

Diversidad de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) en dos zonas de Colombia

¹Miguel A. Moncayo Donoso, ²Ana Milena Caicedo Vallejo, ³Arturo Carabalí Muñoz, ⁴James Montoya-Lerma, ⁵Martha Isabel Almanza Pinzón, ^{2,6}Jaime Eduardo Muñoz Flórez

¹ Facultad Ciencias, Universidad del Valle, Cali, Valle del Cauca, Colombia. ² Grupo de investigación en Diversidad Biológica Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira. Valle del Cauca, Colombia. ³ Programa Entomología, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria C.I Palmira Corpoica, Palmira, Valle del Cauca, Colombia. ⁴ Facultad Ciencias, Universidad del Valle, Cali, Valle del Cauca, Colombia. ⁵ Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad del Cauca, Popayán, Cauca, Colombia. ⁶ Departamento de Ciencias Agrícolas, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira, AA.237, Palmira, Valle del Cauca, Colombia. Autor para correspondencia: miguelangelmoncayodonoso@gmail.com

Palabras clave: *Diaphorina citri*, *Candidatus liberobacter*, ADN, secuencia nucleica, HLB. gen COI I, Valle del Cauca, Quindío, Colombia..

El psílido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri*) se encuentra ampliamente distribuido en regiones tropicales y subtropicales de Asia. Se desarrolla exclusivamente en plantas de la familia Rutaceae, de los géneros *Citrus* y *Murraya* y las especies *Swinglea glutinosa* Murray, *Limonia acidissima* L. y *Citropsis schweinfurthii* Swingle y Kellerm. Es importante por transmitir la bacteria que causa la enfermedad del enverdecimiento o *greening* (en inglés), además ocasiona daño en los brotes nuevos al deformar las hojas, enanismo y disminución en la calidad de la fruta. La bacteria no se puede cultivar en medios artificiales y es caracterizada como un nuevo género de protobacteria, *Candidatus liberobacter*, causante de huanglongbing, HLB (Lanteri et al., 2002). Para establecer estrategias de manejo y como herramienta para predecir escenarios probables de propagación de la enfermedad, es necesario conocer a *D. citri* a escala molecular. Con el objetivo de determinar la diversidad genética de *D. citri* mediante el análisis de secuencias del gen COI, se estandarizó un método de extracción de ADN y se identificaron las poblaciones de dos zonas de Colombia (Valle del Cauca y Quindío) mediante el gen COI.

Metodología

Las muestras se recolectaron en cuatro municipios del Valle del Cauca (Rozo, Palmira, Caicedonia y La Unión) y cuatro sitios en Quindío (San Juan, Vivero Caracolines, vía Calarcá y Calarcá). Los insectos fueron recolectados con aspirador bucal en viveros (n = 50) y campo (n = 20) por hectárea. Se almacenaron en alcohol a 96% y se rotularon. Se evaluaron tres métodos de extracción de ADN: (1) sales, según Aljanabi y Martínez (1997), (2) fenol/cloroformo (Zhang y Hewitt, 1997) y (3) acetato de sodio (Cenis, 1992). La cuantificación de ADN se hizo en gel de agarosa a 0.8%, la amplificación del gen COI con los cebadores UEA3 y UEA4d y la secuenciación en MacroGen[®] (Seul, Korea). El análisis bioinformático se hizo con programas como Arlequín 3.5, Vector 11.5, BLAST, MAFFT v 6. El índice de diversidad haplotípica (H) se calculó de acuerdo con Nei (1987) y la estimación de la estructura genética de las poblaciones mediante Amova (Excoffier et al., 1992).

Resultados

El método de extracción más efectivo fue el de sales. Se obtuvo ADN a una concentración aproximada de 30 ng/μl y de buena calidad, lo que permitió la amplificación de la región COI de todas las muestras evaluadas. Se obtuvieron cuarenta y ocho secuencias de 360 pb para determinar la diversidad y estructura genética con un 98% de homología para la región COI con diferentes haplotipos de *D. citri*. Los veinticuatro individuos de la población del Valle del Cauca presentaron menor frecuencia de haplotipos en comparación con los veinticuatro de la población del Quindío (catorce y diecisiete haplotipos, respectivamente). En el Valle del Cauca y Quindío se presentaron haplotipos únicos (nueve en Valle del Cauca y diez en Quindío). Según Brown et al., (1996) estos haplotipos son causados por mutaciones puntuales, y tienden a desaparecer de las poblaciones con el tiempo. En ambas localidades se encontró variabilidad intrapoblacional que se refleja en sus índices de diversidad haplotípica (H). Las poblaciones en San Juan, Caracolines y Calarcá (Quindío) presentaron el mayor número de haplotipos diferentes (6, 6 y 7, respectivamente) y los índices H más altos (1.00 ±

0.0764, 1.00 ± 0.0764 y 1.00 ± 0.0962 , respectivamente). 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) (Lanteri et al., 2002). En el análisis interpoblacional no se presentó heteroplasma en los grupos ya que cada individuo de cada grupo está asociado con un haplotipo en particular. Para el Quindío la variabilidad genética fue mayor dentro de las poblaciones con un valor de 89.06%, mientras que la variación entre las poblaciones (San Juan, Caracolines, Vía Calarcá) fue de 10.94%. El valor de *Fst* indica una estructuración poblacional moderada con un valor de 0.1094.

Conclusión

La estructuración genética mostró que las poblaciones de *D. citri* en el Valle del Cauca y Quindío se encuentran en expansión, pero sin una diferenciación que conlleve a la generación de nuevos biotipos de *D. citri* capaces de adaptarse a nuevos ambientes y de albergar otras variantes de la bacteria *Candidatus liberibacter*.

Agradecimientos

Al grupo de diversidad biológica de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira por la financiación y al grupo de Entomología de Corpoica CI Palmira por la colaboración en los muestreos.

Referencias

- Aljanabi, M. y Martínez, I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res.* 25(22):4692 - 4693.
- Brown, B. L.; Epifanio, J.M.; Smouse, P. E.; y Kobak, C. J. 1996. Temporal stability of mtDNA haplotype frequencies in American shad stocks: to pool or not to pool across years. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 53(10):2274 - 2283.
- Cenis, J. L. 1992. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Res.* 20(9):2380 - 2381.
- Excoffier, L.; Smouse, P. E.; y Quattro, J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479 - 491.
- Katoh, K. y Toh, H. 2008. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Brief Bioinform.* 9 (4):286 - 298.
- Lanteri, A. A.; Loíacono, M. S.; y Margaría, C. 2002. Aportes de la biología molecular a la conservación de los insectos. En: Costa, C.; S. A. Vanin; J. M. Lobo; y A. Melic (eds.). Proyecto de Red Iberoamericana de Biogeografía y Entomología Sistemática, PRIBES 2002. Monografías Tercer Milenio. Soc. Entomol. Aragonesa 2:207 - 220.
- Nei, M. y Li, W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76:5269 - 5273.
- Zhang, D. y Hewitt, G. M. 1997. Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial COI primers in insects. *Insect. Mol. Biol.* 6(2):143 - 150.