

# DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Diaphorina citri* EN CULTIVOS CÍTRICOS DEL VALLE DEL CAUCA Y QUINDÍO (COLOMBIA)

## GENETIC *Diaphorina citri* DIVERSITY ON CITRUS CROPS OF THE VALLE DEL CAUCA AND QUINDÍO (COLOMBIA)

## DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Diaphorina citri* NA CULTURA DOS CITROS DO VALLE DEL CAUCA E QUINDIO (COLÔMBIA)

MIGUEL ANGEL MONCAYO-DONOSO<sup>1</sup>, MARTHA ISABEL ALMANZA-PINZÓN<sup>2</sup>, ANA MILENA CAICEDO-VALLEJO<sup>3</sup>, JAIME EDUARDO MUÑOZ-FLÓREZ<sup>4</sup>, JAMES MONTOYA-LERMA<sup>4</sup>, ARTURO CARABALÍ-MUÑOZ<sup>5</sup>.

### RESUMEN

*El psílido asiático Diaphorina citri es el principal vector de la bacteria Candidatus Liberibacter que causa la enfermedad Huanglongbing, considerada devastadora en la citricultura mundial y aún no reportada en Colombia. La variabilidad genética poblacional de D. citri fue estudiada utilizando la técnica de secuenciación del gen COI mitocondrial como marcador molecular. Se realizaron colectas de adultos en zonas productoras de cítricos del Valle del Cauca y el Quindío. La amplificación se realizó con dos parejas de cebadores específicos para hemípteros. Los productos de la PCR fueron secuenciados en Macrogen-Korea obteniéndose un total de 124 secuencias. En el análisis bioinformático se utilizaron los programas Vector NTI 11.5, Arlequin V 3.5, MEGA 5 y MAFFT 6. Los índices de diversidad molecular fueron similares entre poblaciones, mostrando un mismo origen, separación re-*

**Recibido para evaluación:** 23 Feb de 2014. **Aprobado para publicación:** 7 abril de 2014

- 1 Universidad del Valle, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Programa de Biología. Biólogo. Cali, Colombia.
- 2 Universidad del Cauca, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Ciencias Agropecuarias. Ph.D. Popayán, Colombia.
- 3 Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Ph.D. Palmira, Colombia.
- 4 Universidad del Valle, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Sección Entomología. Ph.D. Cali, Colombia.
- 5 Corporación Agropecuaria de Colombia, Entomología. Ph.D. Palmira, Colombia.

**Correspondencia:** miguelangelmoncayodonoso@gmail.com

*ciente de poblaciones y que no existe diferenciación genética significativa que pueda albergar variantes de la bacteria; sin embargo, el índice de diversidad haplotípica fue más alto que el de diversidad nucleotídica y este último índice presentó bajo número de sitios polimórficos, indicando que las poblaciones de *D. citri* están en expansión. El estudio de la variabilidad genética del vector representa una herramienta para predecir escenarios probables de propagación de la enfermedad.*

## ABSTRACT

*The Asiatic psyllid *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) is the main vector of *Candidatus liberibacter*, which causes the Huanglongbing HLB disease, known for devastating citrus in the world but not yet reported in Colombia. The genetic variability of the *D. citri* population was studied through sequencing the COI mitochondrial gene as molecular marker. Adults were collected in citrus producing zones of the Colombian Valle del Cauca and Quindío. Amplification was performed with two pairs of specific primers for Hemiptera. The PCR products were sequenced at Macrogen-Korea, obtaining a total of 124 sequences. For the bioinformatic analysis, the Vector NTI 11.5, Harlequin V 3.5, MEGA 5 and MAFFT 6 programs were used. The molecular diversity indices between populations were similar, revealing a common origin and a recent split of the populations excluding a significant genetic differentiation associated to variations of the bacterium, however the haplotype diversity index was higher than the nucleotide diversity index. The latter one showed a low number of polymorphic sites, indicating that the *D. citri* populations are expanding. The study of the vector's genetic variability is a tool for the prediction of likely scenarios for the spread of diseases.*

## RESUMO

*O psílido asiático *Diaphorina citri*, é o principal vetor da bactéria *Candidatus Liberibacter* que causa a doença Huanglongbing HLB, considerada devastadora na citricultura mundial e que ainda não foi registrada na Colômbia. A variabilidade genética populacional de *D. citri* foi estudada utilizando-se a técnica de seqüenciamento do gene COI mitocondrial como marcador molecular. Foram feitas coletas de adultos nas áreas produtoras de citros do Valle del Cauca e Quindío. A amplificação foi realizada com dois pares de iniciadores específicos para hemípteros. Os produtos de PCR foram seqüenciados em Macrogen-Korea obtendo-se um total de 124 seqüências. Para as análises de bioinformática foram utilizados os programas Vector NTI 11.5, Arlequin V 3.5, MEGA 5 e MAFFT 6. Os índices de diversidade molecular foram similares entre populações, apresentando uma mesma origem, separação recente de populações, e que não existe uma diferenciação genética importante que possa abrigar variantes da bactéria; no entanto, o índice da diversidade haplotípica foi mais alto do que o da diversidade nucleotídica e este último índice apresentou um baixo número de sítios polimórficos, indicando que as populações de *D. citri* estão em expansão. O estudo da variabilidade genética do vetor representa uma ferramenta para prever cenários prováveis de propagação da doença.*

## PALABRAS CLAVE:

ADN Mitocondrial, Reverdecimiento de los Cítricos, Insectos Vectores, Huanglongbing, Psílido Asiático de los Cítricos.

## KEYWORDS:

Mitochondrial DNA, Citrus Regreening, Vector Insects, Huanglongbing, Asiatic Citrus Psyllid.

## PALAVRAS CHAVE:

DNA Mitocondrial, Citros Greening, Insetos Vetores, Huanglongbing, Psilídio Asiático dos Citros.

## INTRODUCCIÓN

El psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* Kuwamura es importante por ser el vector de la bacteria *Candidatus Liberibacter*, agente causal de la Huanglongbing HLB o enverdecimiento de los cítricos "greening", enfermedad devastadora de la citricultura mundial [1]. El insecto causa daños directos, al alimentarse de la planta e indirectos cuando transmite la bacteria causante de la enfermedad; afecta zonas de crecimiento de la planta ocasionando la caída y deformación de hojas, clorosis, necrosis, enanismo y disminución de la calidad de la fruta; las ninfas y los adultos ocasionan daños al extraer gran cantidad de floema de las hojas y los peciolo; además, poblaciones altas del insecto causan la caída de flores y frutos pequeños [2]. La bacteria, se caracteriza como proteobacteria del género *Candidatus Liberibacter* para la enfermedad Huanglongbing, enfermedad generada por *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Candidatus Liberibacter africanus* y *Candidatus Liberibacter americanus*. La enfermedad tiene alta incidencia en Asia y África donde se señala como factor limitante para la producción de cítricos [3].

Existen diversos métodos y estrategias de control para enfrentar, tanto al vector como a la enfermedad, que incluyen la destrucción y eliminación de las fuentes de inóculo, la renovación de las plantaciones utilizando posturas sanas, el control o la erradicación del insecto vector mediante químicos y/o un programa de control integrado. En el caso de establecerse el vector y no detectarse la enfermedad, entonces se plantea la implementación de programas de control biológico. Sin embargo, hasta el momento no se conoce ningún método efectivo, aunque el control biológico clásico puede contribuir a la supresión de las poblaciones del psílido [6].

El insecto vector *D. citri* está ampliamente distribuido en las regiones tropicales y subtropicales de Asia [4]. A principios de 1998, fue descubierto en la isla de Guadalupe en el Caribe y luego en Argentina, Paraguay, Uruguay, Brasil, Venezuela, Colombia y México [5]. También, se encontró en la Florida y con alta probabilidad de dispersarse hacia los cítricos de Louisiana, Texas, Arizona y California [6]. El desarrollo del insecto es exclusivamente en plantas de la familia Rutaceae, particularmente en los géneros *Citrus* spp. y *Murraya* y en las especies, *Swinglea glutinosa* M., *Limonia acidissima* L. y *Citropsis schweinfurthii* S. y K. [1].

Colombia presenta una topografía y bimodalidad climática que favorece la diversidad de ambien-

tes, además, las condiciones diferentes en que se cultivan los cítricos en el Valle del Cauca y en el Quindío, pueden generar diferentes ambientes que favorezcan la diferenciación génica en *D. citri*. Según [7], un análisis comparativo de las similitudes genotípicas de los haplotipos de poblaciones *D. citri* de Colombia con las del resto del mundo sugiere que las colombianas provienen del sudeste asiático, considerado el centro con mayor probabilidad de haber originado este psílido.

Es necesario conocer la diversidad genética de *D. citri* a nivel molecular para establecer estrategias de manejo. El ADN mitocondrial es una herramienta útil para estudios de filogenia, diversidad genética y estructura poblacional, dada su transmisión exclusiva por vía materna, sin recombinación y tasa de mutación relativamente rápida [9]. Esta última característica es conveniente para análisis genéticos intra e interespecíficos. Los genes de la citocromo oxidasa, subunidades I y II (COI y COII) son los más estudiados del ADN mitocondrial y las unidades terminales del análisis filogenético son los haplotipos mitocondriales o variantes del ADN mitocondrial. El número y estructura de los haplotipos presentes en las poblaciones de una especie aportan medidas de diversidad y estructura genética poblacional y permiten realizar inferencias sobre su historia evolutiva [3].

El presente estudio analizó la diversidad genética poblacional de *D. citri* mediante el análisis de las secuencias de los genes mitocondriales COI, en dos regiones productoras de cítricos en Colombia. Los resultados de estos análisis permitirán diseñar medidas de control de *D. citri*, identificar poblaciones de insectos con riesgo futuro de transmisión de la enfermedad HLB y establecer el potencial de dispersión y flujo genético de *D. citri*. Cabe destacar que este estudio es el primer trabajo de caracterización molecular de poblaciones de *D. citri* en Colombia.

## MÉTODO

### Material biológico

Los adultos de *D. citri* (48 ejemplares) fueron colectados manualmente en árboles de vivero y en producción, con pincel o con un aspirador, almacenados en viales con alcohol (96%) y rotulados con la información de localización, hospedero y fecha de colecta. En total ocho sitios de muestreo (cuadro 1).

**Cuadro 1.** Sitios de muestreo de *D. citri* en los departamentos del Valle del Cauca y el Quindío.

Sitios de Muestreo		Coordenadas
Valle del Cauca		
Rozo	Finca Brasil	3°36'53"N-76°23'10"W
Palmira	CORPOICA	3°34'59"N-76°15'0"W
Caicedonia	Finca Jamaica	4°19'58"N-75°49'59"W
La Unión	Finca La Rivera	4°31'47"N-76°6'31"W
Quindío		
La Tebaida	Finca San Juan	4°26'38"N-75°50'1"W
La Tebaida	Vivero Caracolines	4°26'55"N-75°48'50"W
Calarcá	Vía Calarcá	4°29'47"N-75°43'46"W
Calarcá	Calarcá	4°31'59"N-75°39'0"W

### Extracción de ADN

El protocolo de extracción de ADN efectivo fue el basado en sales modificado del descrito por [10], se basa en un tampón de homogenización estéril (0,4 M de NaCl, 10 mM de Tris pH 8,0 y 2 mM EDTA pH 8,0), SDS al 20%, proteinasa K 20 mg/mL y NaCl 6M. La cuantificación se realizó visualizando el ADN en geles de agarosa al 0,8% en tampón TBE 0,5X (tris-borato 0,045M; EDTA 0,001M) a 100V durante una hora. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 ug/mL. La cantidad de ADN extraído de buena calidad, se cuantificó comparándolo con ADN del bacteriófago Lambda a una concentración de 30 ng/ $\mu$ L. La comparación se realizó usando 1  $\mu$ L, 2  $\mu$ L y 3  $\mu$ L de Lambda para obtener una concentración de 30, 60 y 90 ng/ $\mu$ L, respectivamente.

### Amplificación del ADN por PCR

Los amplificadores del gen COI se obtuvieron por PCR a partir del ADN genómico, se obtuvo un fragmento de 375 pb aproximadamente, determinado por la migración en el gel de agarosa con respecto a un estándar de tamaños moleculares. La concentración de ADN varió entre 30 y 40 ng/mL. El coctel de reacción se llevó a un volumen final de 50  $\mu$ L, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50-200  $\mu$ M dNTP, 0,06  $\mu$ M de cebadores C1-J-1763/C1-N-2096d, 1 ng de ADN, y 2 unidades de Taq polimerasa; en tampón de reacción 1X (50 mM KC1, 10 mM Tris, 0,1% Tritón X-100, pH 9,0 a

25°C). Se siguieron las condiciones de amplificación descritas por [11]: denaturación inicial a 94°C por cuatro min, 25 ciclos a 95°C por 40 seg; un minuto de alineamiento a 40-50°C para el par de cebadores para la amplificación de ADN mitocondrial de *D. citri* y por último, un minuto de extensión a 72°C. Los cebadores utilizados para la caracterización molecular (cuadro 2), amplifican para hemípteros, cubren las partes más variables de la COI y pueden emplearse para estudios genéticos a nivel intraespecífico [11]. La visualización de los productos de la PCR se realizó en un gel de agarosa al 1,2% y teñido con bromuro de etidio en un transiluminador ultravioleta.

### Secuenciación, edición y alineamiento de secuencias

Los productos de la PCR fueron secuenciados por la casa comercial MacroGen® (Seul, Korea) en un secuenciador automático 3730xl DNA analyzer™, en las dos direcciones por cada ejemplar, obteniéndose un total de 124 secuencias.

Las secuencias fueron editadas con el programa Vector 11.5, realizando una secuencia consenso para cada muestra a partir de las secuencias "reverse" y "forward"; y se corroboró su identidad biológica mediante un BLAST y en relación con las secuencias reportadas en las bases de datos para variantes genéticas de la misma especie. Lo anterior se realizó con MAFFT vers. 6.

### Análisis genético poblacional

El análisis estadístico de la información genética del locus COI, entre poblaciones de *D. citri*, fue inferido mediante la comparación de las secuencias de haplotipos, aplicando el programa Arlequin V. 3.5. Los índices de diversidad molecular aplicados fueron:

**Cuadro 2.** Descripción de los cebadores empleados en la caracterización molecular de *D. citri*.

Nombre común	UEA3	UEA4d
Nombre estándar	C1-J-1763	C1-N-2096d
Tamaño (bases)	24	25
Secuencia (5' - 3')	TATAGCATTCCCA-GCAATAAATAA	GANGTATT-WARRTTTC-GRTCWGTTA

Índice de diversidad haplotípica ( $H$ ). Estima la variabilidad genética en términos del número de haplotipos presentes en la muestra y sus respectivas frecuencias [12]. Es definido como la probabilidad de que dos haplotipos de la población, elegidos al azar, sean diferentes.

Índice de diversidad nucleotídica ( $\pi_n$ ). Estima la variabilidad genética en términos del número promedio de nucleótidos diferentes por sitio entre pares de secuencias de haplotipos. Es definido como la probabilidad de que dos nucleótidos con homología de posición escogidos al azar sean diferentes [13, 14].

Número promedio de diferencias de bases entre las secuencias ( $\rho$ ). Estima la variabilidad genética de nucleótidos por sitio entre dos haplotipos, considera que no todas las sustituciones tienen la misma probabilidad de ocurrir y corrige por las diferencias entre las tasas de sustitución de transición y las de transversión.

## RESULTADOS

### Distribución de Haplotipos

Los 24 individuos de *D. citri* que constituyeron la muestra del Quindío presentaron mayor cantidad de haplotipos diferentes en comparación con la muestra de igual número de individuos del Valle del Cauca (17 y 14 haplotipos, respectivamente) (cuadro 3). Estos primeros resultados indican que cada región geográfica registra una historia de 17 y 14 linajes matrilineales, respectivamente, sugiriendo que son muestras representativas de puestas o eventos mutacionales diferentes, por lo tanto, los resultados son válidos para realizar análisis de variabilidad genética intraespecífica en las dos regiones.

El Valle del Cauca presenta mayor cantidad de individuos que comparten haplotipos en comparación con el Quindío: los 15 y 11 individuos, respectivamente, comparten 5 haplotipos en 4 poblaciones (cuadro 3); las poblaciones de Jamaica y La Rivera y las de Brasil y Corpoica comparten 4 haplotipos y 1 haplotipo, respectivamente, mientras que en el Quindío, las poblaciones de San Juan y Calarcá comparten 3 haplotipos y las de Caracolines y la vía a Calarcá comparten 2 haplotipos.

Los haplotipos compartidos con frecuencia alta entre individuos de diferentes regiones podrían indicar: primero, que son haplotipos característicos de la especie *D. citri* para estas regiones y mientras más antiguos

**Cuadro 3.** Distribución de haplotipos de *D. citri* en el Valle del Cauca y el Quindío.

Haplotipo	Valle del Cauca			
	Brasil	Corpoica	Jamaica	La Rivera
1	2	1		
2	1			
3	1			
4		1		
5		1		
6		1		
7		1		
8			3	1
9			1	1
10			2	1
11			2	1
12				1
13				1
14				1
Total	4	5	8	7
Haplotipo	Quindío			
	San Juan	Caracolines	Vía Calarcá	Calarcá
1	1			
2	1			1
3	2			
4	1			
5	1			1
6	1			1
7		1		
8		1	2	
9		1		1
10		1		
11		1		
12		1		
13			1	
14			1	
15				1
16				1
17				1
Total	7	6	4	7

sean estos haplotipos, mayor será su distribución geográfica [15]); segundo, que existe un mismo origen compartido; tercero, según [16] estos haplotipos han sido conservados por selección natural debido a un mayor éxito reproductivo. Finalmente, el hecho de que se encuentren varios individuos asociados a un mismo haplotipo (en general existe un haplotipo mitocondrial preponderante por cada individuo) es un indicio de homoplasia mitocondrial.

El Valle del Cauca y Quindío presentan gran cantidad de haplotipos únicos (específicos o exclusivos), 9 y 12, respectivamente, y ningún haplotipo predominante. Según [17] los haplotipos únicos son resultado de mutaciones puntuales, y tienden a desaparecer de las poblaciones. [18] señala que la aparición de un número alto de haplotipos únicos es resultado de la ocurrencia de más de un caso de introducción dentro de las poblaciones en las cuales los grupos introducidos ya presentaban una variabilidad alta. [19] señalan que los plaguicidas ejercen una fuerte presión de selección y su aplicación periódica puede estar coincidiendo con la eliminación selectiva de haplotipos, lo que puede favorecer la expansión de los haplotipos únicos producidos por mutaciones puntuales sobre todo si estos se asocian con los genes implicados en la resistencia a insecticidas.

### Variabilidad Poblacional

Las dos regiones geográficas muestran alta variabilidad genética intrapoblacional que se refleja en sus altos índices de diversidad haplotípica (H), siendo los índices H del Quindío más altos que los del Valle del Cauca (cuadro 4), resultado que concuerda con la mayor cantidad total de haplotipos presentes en la región del Quindío, y mayor cantidad de haplotipos únicos por región y por localidad. Es importante destacar que la similitud de los altos índices de diversidad haplotípica de La Rivera en el Valle del Cauca con los índices de las localidades San Juan, Caracolines y Calarcá en el Quindío es debida probablemente a su relativa cercanía geográfica.

En la cuadro 4 se observa que a pesar de la alta diversidad haplotípica (H) de las dos regiones, la probabilidad de hallar un cambio nucleotídico en una posición concreta de la secuencia es reducida (baja tasa de sustitución nucleotídica); la región de Quindío presentó el mayor índice de diversidad nucleotídica en comparación con el Valle del Cauca, oscilando entre  $0,0045 \pm 0,0039$  y  $0,0603 \pm 0,0346$  y entre  $0,0049 \pm 0,0036$  y  $0,0107 \pm 0,0081$ , respectivamente. Las poblaciones de San Juan, Calarcá y Caracolines (Quindío) presentaron relativamente los más altos índices de diversidad nucleotídica ( $0,0603 \pm 0,035$ ,  $0,024 \pm 0,014$  y  $0,0225 \pm 0,014$ , respectivamente); y los mayores promedios de diferencias de bases por sitio entre pares de secuencias ( $26,38 \pm 13,21$ ,  $8,86 \pm 4,65$  y  $8,33 \pm 4,50$ , respectivamente).

Los índices de diversidad nucleotídica obtenidos para *D. citri* son normales, según [20] las diferencias nu-

cleotídicas dentro de las especies varía de 0 a 1,8%. Sin embargo, [18] indica que alta diversidad haplotípica acompañada de una baja diversidad nucleotídica significa que existen muchos haplotipos genéticamente similares, es decir, hay pocos cambios para proporcionar haplotipos diferentes, lo cual es característico de efectos de expansión de las poblaciones en un tiempo reciente. La expansión reciente de las poblaciones de *D. citri* también es apoyada por valores bajos de diversidad nucleotídica en relación al bajo número de sitios polimórficos, indicativo del crecimiento de las poblaciones o la presencia de un equilibrio en la selección [21].

Se observa una tendencia ascendente en relación con el número de sitios polimórficos en el corredor geográfico del Valle del Cauca al Eje Cafetero alcanzando 82 sitios en la población de San Juan (Quindío) (cuadro 4), debida probablemente a las diferentes condiciones climáticas/ ecológicas/geográficas y antrópicas de las dos regiones geográficas. El corredor se encuentra en gran parte de los Andes occidentales, al centro-occidente de Colombia entre las cordilleras Occidental y Central; presenta características de relieve andino donde predominan numerosas ciénagas y embalses y ríos de primer orden en el País como el Cauca y el Magdalena [22]. Además, el corredor tiene una fuerte influencia humana, el 24% de los cultivos de cítricos del País se encuentran entre el Valle del Cauca, Quindío y Antioquia, y existe una conexión en el transporte de cítricos, tanto de plántulas como de frutos [23]. Las condiciones mencionadas juegan un papel fundamental en la distribución y flujo génico de las poblaciones de una especie y favorecen la diversidad genética, aumentando el número de sitios polimórficos para las poblaciones de insectos ubicadas en éste corredor geográfico.

En las regiones estudiadas solo se observaron mutaciones puntuales siendo las más frecuentes, las transversiones que variaron entre 1 (Vía Calarcá) y 7 (Caracolines) en el Quindío mientras que las localidades de Jamaica y La Rivera en el Valle del Cauca no presentaron ninguna. Las transiciones fueron poco frecuentes: de 1 a 2 en el Valle del Cauca y de 2 a 3 en el Quindío (cuadro 4).

Los cambios en los niveles de diversidad genética de las especies o poblaciones son consecuencia de un balance entre procesos opuestos de ganancia (mutaciones y flujo génico) y pérdida (deriva génica y selección natural) [3]. En insectos los cambios en la

**Cuadro 4.** Diversidad genética de las poblaciones de *D. citri* en el Valle del Cauca y Quindío.

Índices de Diversidad Genética	Valle del Cauca			
	Brasil	CORPOICA	Jamaica	La Rivera
Tamaño de la Muestra	4	5	8	7
Número Nucleótidos (nt)	371	373	373	374
Número Haplotipos	3	5	4	7
Número Sitios Polimórficos	8	7	4	7
Número Transiciones (Ts)	2	2	1	1
Número Transversiones (Tv)	4	1	0	0
Razón Ts/Tv	0,5	2	1/0	1/0
Índice Diversidad Haplotípica (H)	1,0000±0,1768	1,0000±0,1265	1,0000±0,0625	1,0000±0,0764
Índice Diversidad Nucleotídica ( $\pi_n$ )	0,0107±0,0081	0,0085±0,0062	0,0049±0,0036	0,0081±0,0055
Número promedio diferencias bases	4,0000±2,5174	3,2000±1,9794	1,8571±1,1850	3,0476±1,8005
	Quindío			
	San Juan	Caracolines	Vía Calarcá	Calarcá
Tamaño de la Muestra	7	6	4	7
Número Nucleótidos (nt)	437	370	367	368
Número Haplotipos	6	6	3	7
Número Sitios Polimórficos	82	14	3	18
Número Transiciones (Ts)	3	3	0	2
Número Transversiones (Tv)	6	7	1	3
Razón Ts/Tv	0,5	0,4285	0	0,6666
Índice Diversidad Haplotípica (H)	1,0000±0,0764	1,0000±0,0962	1,0000±0,1768	1,0000±0,0764
Índice Diversidad Nucleotídica	0,0603±0,0346	0,0225±0,0140	0,0045±0,0039	0,0240±0,0144
Número promedio diferencias bases	26,380±13,210	8,3333±4,5030	1,6666±1,2161	8,8571±4,6543

variabilidad genética, probablemente ocurren más por pérdida que por ganancia, debido a diferentes factores de disturbio en el ambiente, como las presiones de selección que ejercen los insecticidas, la disponibilidad de alimento, la resistencia que pueden generar las propias plantas hospederas y factores biológicos que intervienen en la dinámica poblacional: patrones de apareamiento, tipo de reproducción, tiempo de duración de las generaciones, tasas de mortalidad, migraciones, etc. [24]. En el caso de *D. citri* el corto tiempo de las generaciones y el número alto de ovoposiciones siempre aseguran el tamaño de la población. Estas características entre otras le permiten a este insecto adaptarse a las condiciones ambientales variables de la región donde se ubique [4].

## CONCLUSIONES

Los índices de diversidad genética de las poblaciones de *D. citri* fueron relativamente similares indicando

una separación reciente de las poblaciones y aportan evidencias respecto a que las poblaciones de *D. citri* en el Valle del Cauca y el Quindío se encuentran en expansión, sin embargo no existe una diferenciación genética importante que pueda generar nuevos biotipos de esta especie capaces de adaptarse a nuevos ambientes y con la capacidad de albergar otras variantes de la bacteria *Candidatus Liberibacter*.

La variabilidad genética reducida disminuye la capacidad de una población para adaptarse a cambios ambientales generando la disminución de la adaptación de los individuos. Por lo tanto, el manejo de estas plagas requiere disminuir o mantener baja la variabilidad genética.

Es necesario hacer muestreos y monitoreo por todo el país, en general, y en particular en las localidades cítricas de Colombia, para poder tener así un panorama completo de la genética poblacional de la especie.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo científico del Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira, la asesoría y apoyo estadístico del Departamento de Ciencias Agropecuarias de la Universidad del Cauca y la financiación del proyecto e intercambio de conocimientos al grupo de Investigación de Diversidad Biológica de la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira.

## REFERENCIAS

- [1] CERMELI, M., MORALES, P., y GODOY, F. Presencia del psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) en Venezuela. Boletín Entomológico Venezuela, 15(2), 2000, p. 235-243.
- [2] REYES, R. Chicharrita (*Diaphorina citri*) amenaza para la citricultura en el Salvador. San Salvador (El Salvador): Programa Nacional de Frutas del Salvador, 2006, 4 p.
- [3] LANTERI, A., LOIÁCONO, M.S. y MARGARÍA, C. Aportes de La Biología Molecular a la Conservación de los Insectos. Red Iberoamericana de Biogeografía y Entomología Sistemática, 2, 2002, p. 207-220.
- [4] GARCÍA, C. *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), vector de la bacteria que causa el Huanglongbing (HLB-Greening). Buenos Aires (Argentina): Ministerio de la Producción, Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, 2009, 18 p.
- [5] HALBERT, S.E. and MANJUNATH, K.L. Asian citrus Psyllids (*Sternorrhyncha: Psyllidae*) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. Florida Entomologist, 87(3), 2004, p. 330-353.
- [6] ALEMÁN, J., HEYKER, B. y RAVELO, J. *Diaphorina citri* y la enfermedad Huanglongbing: una combinación destructiva para la producción cítrica. Revista Protección Vegetal, 2(3), 2007, p. 154-165.
- [7] HALL, D.G. Biology, history and world status of *Diaphorina citri*. Hermosillo (México): I Taller internacional sobre Huanglongbing de los cítricos (*Candidatus Liberibacter spp*) y el psílido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri*), 2008, 11 p.
- [8] INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO (ICA). Situación actual de HLB (huanglongbing) y su vector el psílido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri* kuwayama) en Colombia. Bogotá (Colombia): Boletín Epidemiológico, 2010, 10 p.
- [9] TABERLET, P. The Use of Mitochondrial DNA Control Region Sequencing in Conservation Genetics. En: Molecular Genetic Approaches in Conservation. New York (USA): Smith, T. B. and Wayne, R. K. (Eds), Oxford University Press, 1996, p. 125-148.
- [10] ALJANABI, M. and MARTÍNEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. Nucleic Acids Research, 25(22), 1997, p. 4692-4693.
- [11] ZHANG, D. and HEWITT, G.M. Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial COI primers in insects. Insect Molecular Biology, 6(2), 1997, p. 143-150.
- [12] NEI, M. Molecular evolutionary genetics. New York, (USA): Columbia University Press, 1987, 512 p.
- [13] NEI, M. and LI, W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 76, 1979, p. 5269-5273.
- [14] NEI, M., and TAJIMA, F. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. Genetics, 97, 1981, p. 145-163.
- [15] NEIGEL, J.E., and AVISE, J.C. Application of a random walk model to geographic distributions of animal mitochondrial DNA variation. Genetics, 135, 1993, p. 1209-1220.
- [16] SAÉNZ, C.V. Genética de poblaciones y prevalencia del hongo patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis* en anfibios de Papallacta y Guamaní, Ecuador [Tesis Ciencias Biológicas]. Quito (Ecuador): Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Escuela de Ciencias Biológicas, 2011, 98 p.
- [17] BROWN, B.L., EPIFANIO, J.M., SMOUSE, P.E. and KOBAK, C.J. Temporal stability of mtDNA haplotype frequencies in American shad stocks: to pool or not to pool across years. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 53(10), 1996, p. 2274-2283.
- [18] SARTORI, G.A. Diversidade genética de *Diaphorina citri* Kuwayama, (Hemiptera: Psyllidae) e caracterização molecular das linhagens de Wolbachia associadas [Tese de doutorado Entomologia]. Sao Paulo (Brasil). Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011, 127 p.
- [19] BASS, C. and FIELD, L.M. Gene amplification and insecticide resistance. Pest Management Science, 67(8), 2011, p. 886-890.

- [20] MURRAY, D. and PASHLEY, D.P. Molecular phylogenetics and evolutionary history of the neotropical *Satyrine Subtribe Euptyciina* (Nymphalidae: Satyrinae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 34, 2005, p. 67-80.
- [21] HAMILTON, M.B. *Populations genetics*. 1 ed. Chichester (England): Wiley-Blackwell, Oxford, 2009, 424 p.
- [22] BARÓN, J.D. *Geografía económica de los Andes occidentales de Colombia*. Bogotá (Colombia): Banco de la Republica, 2009, 95 p.
- [23] PEÑALOZA, M.C. y DÍAS, R.C. *Así se maneja y controla el picudo de los cítricos *Compsus* sp.* Bogotá (Colombia): Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), Produmedios, 2004, 30 p.
- [24] SARMIENTO, L. *Variabilidad genética de poblaciones mexicanas de la cochinilla rosada del hibisco, *Maconellicoccus hirsutus* (Green) (Hemiptera: Pseudococcidae)* [Tesis Maestro em Ciencias en Biotecnología Genómica]. Tamaulipas (México): Instituto Politécnico Nacional, 2008, 61 p.