa subunidad I* (COI) o *Citocromo B(CytB)*, utilizados en el presente trabajo, como marcadores moleculares en el estudio de genética de poblaciones, ya que son genes con considerable variabilidad entre especies cercanamente relacionadas y poblaciones de la misma especie. Además, dichos genes son los más ampliamente utilizados en estudios de genética de poblaciones de animales, especialmente insectos (Kohnen *et al.* 2009).

COI tiene un rango similar de uso con respecto a otras regiones como ITS2 pero parece evolucionar más rápido. Navajas *et al.* (1998) encontraron una gran cantidad de polimorfismo en COI de *Tetranychus urticae*. Anderson y Trueman (2000) utilizaron COI para demostrar que *Varroa jacobsoni* es un complejo de dos especies morfológicamente indistinguibles infestando *Apis cerana*, únicamente una de las cuales (*Varroa destructor*) ha sido transferida a *Apis mellifera*. Toda (2000) utilizó una porción de 546 pb de COI para investigar las relaciones filogenéticas de especies del género *Panonychus* de Japón y Salomone *et al.* (2002) utilizaron una porción de 488 pb de este gen para examinar las relaciones entre diferentes miembros del género *Steganacarus* en las Islas Canarias.

En cuanto al gen mitocondrial CytB, Arias *et al.* (2005) evaluaron la variabilidad de dicho gen entre una colonia de Laboratorio de *Anopheles albimanus* Wiedemann fundada hace 20 años y la población del campo de la cual se derivó. Los análisis revelaron la presencia de 5 a 3 haplotipos en las poblaciones del campo y la colonia, respectivamente; los individuos del campo presentaron una mayor variabilidad que los de la colonia basada en el número de sitios polimórficos, diversidad haplotípica, nucleotídica y el valor promedio de las diferencias nucleotídicas.

En otros estudios CytB, es uno de los marcadores más empleados en el análisis genético de poblaciones y el estudio filogenético de especies de *Lutzomyia* (Pérez *et al.* 2008).

Lo antes mencionado indica que el haber seleccionado fragmentos de genes de COI y CytB deben ser adecuados para elucidar la estructura genética de las poblaciones de *B. cockerelli* en México. Sin embargo, y a pesar de la importancia y uso que se le ha dado a los genes COI y CytB como marcadores moleculares, en el presente trabajo la variación genética encontrada en *B. cockerelli* de México fue más baja de la esperada y los resultados obtenidos no fueron suficientes como para inferir por completo la estructura genética entre las poblaciones de estudio. Esto debido a que fueron pocos los puntos de mutación encontrados entre las poblaciones sometidas al análisis, por lo que al construir el árbol con el algoritmo Neighbor Joining la mayoría de las poblaciones de estudio resultaron en una politomía, es decir, que las poblaciones se agruparon en un solo nodo sin bifurcaciones o dicho de otra manera el nodo que agrupa a las poblaciones quedo sin resolver.

Cabe destacar, de manera particular que en el análisis de secuencias de COI donde se compararon las secuencias obtenidas en el presente estudio con las reportadas por Liu *et al.* (2006) y que corresponden a dos biotipos distintos, las secuencias de *B. cockerelli* procedente de Sinaloa, así como las correspondientes a las poblaciones del Noroeste de Estados Unidos de Norteamérica (consideradas pertenecientes al biotipo invasivo de EUA según Liu *et al.* 2006) quedaron agrupadas en dos clados independientes. Mientras que el resto de las poblaciones quedaron agrupadas con las secuencias del biotipo considerado nativo de EUA por Liu *et al.* (2006). Estos resultados podrían indicar el desarrollo de haplotipos distintos a los ya reportados por Liu *et al.* (2006) en la población de Sinaloa, así como el hecho de que las poblaciones de estudio no corresponden al biotipo considerado invasivo de EUA.

Por otro lado en el análisis de secuencias de CytB se compararon las secuencias de las poblaciones de estudio con respecto a una secuencia de *B. cockerelli* depositada en GenBank (AY601890). Al construir el árbol correspondiente y utilizando como algoritmo el método de Neighbor Joining, la secuencia de *B. cockerelli* (con número de acceso AY601890 en GenBank) queda en un clado independiente, fuera de la agrupación del resto de las secuencias de las poblaciones en estudio. Esta secuencia de *B. cockerelli* proviene de California, EUA, lo cual nos permite inferir nuevamente

que las poblaciones de estudio no corresponden al biotipo invasivo de EUA reportado por Liu *et al.* (2006).

El hecho de que los resultados generados a partir del análisis de secuencias no sean suficientes para estudiar genéticamente las poblaciones de *B. cockerelli* de México y poder inferir su estructura genética, pudiera deberse a que los fragmentos seleccionados tanto del gen COI como CytB no son de suficiente tamaño como para encontrar variabilidad en las poblaciones de estudio. Si tomamos como referencia el genoma mitocondrial completo del psílido *Pachypsylla venusta*, por ser una especie cercanamente relacionada a *B. cockerelli*, vemos que del total del mtADN (14711 pb), 1531 pb (10.4% del genoma mitocondrial total) corresponden al gen COI, mientras que 1136 pb (7.7% del genoma mitocondrial total) representan el gen CytB. En nuestro estudio el tamaño de los fragmentos utilizados en los análisis corresponden al 32.7% y 60.2% del gen COI y CytB, respectivamente, es decir solo el 8% del genoma completo mitocondrial. Probablemente al estudiar una mayor longitud de secuencia pudiéramos encontrar más sitios de mutación que nos permitan estudiar la variabilidad de las poblaciones de esta especie en México. Resulta importante destacar que las genealogías de genes no son inferidas sin error, pero con suficiente secuencia, el error en la reconstrucción de la genealogía del mtADN puede llegar a ser pequeño. Incluso en muchos estudios utilizan más de un gen individual para inferir un árbol genético con precisión. Esto se refleja en los bajos valores bootstrap vistos en muchos árboles filogeográficos. Cummings *et al.* (1995) encontró que valores bootstrap por debajo del 90% no reflejan la probabilidad de que un clado sea verdadero. Esto puede verse en el análisis de secuencias con COI pues los clados formados poseen valores bootstrap de 68% y 63% para los clados formados entre las secuencias de Sinaloa y las poblaciones del Noroeste de EUA, respectivamente.

Resultados similares los obtuvieron Liu y colaboradores (2006) al estudiar secuencias de COI pertenecientes a *B. cockerelli* proveniente del centro y oeste de EUA, así como de la parte oeste y este de México. De las 544 pb amplificadas, 543 pb permanecieron constantes en las poblaciones estudiadas; siendo este par de bases diferentes la causa de un cambio de aminoácido. Como consecuencia de la baja variación encontrada entre las secuencias de fragmentos amplificados, los autores concluyen que todas las poblaciones independientemente de su ubicación geográfica pueden ser consideradas de la misma especie.

Otra explicación a lo obtenido es que en algunos casos, especialmente cuando la escala de tiempo es pequeña, no podemos reconstruir con precisión el árbol genético de mtADN incluso con datos de secuencia completos, porque el número de mutaciones o diferencias en las poblaciones sería muy pequeño (Ballard y Whitlock, 2004).

Ante las pocas inferencias que de los resultados antes mencionados se pueden desprender, resulta indispensable la utilización de más marcadores moleculares que permitan elucidar la estructura genética en las poblaciones de estudio.

Es por ello que en el presente trabajo además de analizar secuencias de mtADN se buscó estudiar la variabilidad e inferir la estructura genética en las poblaciones de *B. cockerelli* de México mediante el uso de marcadores moleculares ISSR. Pues ya otros autores como Ballard y Whitlock (2004) argumentan que son necesarios más marcadores genéticos además del mtADN para resolver más cuestiones filogeográficas y cada vez son más los investigadores que comparan los resultados de combinaciones de marcadores genéticos, especialmente de herencia uniparental (como aquellos de mtADN) y los nucleares (Beebee y Rowe, 2008).

Los marcadores de ADN comúnmente utilizados en los análisis de genética de poblaciones basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), son los RAPD's, AFLP's y los SSR's o microsatélites, pero las mayores limitaciones de esas técnicas son la baja reproducibilidad de los RAPD's, el alto costo de los AFLP's y la necesidad de conocer la secuencia flanqueadora para diseñar los primers específicos de los microsatélites, siendo los marcadores ISSR quienes superan esas limitaciones (Colin, 2006).

Los ISSR's se utilizan confiablemente en los estudios de genética de poblaciones, ya que se heredan de manera mendeliana y experimentalmente son poco sensibles a variaciones en la concentración del primer y del ADN y son de fácil manejo (Colin, 2006). Además debido a la naturaleza cambiante de los sitios microsatélite, la técnica ISSR es más sensible a la detección de alta variabilidad genética entre poblaciones (Liu *et al.* 2006).

En lo que respecta a nuestro estudio, los marcadores ISSR resultaron ser una técnica simple, rápida y eficiente en el estudio de la genética de poblaciones de *B. cockerelli*, por ser reproducibles y por el alto polimorfismo visualizado fácilmente en geles de agarosa, obteniendo un total de 172 loci, cuyo peso molecular osciló entre 400 a 3000 pb para los 5 primers utilizados.

Partiendo del análisis de dichos marcadores ISSR es que pudimos medir la variación genética a través de sus componentes: diversidad, diferenciación y distancia genética.

Por un lado los estimadores de diversidad indicados por el índice de diversidad de Nei y el índice de Shannon varían entre 0-0.5 y 0-0.73 respectivamente cuando es utilizado el logaritmo natural (Lowe *et al.* 2004). En este estudio los valores obtenidos en las poblaciones de *B. cockerelli* caen dentro de este rango y fueron relativamente menores a los reportados por Jackson *et al.* (2009) cuando se estudió una población de *B. cockerelli* proveniente de Coahuila, México (H=0.3080 e I=0.4708). Sin embargo, nuestros resultados fueron superiores a los que Liu *et al.* (2006) reportan para Coahuila (H= 0.0551 e I=0.0976) y Baja California, México (H= 0.0498 e I=0.0925). En cuanto al porcentaje de loci polimórfico los valores que reportamos para las poblaciones de *B. cockerelli* en el presente estudio se encuentran entre los reportados por Liu *et al.* en 2006 (71.4% -75.2%) y Jackson *et al.* en el 2009 (97%) ambos en poblaciones de México.

Encontramos que el coeficiente de diferenciación genética ( $G_{st}$ ) entre nuestras poblaciones fue superior ( $G_{st}$ =0.0770) comparado a lo que reportan Jackson *et al.* en el 2009 ( $G_{st}$ =0.0513) en sus poblaciones de estudio. Sin embargo al analizar la diferenciación entre las poblaciones dentro de los grupos formados ( $G_{st}$ =0.021) encontramos valores menores a los reportados en los trabajos de estos mismos autores ( $G_{st}$ =0.037). El flujo genético ( $N_m$ ) entre las poblaciones del presente estudio fue de 5.99, el cual es bajo si lo comparamos con resultados de otros autores que trabajaron con poblaciones de *B. cockerelli* de otros Estados de México, EUA y Centroamérica (Liu *et al.* 2006; Jackson *et al.* 2009), sin embargo, el flujo genético que reportamos es suficiente al menos para no conducir la pérdida de variación y diferenciación genética. Se establece que si  $N_m$  es mucho mayor que 1, el flujo genético sobrepasa los efectos de la deriva e impide la diferenciación local. Si  $N_m$  es mucho menor que 1, la deriva actúa en forma casi independiente en cada población (Slatkin, 1994).

Una de las estrategias en el estudio de marcadores dominantes al estudiar la estructura poblacional es generar a partir de los datos una matriz de distancia genética. Esta información es posteriormente sujeta a un análisis fenético para producir una representación visual, que puede ser un árbol o un gráfico de coordenadas principales de las relaciones entre los individuos en la muestra (Hollingsworth y Ennos, 2004). La forma del árbol o el gráfico PCO representa la base para genética de poblaciones y

hacer inferencias acerca de las poblaciones de las cuales se originan los individuos. El agrupamiento de individuos de diferentes poblaciones en el mismo grupo o clado en un árbol se interpreta como evidencia del flujo genético entre estas poblaciones (Hollingsworth y Ennos, 2004). En nuestro análisis las poblaciones de Nuevo León (ubicada al norte de México) y de los estados del centro de México (Morelos, Guanajuato, y el Edo. de México) fueron agrupados dentro de un mismo clado en el dendrograma UPGMA. Lo cual se ve reflejado también en el flujo genético existente entre Nuevo León y Morelos de 22.66 y Guanajuato y el Edo. de México de 23.37. Este resultado podría deberse al hecho de que *B. cockerelli* migra al norte entrada la primavera al no tolerar las altas temperaturas y desaparecer los sitios de alimentación durante el verano (Liu *et al.* 2006). La evidencia de dichas migraciones ha sido reportada por Pletsch (1947) y confirmadas en los trabajos de Liu *et al.* (2006) y Jackson *et al.* (2009), las cuales son favorecidas en gran parte por el viento.

Por el contrario, individuos de diferentes poblaciones en grupos mutuamente exclusivos han sido tomados como evidencia del aislamiento genético de las poblaciones (Hollingsworth y Ennos, 2004). Esto puede observarse en las poblaciones de Sinaloa, Michoacán y Oaxaca, ubicadas al noroeste, suroeste y sureste respectivamente, las cuales de acuerdo al árbol UPGMA son genéticamente distintas entre sí y al resto de las poblaciones.

La población de Oaxaca fue la más alejada genéticamente de acuerdo al coeficiente de similitud de Jaccard que fue sujeto al análisis PCO. Dicha variación puede deberse a que la zona de donde se extrajeron los insectos se ve influenciada por la presencia de la Sierra Madre Oriental, en la porción este, la Sierra Madre del Sur y el Eje Neovolcánico. Tales regiones fisiográficas pudieran fungir como barrera geográfica impidiendo la migración de *B. cockerelli* de Oaxaca al norte del país y con ello disminuir el flujo genético entre estos y el resto de las poblaciones de estudio. La poblaciones de Sinaloa y Michoacán, por su parte al ubicarse en la porción noroeste y suroeste de México respectivamente, son otros los factores que se ven involucrados en sus patrones migratorios como pudiera ser la dirección de los vientos y las condiciones climáticas y orográficas de la región.

Destacamos que las poblaciones en estudio no siguen un patrón de aislamiento por distancia, esto de acuerdo a la prueba de Mantel (1967), ya que los valores obtenidos no fueron significativos para determinar que existe una correlación positiva

entre la distancia genética de Nei (1972) y la distancia geográfica entre las poblaciones analizadas.

Encontramos que la variación dentro de las poblaciones de *B. cockerelli* fue alta y concuerda con estudios previos en este insecto. Por otro lado, el grado de variación entre los grupos predefinidos con base al patrón de agrupación mostrado en el dendrograma UPGMA (Fig. 3) fue bajo (5.4%) pero estadísticamente significativo. Dichos resultados son similares a los obtenidos por Jackson *et al.* (2009) al examinar la variación genética entre poblaciones de *B. cockerelli* proveniente de México, Estados Unidos de Norteamérica y Guatemala. Ellos indicaron que 5.3% de la variación genética puede ser explicada por diferencias entre el grupo 1 formado por las poblaciones de México y Estados Unidos y el grupo 2 correspondiendo a la población de Guatemala. Con este resultado evidencian las migraciones de *B. cockerelli* al norte durante la primavera ayudados por los vientos monzones del Golfo de México, indicando también que pudieran existir barreras geográficas entre Guatemala y México que impiden estas migraciones (Jackson *et al.* 2009). Liu *et al.* (2006) por su parte encontraron que solo el 1.14% de la variación genética existente puede deberse a diferencias entre el grupo 1 formado por las poblaciones de *B. cockerelli* de Orange County, Ventura County (EUA) y Baja California (México) y el grupo 2 incluyendo a las poblaciones del centro de Estados Unidos y noreste de México. Dicho análisis basado también en marcadores ISSR indicó el desarrollo de un nuevo biotipo de este insecto que se ha adaptado al oeste de Norteamérica (Liu *et al.* 2006).

Una posibilidad del reciente resurgimiento de *B. cockerelli* en el oeste de Norteamérica en general es el incremento estacional de la temperatura, la cual podría favorecer la supervivencia espacial y temporal del insecto en lugares donde había sido incapaz de sobrevivir hasta ahora (Abdullah, 2008). Probablemente esto ocurra con las poblaciones de Sinaloa, Michoacán y Oaxaca, las cuales pudieran corresponder a biotipos distintos a los ya reportados de *B. cockerelli*.

Las implicaciones en la existencia de nuevos biotipos radican en la habilidad que estos pudieran tener al transmitir los patógenos asociados (Abdullah 2008, Jackson *et al.* 2009) así como el hecho de que la historia de vida y la preferencia de hospederos pudieran cambiar (Abdullah 2008). Esto ha sido evidenciado en estudios basados en la diferenciación genética de los dos biotipos de *B. cockerelli* donde se demostró que poblaciones nativas (Texas) poseen mayor supervivencia, alto índice de crecimiento y requiere de tiempos más cortos para su desarrollo a diferencia de poblaciones invasivas



(California). Sin embargo los psílidos de las poblaciones invasivas prefirieron alimentarse de plantas de tomate mostrando en ellas mayor supervivencia e índice de crecimiento (Liu y Trumble, 2007).

## 8. CONCLUSIONES

Las secuencias de los fragmentos mitocondriales de los genes COI y CytB obtenidas a partir de *B. cockerelli* de México mostraron muy poca variación, indicando que las poblaciones estudiadas corresponden a la misma especie. A pesar de la poca variación genética encontrada con dichos marcadores mitocondriales, los resultados soportan la hipótesis que las poblaciones en estudio no corresponden al biotipo *B. cockerelli* invasivo en EUA, al agruparse en clados independientes a los de las poblaciones del Noroeste de EUA.

Los ISSR's resultaron ser una técnica eficaz en el análisis de genética de poblaciones, por ser específicos, reproducibles y por el alto polimorfismo encontrado, pues en nuestro estudio más del 80% de los loci fueron polimórficos.

Las medidas de distancia genética indicaron que *B. cockerelli* proveniente de Oaxaca, Michoacán y Sinaloa están más alejadas genéticamente entre sí y con respecto a las poblaciones del noreste y centro de México. Siendo estas últimas más cercanas genéticamente y existiendo entre ellas un flujo genético significativo permitiendo que las poblaciones se mantengan interconectadas genéticamente evidenciando con ello las migraciones primaverales que esta especie realiza al norte.

Los resultados del análisis de aislamiento por distancia nos indican que no hay una correlación significativa entre las distancias genéticas y las distancias geográficas presentes entre cada par de poblaciones, es decir que esta especie no sigue un modelo de aislamiento por distancia.

A pesar de la baja variación encontrada entre las poblaciones del norte y centro de México con respecto a Oaxaca, Michoacán y Sinaloa, esta fue significativa, lo cual es evidencia del posible surgimiento de nuevos biotipos en estas regiones del país.

Estudios futuros sobre la biología de *B. cockerelli* en estas regiones geográficas son necesarios para elucidar si la variación genética encontrada en este estudio repercute en la capacidad de este insecto de transmitir los patógenos a los que ha sido asociado o bien en los ciclos de desarrollo y/o preferencia de hospederos.

## 9. LITERATURA CITADA

Abdullah N. 2008. Life history of the Potato Psyllid *Bactericera cockerelli* (Homoptera: Psyllidae) in Controlled Environment agriculture in Arizona. African Journal of Agricultural Research 3(1): 60-67.

Abernathy R. 1991. Investigations into the nature of the potato psyllid *Paratrioza cockerelli* (SULC). M. Sc. Thesis, Colorado State University, Fort Collins, CO, pp. 54.

Al-Jabar A. 1999. Integrated pest management of tomato/potato psyllid, *Paratrioza cockerelli* (SULC) (*Homoptera, psyllidae*) with emphasis on its importance in greenhouse grown tomatoes. Ph.D. Dissertation, (Internet download). Colorado State University, Fort Collins, CO, pp.89.

Almeyda L, Rubio C, y Zavala Q. 1999. Determinación de la implicación de fitoplasmas con la expresión sintomatológica de punta morada en papa (*Solanum tuberosum*). IV Simposio de Ciencia y Tecnología. Desarrollo Agropecuario. SEP-CONACYT. Monterrey, Nuevo León, México, pp. 45.

Almeyda L, Rocha P, Piña R, and Martinez S. 2001. The use of polymerase chain reaction and molecular hybridization for detection of *Phytoplasma sp.* in different plant species in Mexico. Revista Mexicana de Fitopatología 19:1-9.

Almeyda I, Sanchez J, and Garzon J. 2008. Vectors Casual of Potato Purple top in Coahuila and Nuevo Leon, Mexico. Agricultura Tecnica Mexicana 34 (2): 141-150.

Anderson D, and Trueman J. 2000. *Varroa jacobsoni* (Acari; Varroidae) is more than one species. Experimental and Applied Acarology 24: 165-189.

Arias L, Bejarano E, Marquez E, Moncada J, Velez I, and Uribe S. 2005. Mitochondrial DNA divergence between wild and laboratory populations of *Anopheles albimanus* Wiedemann (Diptera: Culicidae). Neotropical Entomology 34: 499-506.

Arslan A, Bessey P, Matsuda K. and Oebker N. 1985. Physiological effect of psyllid on potato. American Potato Journal 62:9-22.

Ballard J, y Withlock M. 2004. The incomplete natural history of mitochondria. Molecular Ecology 13: 729-744.

Becerra A. 1986. Biología de *Paratrioza cockerelli* (Sulc) y su relación con la enfermedad permanente del tomate en el Bajío. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Querétaro, México. Facultad de Química, pp. 55.

Beebe T, and Rowe G. 2008. An introduction to molecular ecology. New York: Oxford University Press Inc, pp. 400.

Blood H, Richards B, and Wann F. 1933. Studies of psyllid yellows of tomato. *Phytopathology* 23:930.

Cadena M, Guzman R, Diaz M, Zavala T, Magaña O, Almeyda I, Lopez H, Rivera A, and Rubio O. 2003. Distribución, Incidencia y Severidad del Pardeamiento y la Brotación Anormal en los tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) en Valles Altos y Sierras de los Estados de Mexico, Tlaxcala y el Distrito Federal, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21(3): 248-259.

Carter W. 1939. Injuries to plants caused by insect toxins *Botanical Review* 5: 273-326.

Carter R. 1950. Toxicity of *Paratrioza cockerelli* to certain solanaceous plants. PhD dissertation, University of California.

Chapman R. 1985. Insects that poison plants. *American vegetables grower* 33: 31-38.

Chia J. 2009. Caracterización molecular mediante marcadores ISSR de una colección de 50 árboles clonales e híbridos de cacao (*Theobroma cacao* L.) de la UNAS-Tingo María. Tesis Maestría. Universidad Nacional Mayor De San Marcos, Facultad De Ciencias Biológicas, pp. 118.

Colin R. 2006. Análisis de la diversidad genética y estructura Poblacional de agave *Xylonacantha* (Agavaceae) utilizando "Inter Simple Sequence Repeat" (ISSR) como Marcador Molecular. Tesis Biol. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias, pp. 62.

Crawford D. 1911. American Psyllidae III. (Triozinae). *Pomona Journal of Entomology* 3: 422-453.

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

Cummings M, Otto S, and Wakeley J. 1995. Sampling properties of DNA sequence data in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution* 12:814-822.

Díaz, G, Tejada E, y Avalos A. 2005. Efecto de insecticidas biorracionales y mezclas de hongos sobre *Bactericera cockerelli* (Sulc) (Homoptera: Psyllidae). *Entomología Mexicana* 5: 539-541.

Díaz M, Cadena M, Rojas R, Zavaleta E, Ochoa D, and Muñoz R. 2010. Etiología y Efecto en genotipos del pardeamiento y la brotación anormal asociado con fitoplasmas en tubérculos de papa. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 1 (4): 525-540.

Diehl S, y Bush. G. 1984. An Evolutionary and Applied Perspective of Insect Biotypes. *Annals of the Entomological Society* 29: 471- 504.

Drés M. and Mallet J. 2002. Host races in plant-feeding insects and their importance sympatric speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of Science* 357: 471-492.

Eguiarte L, Souza V, y Aguirre X. 2007. *Ecología Molecular*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. UNAM. México, pp. 594.

Endler, J. 1977. *Geographic Variation, Speciation and Clines*. Princeton: Princeton University Press.

Excoffier L, Smouse P. and Quattro J. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.

Felsenstein J. 1993 PHYLIP (phylogeny inference package), version 3.5c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, WA, EUA.

Ferguson G, and Shipp L. 2002. New pests in Ontario greenhouse vegetables. *Bulletin-OILB/SROP*, pp. 69-72.

Garzón J. 1984. Enfermedad del "Permanente" del jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en Celaya, Guanajuato XI Congreso Nacional de Fitopatología. San Luis Potosí, S. L. P. Resúmenes, Sociedad Mexicana de Fitopatología, pp. 138.

Garzón J, Becerra F, Marín A, Mejía A, y Byerly M. 1992. Manejo integrado de la enfermedad "Permanente del tomate" (*Lycopersicon lycopersicum* Karst ex Fawll Mill.), en el Bajío. *In*: Urías, C., R. Rodríguez, y T. Alejandro (eds). *Afidos como vectores de virus en México*. Colegio de Postgraduados, Centro de Fitopatología, pp. 116-129.

Garzón J. 2003. El pulgón Saltador o la Paratrioza, una amenaza para la horticultura de Sinaloa. *In*: Memoria del Taller sobre *Paratrioza cockerelli* Sulc. como plaga y vector de fitoplasmas en hortalizas. Culiacán, Sinaloa. México, pp. 9-12.

Garzón J, Cardenas O, Bujanos R, Marin A, Becerra A, Velarde S, Reyes C, Gonzalez M, and Martínez J. 2009. Association of Hemiptera: Triozidae with the disease "permanente del tomate" in Mexico. *Agricultura Tecnica Mexicana* 35: 58-69.

Hamm P, Crosslin J, Pelter G, and Jensen A. 2003. Potato purple top or psyllid yellows, what was the problem in 2002, and how might it be controlled? *Potato Prog.* 3: 1-3.

Hammer Ø, Harper D, and Ryan P. 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontol. Electron.* 4(1): 9. [http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm)

Hansen A, Trumble J, Stouthamer R, and Paine T. 2008. New Huanglongbing (HLB) Candidatus species, "C. *Liberibacter psyllaurosus*", found to infect tomato and

potato is vectored by the psyllid *Bactericera cockerelli* (Sulc). *Applied and Environmental Microbiology* 74(18): 5862-5865.

Hollingsworth P. and Ennos R. 2004. Neighbour joining trees, dominant markers and population genetic structure. *Heredity* 92: 490-498.

Hoy M. 1994. *Insect molecular genetics*. Academic Press Inc. pp. 546.

James A, and Ballard J. 2003. Mitochondrial genotype affects fitness in *Drosophila simulans*. *Genetics*. 164: 187-194.

Jackson B, Goolsby J, Wyzykowski A, Vitovksy N, and Bextine B. 2009. Analysis of Genetic Relationships between Potato Psyllid (*Bactericera cockerelli*) Populations in the United States, Mexico and Guatemala Using ITS2 and Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Data. *Subtropical Plant Science* 61:1-5.

Kambhampati S, and Smith P. 1995. PCR primers for the amplification of our insect mitochondrial gene fragments. *Insect Molecular Biology* 4(4): 233-236.

Knowlton G, Janes M. 1931. Studies on the biology of *Paratrioza cockerelli* (Sulc). *Annals of the Entomological Society of America* 24: 283-291.

Kocher T, Thomas W, and Meyer A. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplifications and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 86: 6196-6200.

Kohnen A, Wissemann V, and Brandl R. 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.

Lee C. 2002. Evolutionary genetics of invasive species. *Trends in Ecology and Evolution* 17(8): 386-391.

Lewter, J, Szalanski A, Nagoshi R, Meaguer R, Owens C, y Luttrell R. 2006. Genetic variation within and between strains of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Florida Entomologist* 89(1): 63-67.

Liefting L, Pérez Z, and Clover G. 2008. A New “Candidatus Liberibacter” species in *Solanum tuberosum* in New Zealand. *Plant Disease* 92(10):1474.

Liu D, and Trumble J. 2004. Tomato psyllid behavioral responses to tomato plant lines and interactions of plant lines with insecticides. *Journal of Economic Entomology* 97:1078- 1085.

Liu D, and Trumble J. 2005. Interactions of plant resistance and insecticides on the development and survival of *Bactericera cockerelli* (Sulc) (Homoptera, Psyllidae) *Crop Protection* 24:111-117.

Liu D, Trumble J, and Stouthamer R. 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 D, and Trumble J, 2007. Comparative fitness of invasive and native populations of the potato psyllid (*Bactericera cockerelli*). *Entomologia Experimentalis et Applicata* 123: 35-42.

López L, Sánchez O, Klevezas L, Soriano M. 2002. Multiple phytoplasmas associated with potato diseases in Mexico. *Canadian Journal of Microbiology* 48: 1062-1068.

Lowe A, Harris S, and Ashton P. 2004. *Ecological Genetics: Design, Analysis, and Applications*. Blackwell Science Ltd. EUA, pp. 326.

Mantel N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209-220.

Maramorosch K. 1988. Potato purple top wilt Entomology Department, Cook College, Rutgers- The State University. NJ, EUA, pp. 456.

Maramorosch K. 1998. Current status of potato purple top wilt. *International Journal of Tropical Plant Disease* 16:61-72.

Marshall D, and Allard R. 1970. Maintenance of Isozyme Polymorphisms in Natural Populations of *Avena barbata*. *Genetics* 66: 393-399.

McDermott J, and McDonald B. 1993. Gene Flow in Plant Pathosystems. *Annual Review of Phytopathology* 31: 353-373.

Mena C. 2004. Manejo integrado de los insectos plaga del chile. En: Curso-Taller Producción y Manejo Integral del Cultivo del Chile. Consejo Nacional de Productores de Chiles, S.C. Zacatecas, México, pp. 22-30.

Miles, P. W. 1999. Aphid saliva. *Biological Reviews* 74, 41-85.

Moran P, and Thompson G. 2001. Molecular responses to aphid feeding in *Arabidopsis* in relation to plant defense pathways. *Plant Physiology* 125:1074-1085.

Moriyama E, and Powell J. 1997. Synonymous substitution rates in *Drosophila*: mitochondrial versus nuclear genes. *Journal of Molecular Evolution*. 45:378-391.

Munyaneza J, Crosslin J, and Upton J. 2007. Association of *Bactericera cockerelli* (Homoptera: Psyllidae) with 'Zebra Chip', a New Potato Disease in Southwestern United States and Mexico. *Journal of Economic Entomology* 100(3): 656-663.

Munyaneza J, Buchman J, Upton J, Goolsby J, Crosslin J, Bester G, Miles G. and Sengoda V. 2008. Impact of Different Potato Psyllid Populations on Zebra Chip

Disease Incidence, Severity and Potato Yield. *Subtropical Plant Science* 60:27-37.

Nagoshi R, Silvie P, Meagher Jr. R, Lopez J, y Machado V. 2007a. Identification and comparison of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) host strains in Brazil, Texas, and Florida. *Annals of the Entomological Society of America* 100: 394- 402.

Nagoshi R, Silvie P, y Meagher R. 2007b. Comparison of haplotype frequencies differentiate fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) corn-strain populations from Florida and Brazil. *Journal of Economic Entomology* 100(3): 954-961.

Navajas M, Lagnel J, Gutierrez J, and Boursot P. 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.

Nei M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist* 106:282–283.

Nei M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences, EUA* 70: 321–3323.

Parga V, Zamora M, Borrego F, Covarrubias J, López A, y Almeyda H. 2011. Evaluación, Selección y Caracterización de Genotipos de papa tolerantes al Síndrome de Punta Morada. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 29 (1):15-24.

Pérez A, Bejarano E, Sierra D, y Vélez I. 2008. Caracteres moleculares para la determinación taxonómica de tres especies de *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae), vectores potenciales de *Leishmania* presentes en el Valle de Aburrá, Colombia. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina* 67 (3-4): 99-108.

Pletsch D. 1947. The potato psyllid *Paratrioza cockerelli* (Sulc), its biology and control. *Montana Agricultural Experiment Station Bulletin* 446:1-95.

Prusak B, Grzybowski T, and Bednarek J. 2005. Cytochrome b gene (cytb) in analysis of anonymous biological traces and its application in veterinary diagnostics and animal conservation. *Animal Science Papers and Reports* 23(4): 229-236.

Richards B. and Blood H. 1933. Psyllid yellows of the potato. *Journal of Agricultural Research* 46:189–216.

Romney V. 1939. Breeding areas of the tomato psyllid, *Paratrioza cockerelli* (Sulc). *Journal of Economic Entomology* 32:150-151.

Rubio C, Almeyda L, Ireta M, Sánchez S, Fernández S, Borbón S, Díaz H, Garzón T, Rocha R, y Cadena H. 2006. Distribución de la punta morada y *Bactericera cockerelli* Sulc., en las principales zonas productoras de papa en México. *Agricultura Técnica Mexicana* 32(2):161-171.



Rubio C, Almeyda L, Cadena H, and Lobato S. 2011. Relation between *Bactericera cockerelli* and presence of *Candidatus Liberibacter psyllae* in commercial fields of potato. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 2(1): 17-28.

Salas M. 2006. Eficiencia de insectos vectores en la transmisión de fitoplasma de la punta morada de la papa. Tesis de Maestría. UAAAN. Saltillo, Coahuila, México, pp. 49.

Salinas H. 2010. Identificación de haplotipos de *Spodoptera frugiperda* en algunas poblaciones de Colombia para el estudio del comportamiento migratorio de la especie. Tesis. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Facultad de Ciencias, pp. 93.

Salomone, N, Emerson, B, Hewitt G, and Bernini F. 2002 Phylogenetic relationships among the Canary Island Steganacaridae (Acari, Oribatida) inferred from mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Ecology* 11: 79.

Schneider S, Roessli D, and Excoffier L. 2000. ARLEQUIN, version 2.000: a software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Geneva, Switzerland.

Secor G, Rivera V, Abad J, Lee M, Clover G, and Liefting L. 2009. Association of *Candidatus Liberibacter solanacearum* with Zebra Chip disease of potato established by graft and psyllid transmission, electron microscopy and PCR. *Plant Disease* 93(6):574-586.

Slatkin M. 1994. Gene flow and population structure. *Ecological Genetics*. L. Real Princeton.

Sulc K. 1909 . *Trioza cockerelli* n.sp. *Acta Societatis Entomologicae Bohemiae* 4: 110-116.

Templeton A. 2006. Populations genetics and micro evolutionary theory. Chapter 1: Scope and Basic Premises of Population Genetics. Eds. John Wiley & Sons, Inc. pp. 700.

Thao M, Clark M, Burckhardt D, Moran N, and Baumann P. 2004 Phylogenetic analysis of vertically transmitted psyllid endosymbionts (*Candidatus Carsonella ruddii*) based on atpAGD and rpoC: Comparisons with 16S-23S rDNA-derived phylogeny. *Current Microbiology* 42: 419-421.

Toda S, Osakabe M, and Komazaki S. 2000. Interspecific diversity of mitochondrial COI sequences in Japanese *Panonychus* species (Acari: Tranychidae). *Experimental and Applied Acarology* 24:821-829.

Tsutsui N, Suarez A, Holway D, and Case T. 2000. Reduced genetic variation and the success of an invasive species. *Proceedings of the National Academy of Science* 97: 5948-5953.

Van Meer M, Witteveldt J, and Stouthamer R. 1999. Phylogeny of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* based on the *wsp* gene. *Insect Molecular Biology* 8: 399-408.

Weising K, Nybom H, Wolff K, and Kahl G. 2005. *DNA Fingerprinting in plants: Principles, Methods and Applications*. Taylor & Francis Group. CRC press. EUA, pp. 444.

Wright S. 1931. Evolution in Mendelian Populations. *Genetics* 16: 97-158.

Yeh F, Yang R, Boyle T, Ye Z, and Mao J. 1997. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. *Molecular Biology and Biotechnology Center*. University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada.

## APENDICE

### PROTOCOLO DE EXTRACCION DE ADN EN *Bactericera cockerelli* UTILIZANDO CTAB

- a) Colocar un insecto adulto en tubos 1.5 ml y agregar 150 µl de buffer de extracción CTAB
- b) Con ayuda de un pistilo macerar el insecto para después agregar 150 µl más de buffer CTAB procurando enjuagar el pistilo.
- c) Incubar a 65° C durante 1 hora mezclando por inmersión cada 20 min.
- d) Agregar un volumen de cloroformo y centrifugar por 10 minutos a 10000 rpm.
- e) Separar el sobrenadante ( 240 µl aprox.) en un tubo nuevo y agregar 0.5 volúmenes de Acetato de amonio
- f) Incubar en hielo por 10 minutos
- g) Agregar 0.6 volúmenes de alcohol isopropilico e incubar a -20° C durante toda la noche.
- h) Centrifugar por 20 minutos a 10000 rpm.
- i) Decantar y agregar 200 µl de EtOH 70% centrifugando durante 5 minutos a 13000 rpm (lavado) este paso se realiza 2 veces.
- j) Dejar secar y re suspender en 60 µl de TE 1X.

Nota: Tanto el cloroformo como el etanol deben estar fríos

#### BUFFER DE EXTRACCION (CTAB)

- CTAB 250 mg
- ddH<sub>2</sub>O 7.2 ml
- 1M Tris 1.25ml
- 5M NaCl 7.0 ml
- 0.5 EDTA 500 µl
- β- mercaptoetanol 25 µl

Nota: El β- mercaptoetanol agregarlo justo antes de EUAr.

#### 1M Tris pH 8.0

- 121.2 g Tris
- Disolver en 700 ml de dH<sub>2</sub>O
- Llevar a pH 8.0 agregando HCl (50 ml aprox.)
- Completar el volumen a 1L con dH<sub>2</sub>O

#### 5M NaCl

- 292.2g de NaCl
- 700 ml de H<sub>2</sub>O
- Disolver poco a poco y llevar a 1L

#### 0.5 M EDTA

- 186.12g EDTA

- 16 – 18g de NaOH pellets
- Ajustar pH a 8.0, solo se disolverá hasta que alcance dicho pH
- Llevar al volumen de 1L con ddH<sub>2</sub>O

#### **Acetato de amonio 7.5 M**

- 57.81g ammonium acetate
- Aproximadamente 50 ml de H<sub>2</sub>O
- Llevar a 100ml volumen final

#### **TE Buffer**

- 10ml 1M Tris HCl pH 8.0
- 2ml 0.5 M EDTA
- Llevar a 1L con ddH<sub>2</sub>O

#### **TBE 5x**

- 54g Tris Base
- 27.5g de Ácido bórico
- 20 ml de EDTA 0.5M
- Completar volumen final de 1 litro

### **GEL DE AGAROSA**

- En un matraz agregar 0.5gr de Agarosa y 50 ml de TBE 1x.
- Calentar el matraz hasta que el TBE 1x con la agarosa se vea claro evitando la ebullición.
- Agregar 3 µl de Bromuro de Etidio.
- Vaciar el gel en la cámara de electroforesis colocada previamente para formar el molde, colocar el peine y esperar a que solidifique.
- Agregar TBE 1x para que se produzca en flujo de electrones.
- Tomar 5 µl de buffer de carga y 5 µl de extracción de ADN o producto de PCR. Mezclar y cargar en cada pozo del gel de agarosa.
- Encender el voltaje, el cual debe estar entre 90 -110 Volts.