

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LAS ESPECIES DEL  
GÉNERO *Brevipalpus* spp. (ACARI: TENUIPALPIDAE) EN CÍTRICOS, Y  
EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA E IDENTIFICACIÓN DEL VIRUS DE LA  
LEPROSIS DE LOS CÍTRICOS (CiLV) ASOCIADO

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de  
Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales para optar por el grado y  
título de Maestría Académica en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales con  
énfasis en Protección de Cultivos

JACQUELINE ABARCA DURÁN

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2022

## **Agradecimientos**

Mi más sincero agradecimiento a las siguientes personas:

Al Dr. Hugo Aguilar Piedra, al Dr. Mauricio Montero y a la Dra. Pamela Murillo por guiarme en el desarrollo de este trabajo de tesis, sus consejos y apoyo. A la MSc. Grace Alpízar Aguilar por las recomendaciones y disposición de ayuda durante la elaboración de esta tesis.

A las personas que nos facilitaron el ingreso a sus fincas para la toma de muestras.

Al SEP por el apoyo económico brindado para la culminación de este trabajo.

Al Laboratorio de Acarología, Laboratorio de Fitopatógenos Obligados y sus Vectores y al Laboratorio de Técnicas Moleculares por brindar el equipo necesario en cada una de las etapas realizadas.

A todos los amigos y profesores que me apoyaron para poder culminar este trabajo.

“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica con énfasis en Protección de Cultivos”

---

Dra. Pamela Murillo Rojas  
**Representante de la Decana  
Sistema de Estudios de Posgrado**

---

Dr. Hugo Aguilar Piedra  
**Director de Tesis**

---

M. Sc. Grace Alpízar Aguilar  
**Asesora**

---

Dr. Mauricio Montero Astúa  
**Asesor**

---

Dra. Catalina Salas Durán  
**Directora del Programa de Posgrado en  
Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales**

---

Jacqueline Abarca Durán  
**Candidato**

## Índice

Agradecimientos.....	ii
Hoja de aprobación.....	iii
Resumen.....	vi
Abstract.....	vii
<b>A. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>B. REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>4</b>
1. Generalidades del género <i>Brevipalpus</i> .....	4
2. Leptosia de los cítricos, su relación con el género <i>Brevipalpus</i> , y otros virus asociados.....	6
3. Importancia económica de la leptosis de los cítricos.....	10
<b>C. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>13</b>
a) Recolección de muestras procedentes de tres regiones de Costa Rica.....	13
4. Procesamiento inicial del material vegetal y establecimiento de las colonias en el laboratorio.....	14
5. Preparación de frutos de naranja ( <i>C. sinensis</i> ).....	15
6. Identificación morfológica.....	16
7. Extracción de ADN para <i>Brevipalpus</i> spp. y secuenciación de la región COX 1 del gen mitocondrial.....	17
8. Filogenia a partir de la región COX 1 para <i>Brevipalpus</i> spp. ....	18
9. Extracción de ARN y RT-PCR para detección de virus. ....	19

10.	Porcentaje de identidad de las secuencias virales dentro del NCBI.....	20
<b>D.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>21</b>
a)	Muestreo en tres diferentes regiones del país.....	21
11.	Número de individuos provenientes de las colonias establecidas.....	23
12.	Identificación morfológica de especies de <i>Brevipalpus</i> presentes en Costa Rica.....	25
13.	Filogenia de <i>Brevipalpus</i> spp. inferida a partir del gen COXI.....	49
14.	Red de haplotipos de <i>Brevipalpus</i> spp.....	51
15.	Distancias genéticas entre las especies de <i>Brevipalpus</i> presentes en Costa Rica .....	53
16.	Valores de Phi.....	54
17.	Evaluación de la presencia de los virus de la leprosis de los cítricos.....	55
<b>E.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>57</b>
1.	Especies de <i>Brevipalpus</i> encontradas en la zona sur de Costa Rica.....	57
2.	Distribución de <i>B. yothersi</i> y posible <i>Brevipalpus</i> sp. nov 2 o en proceso de especiación.....	59
3.	Presencia de leprosis de los cítricos CiLV-C, CiLV-C2, OFV-citrus, CTV e Ilarvirus .....	62
<b>F.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>63</b>
<b>G.</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>64</b>
<b>H.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>80</b>

## Resumen

El género *Brevipalpus* presenta variabilidad interespecífica desde su descripción. Por eso surge la interrogante de cuáles especies se encuentran en Costa Rica asociadas a cítricos. Las técnicas moleculares y morfológicas son herramientas complementarias que permiten una identificación más precisa a nivel de especie, lo cual es de importancia, ya que algunas especies del género *Brevipalpus* han sido asociadas a la transmisión de virus, tales como los virus de la leprosis de los cítricos, los del tipo citoplasmático CiLV-C y citoplasmático tipo 2 CiLV-C2, y los nucleares como el virus de la leprosis de los cítricos nuclear (CiLV-N) y el orchid fleck virus-citrus (OFV-citrus). Por esta razón, la evaluación de la presencia de estos virus brinda información en el manejo que se puede realizar en las plantaciones citrícolas. En esta investigación se muestrearon 16 fincas con naranja (*Citrus sinensis* L.), distribuidas en la Región Central, Región Huetar Norte, y Región Brunca. Se identificó mediante caracteres morfológicos a las especies *Brevipalpus yothersi*, *B. azores*, *B. papayensis* y se propone una especie nueva de dicho género (*Brevipalpus* sp. nov.), la cual se encuentra en proceso de descripción. La secuenciación parcial del gen COX 1, permitió identificar a las especies *B. yothersi*, *B. azores*, y *Brevipalpus* sp. nov. *Brevipalpus yothersi* se encontró en la Región Central y Brunca, mientras que *B. azores*, *B. papayensis* y *Brevipalpus* sp. nov., fueron encontradas únicamente en la Región Brunca. La reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa fue utilizada para evaluar la presencia de los virus de la leprosis de los cítricos (CiLV-C, CiLV-C2, CiLV-N y OFV- citrus) utilizando material vegetal asintomático o con síntomas de clorosis. En cada uno de los análisis, sólo se obtuvo amplificación del control positivo (ADN brindado por el laboratorio de Fitopatógenos Obligados y sus Vectores). De este modo se determinó que las fincas muestreadas eran negativas para dichos virus.

## Summary

The genus *Brevipalpus* presents interspecific variability since its description. Therefore, the question arises as to which species are found in Costa Rica associated with citrus. Molecular and morphological techniques are complementary tools that allow a more precise identification at the species level, which is important, since some species of the genus *Brevipalpus* have been associated with virus transmission, such as citrus leprosy viruses, cytoplasmic type CiLV-C and cytoplasmic type 2 CiLV-C2, and nuclear viruses such as citrus leprosy virus-nuclear (CiLV-N) and orchid fleck virus-citrus (OFV-citrus). For this reason, the evaluation of the presence of these viruses provides information on the management that can be carried out in citrus plantations. In this research, 16 orange (*Citrus sinensis* L.) farms were sampled, distributed in the Central Region, Northern Huetar Region, and Brunca Region. The species *Brevipalpus yothersi*, *B. azores*, *B. papayensis* were identified by morphological characters and a new species of this genus (*Brevipalpus* sp. nov.) was proposed, which is in process of description. Partial sequencing of the COX 1 gene identified the species *B. yothersi*, *B. azores*, and *Brevipalpus* sp. nov. *Brevipalpus yothersi* was found in the Central and Brunca Regions, while *B. azores*, *B. papayensis* and *Brevipalpus* sp. nov. were found only in the Brunca Region. Reverse transcriptase polymerase chain reaction was used to evaluate the presence of citrus leprosy viruses (CiLV-C, CiLV-C2, CiLV-N and OFV- citrus) using asymptomatic plant material or with symptoms of chlorosis. In each of the analyses, amplification was obtained only from the positive control (DNA provided by the laboratory of Obligate Phytopathogens and their Vectors). Thus, it was determined that the sampled groves were negative for these viruses.

**Índice de cuadros**

<b>Cuadro 1.</b> Número de individuos de <i>Brevipalpus spp.</i> encontrados por finca en las muestras recolectadas en <i>Citrus sinensis</i> expresados en promedio (Max-Min)....	22
<b>Cuadro 2.</b> Número de individuos totales establecidos en colonias en el Laboratorio de Acarología, UCR, San Pedro de Montes de Oca, San José.....	24
<b>Cuadro 3.</b> Porcentajes de variación intra e interespecífica para <i>Brevipalpus yothersi</i> , <i>Brevipalpus sp. nov</i> y <i>Brevipalpus azores</i> con los valores de K2P (Kimura 2-parámetros) y no corregido, $\bar{X}$ = promedio, Max= Máximo, Min= mínimo. ....	54
<b>Cuadro 4.</b> Pruebas PCR-RT para la identificación de virus de la leprosis de los cítricos citoplasmático (CiLV-C), virus de la leprosis de los cítricos citoplasmático (CiLV-C2), virus de la leprosis de los cítricos nuclear (CiLV-N), OFV-Citrus, virus de la tristeza de los cítricos (CTV) e Iarvirus (CVV). ....	56



## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Síntomas causados por la leprosis de los cítricos, A) Virus de la leprosis de los cítricos CiLV-N), B) virus de la leprosis de los cítricos CiLV-C2. C) y D) Virus de la leprosis de los cítricos CiLV-C en hojas, E) y F) en ramas. Fuente: (Roy <i>et al.</i> 2013, 2014; Fazal ur Rehman <i>et al.</i> 2020) .....	8
<b>Figura 2.</b> Ubicación de las fincas muestreadas en las regiones Huetar Norte, Central y Brunca.....	13
<b>Figura 3.</b> Ubicación de fincas y distribución de las especies encontradas en el cultivo de naranja ( <i>C. sinensis</i> ).....	21
<b>Figura 4.</b> Colonia preparada y desarrollo de <i>Brevipalpus yothersi</i> , (A) arena, (B) vaselina, (C) capa de parafina, (D) placa petri plástica. (E) hembra, (F) huevos, (G) macho y hembra copulando, (H) estadios inmaduros en frutos de naranja ( <i>C. sinensis</i> ).....	23
<b>Figura 5.</b> Hembra de <i>Brevipalpus yothersi</i> . A) y B) vista dorsal con areólas presentes en el propodosoma y líneas en forma de V en el opistosoma (contraste de fases y DIC, respectivamente), C) vista ventral con la presencia de pequeñas areólas en la placa ventral (VP), placa genital (GP) con celdas fusionándose, formando celdas de mayor tamaño (DIC). .....	27
<b>Figura 6.</b> Hembra de <i>Brevipalpus yothersi</i> . A) Gnatosoma (la flecha indica la seta en el palpo), B) solenidios pata II (flechas indican los solenidios), C) areólas presentes entre las setas 3a-4a, D) espermateca con estipe distal.....	28
<b>Figura 7.</b> Hembra de <i>Brevipalpus yothersi</i> . A) propodosoma reticulado, B) ventralmente con celdas redondas en los laterales, C) opistosoma con pliegues en forma de V hacia la seta h1, D) placas ventrales (PV)y genitales (GP) con areólas fusionadas.....	29

**Figura 8.** Hembra de *Brevipalpus sp. nov.* (F12, F13 y F14), A) presencia de areolas y reticulación lateral en el propodosoma (contraste de fases), B) y C) presencia de areolas y reticulación lateral en el propodosoma y la reticulación en opistosoma, D) presencia de líneas longitudinales entre las setas 3a-4a, también en placas ventrales (VP) y genitales (GP) (contraste de fases), E) y F) presencia de líneas longitudinales entre las setas 3a-4a, también en placas ventrales (VP) y genitales (GP) (DIC)..... 32

**Figura 9.** Hembra de *Brevipalpus sp. nov.* (F12, F13 y F14) A) gnatosoma (la flecha indica la seta en el palpo), B) solenidios pata II (flechas indican los solenidios). C) reticulación entre las setas 3a-4a con líneas longitudinales débiles hacia el centro, D) espermateca con vesícula esclerotizada con proyecciones (DIC)..... 33

**Figura 10.** Hembra de *Brevipalpus sp. nov.* (F12, F13 y F14) A) reticulación en propodosoma dorsal, B) presencia de areolas en los laterales C) reticulación en bandas longitudinales en opistosoma dorsal central, D) líneas longitudinales se convierten en verticales hacia h1, E) placa ventral con líneas longitudinales curvadas en el centro (VP) y placa genital (GP) con celdas fusionadas formando bandas alargadas (DIC)..... 34

**Figura 11.** Hembra de *Brevipalpus azores* (F12, F13). A) y B) propodosoma con areólas, cutícula lateral formando celdas largas, cutícula sublateral del opistosoma dorsal con celdas formando domos, opistosoma con líneas longitudinales convirtiéndose en verticales C) y D) presencia de verrugas entre las setas 3a-4a y hacia la placa ventral, con placas ventrales (VP) bandas mayormente longitudinales, y placas genitales (GP) con cutícula irregular con bandas transversas (DIC). ..... 37

**Figura 12.** Hembra de *Brevipalpus azores* (F12, F13). A) gnatosoma (la flecha indica la seta en el palpo), B) solenidios pata II (flechas indican la ubicación de los dos solenidios) C) entre 4a y la placa ventral presencia de verrugas con algunas fusionadas en bandas cortas, D) espermateca con una vesícula esclerotizada con proyecciones alrededor (DIC). ..... 38

- Figura 13.** Hembra de *Brevipalpus azores* (F12, F13). A) propodosoma dorsal con areólas con algunas celdas laterales redondas, B)..... 39
- Figura 14.** Hembra de *Brevipalpus papayensis* (F14) A) y B) prodorso con areólas, sublaterales formando celdas alargadas, opistosoma con líneas laterales finalizando hacia h1 en líneas transversas, C) y D) cutícula entre las setas 3a-4a con celdas redondeadas hacia la placa ventral débiles centralmente entre 3a-4a, placa ventral (VP) con bandas longitudinales, placa genital (GP) con bandas transversas. .... 42
- Figura 15.** Hembra de *Brevipalpus papayensis* (F14). A) gnatosoma (la flecha indica la seta en el palpo), B) solenidios pata II (flechas indican los solenidios) C) Cutícula entre las setas 3a - 4a cutícula lateral con celdas redondeadas, con presencia de bandas curvadas longitudinales centralmente, D) espermateca esclerotizada con proyecciones que la rodean (DIC)..... 43
- Figura 16.** Hembra de *Brevipalpus papayensis* (F14). A) propodosoma dorsal central con areólas, B) propodosoma ventral con areólas laterales y bandas curvas centralmente, C) tiene pliegues en el opistosoma transversos que cambian a líneas transversales hacia h1, D) opistosoma ventral, placas ventrales (VP) con bandas en diferentes sentidos de orientación, placa genital (GP) cutícula con bandas irregulares, angostas y transversas (DIC)..... 44
- Figura 17.** Diferentes setas del femúr-genu palpal de hembras de las especies A) *Brevipalpus yothersi* delgada y barbada, B) *Brevipalpus* sp. nov., delgada y barbada, C) *Brevipalpus azores* ancha y barbada, D) *Brevipalpus papayensis* ancha y barbada..... 46
- Figura 18.** Rugosidad en cutícula entre las setas 3a-4a de hembras de las especies A) *Brevipalpus yothersi* con presencia de areolas, B) *Brevipalpus azores* con bandas débiles centralmente, y con areolas en los laterales, C) *Brevipalpus papayensis* con presencia de

bandas longitudinales y areolas en los laterales y D) *Brevipalpus* sp. nov., delgada y barbada ..... 47

**Figura 19.** Forma de la espermateca de hembras de las especies A) *Brevipalpus yothersi* vesícula ovalada con estipe distal, B) *Brevipalpus azores* vesícula redonda con proyecciones C) *Brevipalpus papayensis* vesícula redonda con proyecciones D) *Brevipalpus* sp. nov., vesícula con forma oval y proyecciones alrededor de la vesícula... 48

**Figura 20.** Árbol filogenético inferido a partir de un análisis bayesiano de una región del gen *COX1* para *Brevipalpus* spp., en el cultivo de naranja, en Costa Rica. Modelo HKY+I+G. Las probabilidades posteriores se muestran como porcentajes en los nodos del árbol. Las secuencias obtenidas en esta investigación se encuentran en negrita. Escala: cambios esperados por sitio. .... 50

**Figura 21.** Red de haplotipos de *Brevipalpus* spp. Los grupos se encuentran diferenciados por colores, en negrita aparecen las poblaciones secuenciadas durante esta investigación, así como secuencias obtenidas del banco de genes (NCBI). Los números en paréntesis corresponden a los pasos mutacionales encontrados entre las diferentes especies. .... 52

## Índice de anexos

<b>Anexo 1.</b> Números de accesión de las muestras utilizadas en el árbol COX1,372 pb correspondiente a la región amplificada por Navajas et al. (1996), procedentes del banco de genes NCBI. ....	80
<b>Anexo 2.</b> Número de accesión de las muestras utilizadas en el árbol COX1,650 pb correspondiente a la región barcoding de Folmer <i>et al.</i> (1994). ....	81
<b>Anexo 3.</b> Caracterización de los diferentes cebadores para la amplificación utilizados. ..	82
<b>Anexo 4.</b> Porcentajes de variación interespecífica e intraespecífica para <i>B. yothersi</i> , <i>Brevipalpus</i> sp. nov y <i>B. azores</i> versus secuencias provenientes del NCBI.....	83
<b>Anexo 5.</b> Secuencia obtenida del virus de la leprosis de los cítricos citoplasmática (CILV-C), región fronteriza Costa Rica con Panamá. ....	84
<b>Anexo 6.</b> Secuencias obtenidas del virus de la tristeza de los cítricos. ....	84
<b>Anexo 7.</b> Mediciones ( $\mu\text{m}$ ) de las diferentes especies encontradas en los muestreos (mínimo-máximo (promedio $\pm$ desviación estándar), para las poblaciones en estudio n=12, y todas las mediciones son dadas en micrómetros ( $\mu\text{m}$ ))......	85
<b>Anexo 8.</b> Árbol filogenético inferido a partir de un análisis bayesiano de la región barcoding de Folmer et al.(1994) 650 pb del gen COX1 para <i>Brevipalpus</i> spp., en el cultivo de naranja, en Costa Rica. Modelo HKY+I+G. Las probabilidades posteriores se muestran como porcentajes en los nodos del árbol. Las secuencias obtenidas en esta investigación se encuentran en negrita. Escala: cambios esperados por sitio.....	86



UNIVERSIDAD DE  
COSTA RICA

SEP Sistema de  
Estudios de Posgrado

**Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.**

Yo, Jacqueline Abarca Durán, con cédula de identidad 115610325, en mi condición de autor del TFG titulado \_\_\_\_\_

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO BREVIPALPUS SPP.(ACARI:TENUIPALPIDAE) EN CÍTRICOS, Y EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA E IDENTIFICACIÓN DEL VIRUS DE LA LEPROSIS DE LOS CITRÍCOS (CiLV) ASOCIADO

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI  NO \*

\*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: 1 año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

**FIRMA ESTUDIANTE**

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

## A. INTRODUCCIÓN

Los ácaros planos pertenecen a la familia Tenuipalpidae, muchas de las especies poseen importancia agronómica a nivel mundial ya que tienen hábitos fitófagos; y algunas de estas son conocidas por ser vectores de diversos virus. Esta familia contabiliza 622 plantas hospederas con más de 1100 especies descritas en 38 géneros, donde *Brevipalpus* es el más numeroso con casi 300 (Childers *et al.* 2003a; Ochoa *et al.* 2016). Dentro de este género se encuentran los grupos *phoenicis*, *californicus*, *obovatus* y *cuneatus* los cuales están asociados a cítricos (Gerson 2008; Beard *et al.* 2015; Ochoa *et al.* 2016).

En Costa Rica se han identificado a las especies *Brevipalpus papayensis* (Baker), *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes), (Bank), *Brevipalpus yothersi* (Baker) y *Brevipalpus californicus* sensu lato asociadas a cítricos basado en caracteres morfológicos (Beard *et al.* 2015; Ávalos *et al.* 2016). Sin embargo, es necesario confirmar por medio de técnicas moleculares como la secuenciación de la región COX 1 del gen mitocondrial ya que no se cuenta con esta información en Costa Rica. Por lo que la identificación de ácaros del género *Brevipalpus* brinda datos relevantes en el manejo debido a la problemática que presentan algunas de las especies al ser vectores de virus. Algunas de las especies que afectan cítricos son vectores de la enfermedad viral conocida como la leprosis de los cítricos (Bastianel *et al.* 2010).

Desde su primer reporte para Costa Rica (Araya 2000), no existe un informe oficial acerca del movimiento que ha tenido el virus en las diferentes áreas citrícolas del país y se cree que este no se ha movilizó más allá de la zona fronteriza con Panamá. Por lo tanto, es necesario identificar las especies de *Brevipalpus* asociadas a cítricos, así como evaluar la presencia de la leprosis de los cítricos en el país.

Asimismo, es sabido que *Brevipalpus* posee especies crípticas (Beard *et al.* 2015), clasificando a varios grupos de estos ácaros como “un complejo de especies” en donde se podrían encontrar especies nuevas para la ciencia, principalmente en países tropicales como Costa Rica. De esta manera se pretende identificar las especies de *Brevipalpus* asociadas a *Citrus. sinensis* L., y la distribución en las regiones de Costa Rica, así como evaluar el estado de la leprosis de los cítricos.



# OBJETIVOS

## 1-Objetivo general

Determinar morfológica y molecularmente las especies del género *Brevipalpus* spp. (Acari: Tenuipalpidae) en cítricos y, evaluar la presencia del virus de la leprosis de los cítricos (CiLV).

## 2-Objetivos específicos

1. Determinar las especies del género *Brevipalpus* spp. (Acari: Tenuipalpidae) asociadas a cítricos por medio de caracteres morfológicos.
2. Utilizar técnicas moleculares en la identificación de especies de *Brevipalpus* spp. en cítricos.
3. Evaluar la presencia del virus de la leprosis de los cítricos en las principales zonas de producción del país.

## B. REVISIÓN DE LITERATURA

### 1. Generalidades del género *Brevipalpus*

El género *Brevipalpus* cuenta con una amplia gama de plantas hospedantes, las especies *B. californicus*, *B. obovatus* y *B. phoenicis* tienen 316, 451 y 486 hospederos respectivamente (Childers *et al.* 2003a).

La taxonomía del género *Brevipalpus* (Acari: Tenuipalpidae) ha presentado cambios significativos desde su descripción. Las especies de este género se encuentran divididas dentro de seis grupos: *phoenicis*, *californicus*, *cuneatus*, *portalis*, *obovatus* y *frankeniae*. De estos grupos *phoenicis*, *californicus*, *obovatus* y *cuneatus* están asociados a cítricos en América (Gerson 2008; Beard *et al.* 2015; Ochoa *et al.* 2016).

En el año 1952 Pritchard y Baker, identificaron a las hembras con dos solenidios en pata II y con ausencia de la seta f3 como *B. phoenicis*. En la revisión y descripción realizada por Beard *et al.* (2015), se tomaron en cuenta características adicionales como la rugosidad en la cutícula tanto dorsal como en las placas ventrales, la presencia y forma de la espermateca y la forma de la seta del fémur genu palpal. Como resultado de este trabajo, se identificaron siete especies diferentes que se encontraban “enmascaradas” bajo el nombre *B. phoenicis*.

Producto de esta reclasificación y descripción de nuevas especies el grupo *phoenicis* está actualmente conformado por: *B. yothersi* (Baker), *B. papayensis* (Baker), *Brevipalpus azores* (Beard y Ochoa), *Brevipalpus tucuman* (Beard y Ochoa), *Brevipalpus feresi* (Ochoa y Beard), *Brevipalpus ferraguti* (Ochoa y Beard),

*Brevipalpus hondurani* (Evans), y *B. phoenicis* (Geijskes) (Beard *et al.* 2015). El estudio de caracteres morfológicos ha sido una de las principales formas de clasificación de especies.

Además de las descripciones con caracteres morfológicos, se han incorporado otras herramientas en los estudios taxonómicos basados en técnicas moleculares para la identificación de estos ácaros.

La secuenciación de regiones de genes como la región *ITS*, gen *28S* y el *COX1*, son utilizados para la agrupación de individuos de acuerdo con sus similitudes genéticas, en el género *Brevipalpus* el *COX1* es uno de los más utilizados para la identificación de especies, estas herramientas que permiten obtener mejores evidencias para la identificación (Folmer *et al.* 1994; Navia *et al.* 2013, 2019).

Las investigaciones dirigidas en el pasado hacia la identificación de *Brevipalpus* retomaron importancia cuando se descubrió que son vectores de virus (Childers y Derrick 2003b; Rodrigues *et al.* 2003).

Posteriormente se encontró que *B. yothersi* es la principal especie vector de leprosis de los cítricos tipo citoplasmático, donde se encuentran dos virus diferentes el CiLV-C1 y CiLV-C2 (Locali *et al.* 2003; Roy *et al.* 2013: 20; Sánchez *et al.* 2015; Ramos *et al.* 2016). Mientras que *B. californicus* y *B. phoenicis* son vectores de la leprosis de los cítricos nuclear N CiLV-N (Ramos-González *et al.* 2017) y el OFV-citrus (García-Escamilla *et al.* 2018; Ramos-González *et al.* 2017) y *B. papayensis*

es capaz de transmitir la leprosis de los cítricos C (CiLV-C) y el coffee ring spot virus (CoRSV) (Nunes *et al.* 2018).

Además, se afirma que estos ácaros pueden transmitir los virus durante toda su vida, el virus es circulativo, sin embargo, no se replica dentro del ácaro vector ni se da transmisión transovárica (Nicolini *et al.* 2007; Tassi *et al.* 2017).

Estos virus afectan principalmente naranjos y mandarinos, han sido reportados en países como: Paraguay (Spegazzini, 1920), Brasil (Bitancourt, 1934), Argentina (Frezzi, 1940), Costa Rica (Araya 2000), Venezuela (Rangel *et al.* 2000), Panamá (Dominguez *et al.* 2002), Brasil (Rodrigues *et al.* 2003), México (NAPPO 2005), Honduras (Rodrigues *et al.* 2006), Colombia (Leon *et al.* 2006), Bolivia (Gómez *et al.* 2019), y Nicaragua (CABI/EPPO, 2013) y Sudáfrica (Cook *et al.* 2019).

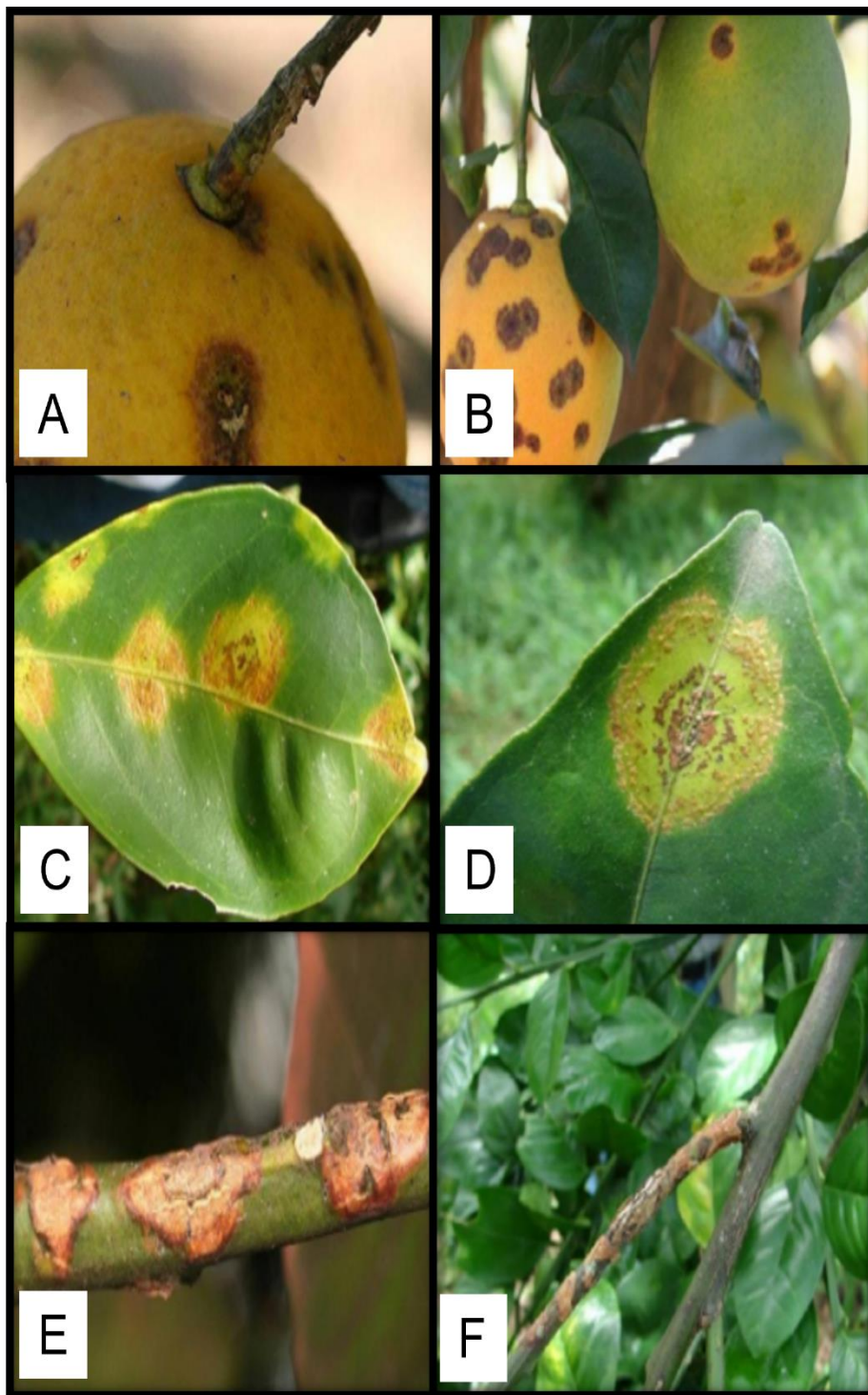
## **2. Leprosis de los cítricos, su relación con el género *Brevipalpus*, y otros virus asociados**

El complejo viral conocido como leprosis de los cítricos, es una enfermedad originaria de América, descubierta en Florida Estados Unidos en 1860 (Knorr y Denmark 1968; Childers *et al.* 2003c). Es considerada una enfermedad cuarentenaria y de importancia económica, la cual, ha afectado naranjos *C. sinensis* y mandarinos *Citrus reticulata* Blanco. La enfermedad destruyó casi el 70% de la producción de los cítricos en Florida en 1920, provocando un importante daño económico (Childers *et al.* 2003c).

La leprosis se divide en dos grupos, dependiendo de la organela donde se lleva a cabo la infección: Los virus del tipo citoplasmático que incluye el virus de la leprosis de los cítricos citoplasmático C (CiLV-C) y virus de la leprosis de los cítricos citoplasmático tipo 2 (CiLV-C2) pertenecientes a los géneros *Cilevirus* e *Higrevirus*. Los de tipo nuclear, virus de la leprosis de los cítricos N (CiLV-N) y el orchid fleck virus (OFV-citrus) del género *Dichorhavirus* (Ramos *et al.* 2017; Chabi *et al.* 2018).

El CiLV-C tiene un virión no envuelto, baciliforme, de dimensiones entre 100–120 por 60–70 nm, el genoma es bipartito, segmentado con un ARN1 y ARN2 en sentido positivo (de Lillo *et al.* 2021). Por su parte el CiLV-C2 presenta viriones de entre 100 a 110 por 40 a 50 nm, su genoma es bipartito en sentido positivo con un ARN1 y ARN2 (Roy *et al.* 2013). Mientras que los *Dichorhavirus* como el CiLV-N citrus se caracteriza por presentar dos ARNs en sentido negativo, con viriones baciliformes de tamaño entre los 120 a 135 por 20 a 30 nm, se encuentra principalmente en el núcleo, pero se pueden observar algunas partículas en el citoplasma (Roy *et al.* 2015a).

Las lesiones visuales asociadas a los virus de la leprosis se pueden presentar como manchas circulares cloróticas o necróticas en frutos (Figura 1, A y B), hojas (Figura 1, C y D) y ramas (Figura 1, E y F).



**Figura 1.** Síntomas causados por la leprosis de los cítricos, A) Virus de la leprosis de los cítricos CiLV-N), B) virus de la leprosis de los cítricos CiLV-C2. C) y D) Virus de la leprosis de los cítricos CiLV-C en hojas, E) y F) en ramas. Fuente: (Roy *et al.* 2013, 2014; Fazal ur Rehman *et al.* 2020)

La distribución geográfica de los virus de tipo citoplasmático es mucho más amplia que la del tipo nuclear, el cual solamente se ha encontrado en cítricos en la región de Panamá, Brasil, México y Colombia (Dominguez *et al.* 2001; Rodrigues *et al.* 2003; Freitas *et al.* 2004; Rodrigues y Kitajima 2005; Bastianel *et al.* 2010; Roy *et al.* 2014, 2015).

En el cultivo de naranja se pueden desarrollar otros virus de importancia que no son transmitidos por ácaros, como virus de la tristeza de los cítricos (CTV) el cual, se encuentra dentro de los virus más destructivos, ha causado la muerte de millones de árboles en áreas de cultivo en América del Sur, del Norte y el mediterráneo, y se encuentra ampliamente distribuido en Costa Rica (Dawson *et al.* 2015, Moreno *et al.* 2008). Otro de los virus que se pueden encontrar es el virus de la variegación de los cítricos (CVV, *Ilarvirus*), que ha sido reportado en el mediterráneo, Estados Unidos, y en el Valle Central de Costa Rica (Moreira *et al.* 2011).

### 3. Importancia económica de la leprosis de los cítricos

Los virus que causan la leprosis de los cítricos son considerados una amenaza para la industria citrícola; la que cuenta con un área cosechada a nivel mundial de 7 653 231 hectáreas. China, India y Brasil fueron los mayores productores de cítricos, en el año 2016 con 2 343 047 ha, 836 000 ha y 755 456 ha respectivamente (Rodrigues y Kitajima 2005; FAO 2019). En Costa Rica, el área cosechada de naranja fue de 22 500 ha con una producción de 219 509 toneladas métricas en el año 2021 (SEPSA 2022). De acuerdo con la última encuesta agropecuaria el 66,5% de la producción de naranja es utilizada para industria (INEC, 2020).

En algunos países, como Brasil, el CiLV causa altos costos en el combate del ácaro transmisor (*B. yothersi*) que suman más de 90 millones de dólares al año, convirtiéndose en la enfermedad viral más importante en cítricos (Rodrigues *et al.* 2001; Freitas *et al.* 2004; Bastianel *et al.* 2010).

En Costa Rica, la naranja es un cultivo de importancia tanto para la producción de jugo como de consumo fresco. Dada la relevancia económica de este cultivo, se ha realizado un esfuerzo por parte de los productores y el gobierno para mantener bajo control tanto plagas y enfermedades que afecten la producción de naranja, entre estas el virus de la leprosis de los cítricos.



Según Araya (2001), en el informe para las acciones de prevención contra la leprosis de los cítricos, se indica la presencia de este virus en las cercanías de la frontera con Panamá, donde se encontró un primer árbol infectado lo que conllevó a realizar un proceso de cuarentena y erradicación de los árboles afectados desde ese momento.

La principal forma de manejo preventivo de la leprosis es la identificación y análisis de la distribución de las especies de ácaros presentes en una región. Dentro del territorio nacional se han reportado las siguientes especies asociadas a cítricos: *B. papayensis* (Baker), *B. phoenicis* (Geijskes), (Bank), *B. yothersi* (Baker) y *B. californicus* sensu lato. Por su parte, las especies: *B. californicus*, *B. gliricidia*, *B. obovatus*, *B. phoenicis* han sido encontradas en hospederos no cítricos y todas fueron reconocidas con caracteres morfológicos (Aguilar y Murillo 2012; Avalos *et al.* 2016).

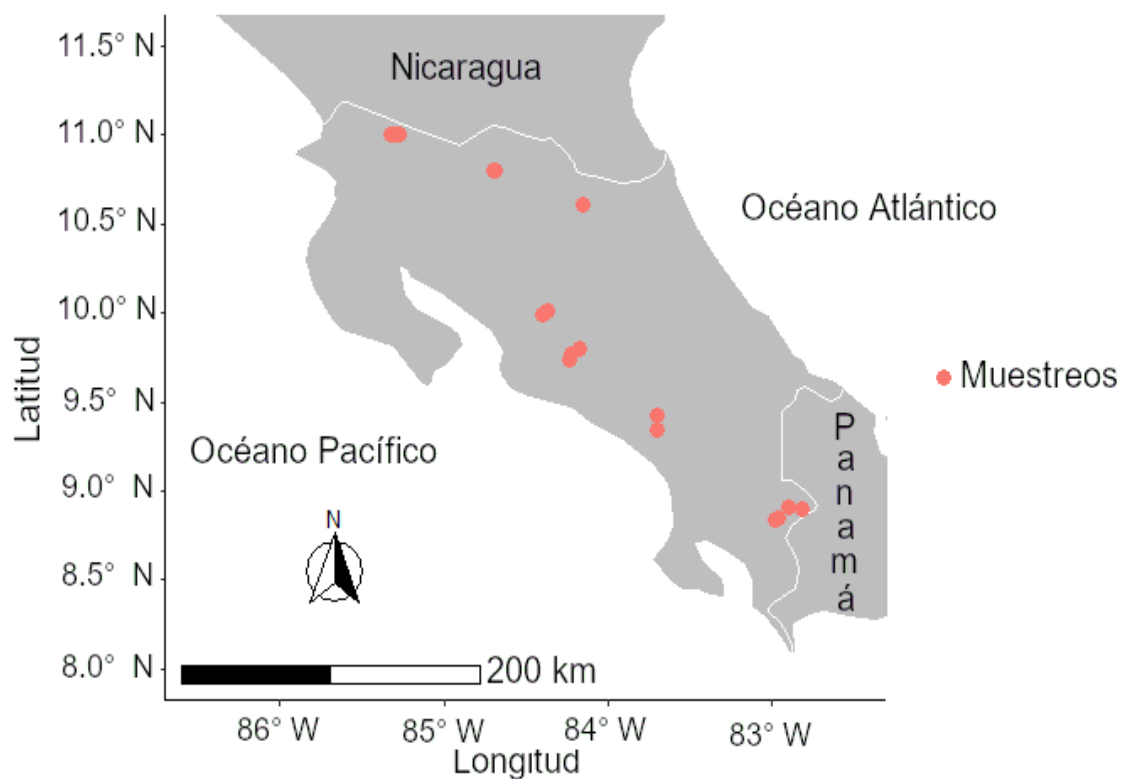
La observación de caracteres morfológicos y la utilización de técnicas moleculares son de vital importancia en la identificación de especies del género *Brevipalpus* (Roy *et al.* 2015b; Navajas *et al.* 1996). Asimismo, se requiere de técnicas moleculares como RT-PCR para el análisis de los virus de la leprosis de los cítricos: CiLV-C (Locali *et al.* 2003), CiLV-C2 (Roy *et al.* 2013), CiLV-N (Ramos-González *et al.* 2017) y OFV-citrus (Roy *et al.* 2014).

Debido a las pocas investigaciones que se han realizado en Costa Rica y al utilizar únicamente caracteres morfológicos para la separación de las especies de *Brevipalpus*, así como la necesidad de monitorear el estado de la enfermedad de la leprosis de los cítricos en el país, se realizó un muestreo en las principales zonas productoras de naranja (*C. sinensis*) con el fin identificar las especies de *Brevipalpus* asociadas y evaluar la presencia de la leprosis en plantaciones al azar.

## C. MATERIALES Y MÉTODOS

### a) Recolección de muestras procedentes de tres regiones de Costa Rica

Se recolectaron muestras de los principales lugares productores de cítricos de Costa Rica (Figura 2), además de áreas fronterizas. En total se muestrearon 16 fincas, ubicadas en la Región Huetar Norte: Upala (n = 3), Región Central: Santa Eulalia (n = 3), Atenas; Cangrejal (n = 2) y San Ignacio (n = 2), Acosta; y la Región Brunca: Sabalito (n = 1) y San Vito (n = 3), Coto Brus; Páramo (n = 1) y San Isidro del General (n = 1), Pérez Zeledón.



**Figura 2.** Ubicación de las fincas muestreadas en las regiones Huetar Norte, Central y Brunca.

La evaluación consistió en tomar tres muestras por finca, cada muestra fue compuesta por al menos 15 sub-muestras. Se recorrieron las plantaciones en busca de síntomas característicos de leprosis, sin embargo, al no observar nada similar se tomaron muestras con otro tipo de daños no asociadas a leprosis o con lesiones asociados a la presencia de ácaros. Para ello, se tomó material vegetal de naranja (*C. sinensis*), las mismas fueron utilizadas para las pruebas de virus y la búsqueda de los ácaros. Las fincas (F12, F14) fueron excepciones debido a la poca cantidad de árboles, por lo que se tomaron todos los árboles presentes.

#### **4. Procesamiento inicial del material vegetal y establecimiento de las colonias en el laboratorio**

Todas las muestras fueron revisadas cuidadosamente con ayuda de un estereoscopio. Los ácaros presentes fueron recolectados y colocados en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml y guardados en alcohol al 95%. Las hembras de *Brevipalpus* fueron utilizadas para establecer colonias uniparentales, en los casos en los que no se encontró hembras, se utilizó el estadio presente (huevo, larva, ninfa).

## 5. Preparación de frutos de naranja (*C. sinensis*)

Los frutos de naranja (*C. sinensis*) se colocaron en una solución de detergente líquido comercial al 1% durante 30 minutos, posteriormente se frotaron con una esponja, se enjuagaron con agua de llave y se dejaron secar al aire libre durante 24 horas. Luego, se realizó una doble revisión a los frutos preparados con un estereoscopio, esto con el fin de confirmar visualmente que los frutos estuvieran sin contaminantes (Franco *et al.* 2007; García-Escamilla *et al.* 2017).

Cada naranja fue recubierta con parafina derretida (70-75°C) en el 75% del fruto, con el objetivo de conservarlo el mayor tiempo. Se preparó un sustrato para los ácaros hecho de harina, yeso y arena (1:1:1) de 2 cm de diámetro aproximadamente, sobre la cáscara expuesta (sin cubrir con parafina) de los frutos con el fin de que los ácaros encontraran un sitio adecuado de establecimiento y oviposición. La región límite entre la parafina y la cáscara expuesta se cubrió con vaselina para impedir el paso de los ácaros y mantener aislada cada colonia.

Cada arena (naranja) se colocó sobre una base plástica de 3 cm de diámetro, estas fueron rotuladas con su respectivo código de identificación, incluyendo el número de finca, muestra, fecha y número de naranja. Finalmente, las arenas fueron colocadas en cámaras de incubación (HOTTECH) a una temperatura de 25 °C, 60% HR  $\pm$  5°C, fotoperiodo 12:12 (Avalos 2019). Las colonias fueron revisadas cada semana durante tres meses. Cuando la naranja se deshidrató, esta fue sustituida por una nueva, donde se traspasaron tres hembras y los estadios inmaduros cuidadosamente con un pincel. Las hembras restantes de cada naranja fueron

recolectadas en alcohol absoluto (95%) con su respectiva rotulación, donde al final se colocaron todos los individuos obtenidos de cada naranja.

En total se prepararon 87 naranjas (no simultáneamente) con el fin de obtener un mayor número de individuos.

## **6. Identificación morfológica**

La identificación morfológica de los especímenes recolectados se basó en los caracteres diagnósticos mencionados por Pritchard y Baker 1958 y Beard *et al.* (2015), donde se toma en cuenta la presencia y rugosidad de la cutícula, la presencia o ausencia de la espermateca, así como la forma y distribución de los pliegues en la placa ventral y genital. Trece especímenes por especie fueron observados en un microscopio Olympus (BX51) y las fotografías fueron tomadas con la cámara Euromex (CMEX5\_WiFi), las imágenes fueron escaladas con el software ImageFocusAlpha (Euromex).

## **7. Extracción de ADN para *Brevipalpus* spp. y secuenciación de la región COX 1 del gen mitocondrial.**

Para la identificación molecular de *Brevipalpus* spp., se utilizaron las muestras en las cuales se encontraron suficientes individuos, cinco fueron provenientes de colonias: dos de Santa Eulalia (F1 y F4), Atenas; una de San Ignacio (F5) y dos de Cangrejal (F7 y F8), Acosta. Adicionalmente, 4 muestras colectadas directamente en campo: dos de San Vito (F9 y F12) y una de Sabalito (F14), Coto Brus, culminado con una de Páramo (F13), Pérez Zeledón (Cuadro 1). Se realizó extracción de ADN a partir de ácaros individuales con el kit QIAamp DNA Micro kit (Qiagen, Alemania) diluidos en 25 µL de agua.

Para la reacción PCR se utilizaron los cebadores para la amplificación LCO1490 (Folmer *et al.* 1994) y DNR (Navajas *et al.* 1996) que amplifican la región mitocondrial, Citocromo Oxidasa I (COX1). La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 µL, para el cual se utilizó: PCR buffer (10 X) 1 X, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs (10 mM), 0.2 mM de imprimadores, 1.5 unidades de Platinum Taq DNA polymerase, 5 µL ADN y agua para completar la reacción.

El perfil térmico utilizado fue de 94°C por 4 min; 35 ciclos (94°C por 1 min; 54°C por 1min; 72°C por 1 min) y 72°C por 4 min (Sánchez-Velázquez *et al.* 2015). Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 1% con el marcador de peso molecular de 100bp (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Scientific), 3 µL tinte de carga (Tritrack, 6X, Thermo Scientific) y 3 µL de la reacción de PCR, en un transiluminador UV. Las amplificaciones obtenidas fueron

enviadas a la empresa Macrogen Inc. (Corea del Sur) a secuenciar por el método Sanger.

## **8. Filogenia a partir de la región COX 1 para *Brevipalpus* spp.**

Todas las secuencias fueron editadas, analizadas y alineadas se utilizó al programa BioEdit v.7.0.5.3 (Hall 1999). El programa jModelTest 2.1.10 v 20160303 (Darriba *et al.* 2012) se usó para encontrar el modelo evolutivo que mejor se ajustara a los datos. Las secuencias procedentes del NCBI (Anexo 1 y 2) para los análisis filogenéticos, dentro de ellas 30 secuencias del gen mitocondrial COX1 de la región amplificada de 372 pb por Navajas *et al.* (1996) y 12 secuencias de la región barcoding 645 pb de Folmer *et al.* (1994) de *Brevipalpus* spp.

El programa Mesquite (Maddisone y Maddisone 2021) fue para convertir el alineamiento al formato para MrBayes v 3.2.6, para realizar el análisis filogenético (Ronquist *et al.* 2012). Finalmente, el árbol fue observado con el programa FigTree v 1.4.3 (Rambaut y Drummond 2012).

Se recurrió al programa DNA sequence polymorphism (DnaSP 5.10) (Librado y Rosas 2009) para generar los datos de los haplotipos y el programa PopArt para visualizar la red de haplotipos (French *et al.* 2014; Bandelt 1999; Clement 2002). El programa Sequence Matrix se utilizó para calcular las distancias genéticas K2P (Kimura 2-parámetros) y el no corregido (Vaidya *et al.* 2011). El programa Splits Tree 4 para hacer el análisis de Concordancia genealógica filogenética de reconocimiento de especies (GCPSR) donde si el valor del estadístico  $\phi=1$  indica



que no hay recombinación, lo que significa que son especies diferentes (Huson y Bryant 2006).

## **9. Extracción de ARN y RT-PCR para detección de virus.**

Se utilizó el kit de extracción de ARN RNeasy Plant mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) según las recomendaciones del fabricante. Seguidamente, se utilizó el kit de retrotranscripción Revert First Stand cDNA Synthesis kit (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania) para obtener el ADN copia según las recomendaciones del fabricante.

La reacción de PCR fue llevada a cabo para todos los iniciadores (Anexo 3) con los siguientes lineamientos: DreamTaq buffer 1X, MgCl 2mM, dNTP's 0,8 mM, cebadores para la amplificación específicos para cada virus 0,2mM, Dream Taq polymerase 1U, la reacción fue completada con agua hasta llegar a los 25µL. Primeramente, se realizó la prueba para verificar que la extracción de ARN y retrotranscripción se llevó a cabo de la manera correcta, se utilizaron los cebadores que amplifican el gen 18S ARN ribosomal de planta IF18S2 F y R (Zhu *et al.* 2012). Adicionalmente, como otra verificación de que no hay inhibidores de PCR o hubo degradación del ARN, se evaluó las muestras para dos virus de cítricos de genoma ARN de simple hebra como los virus asociados a leprosis, y que han sido detectados en el país, y para los cuales se cuenta con control positivo. El virus de la tristeza de los cítricos (CTV), ampliamente distribuido en el país, y como una segunda posibilidad, el virus de la variegación de los cítricos (CVV), de detección reciente y que no se conoce su distribución en el país (Moreira *et al.* 2011). Por lo tanto, este análisis no solo sirve para verificar que las muestras son aptas para la detección de

un virus ARN en la muestra, sino también puede generar información sobre otro virus de cítricos en el país. La detección de todos los virus se realizó con los iniciadores correspondientes y utilizando las condiciones térmicas recomendadas: CiLV-C, MPF y R (Locali *et al.* 2003); CiLV-C2, CPG-F y R (Roy *et al.* 2013); CiLV-N, N-DC- F y R (Ramos-González *et al.* 2017); OFV-citrus, NPF y R (Roy *et al.* 2014); CTV, CTV6 F y R (Wang *et al.* 2020); y CVV Ilar 1F5 y Ilar 1R7 (Untiveros *et al.* 2010) (Anexo 3).

Se utilizó un control positivo de CiLV-C proporcionado por el Laboratorio de Fitopatógenos Obligados y sus Vectores (LaFOV) del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), con todos los cebadores utilizados.

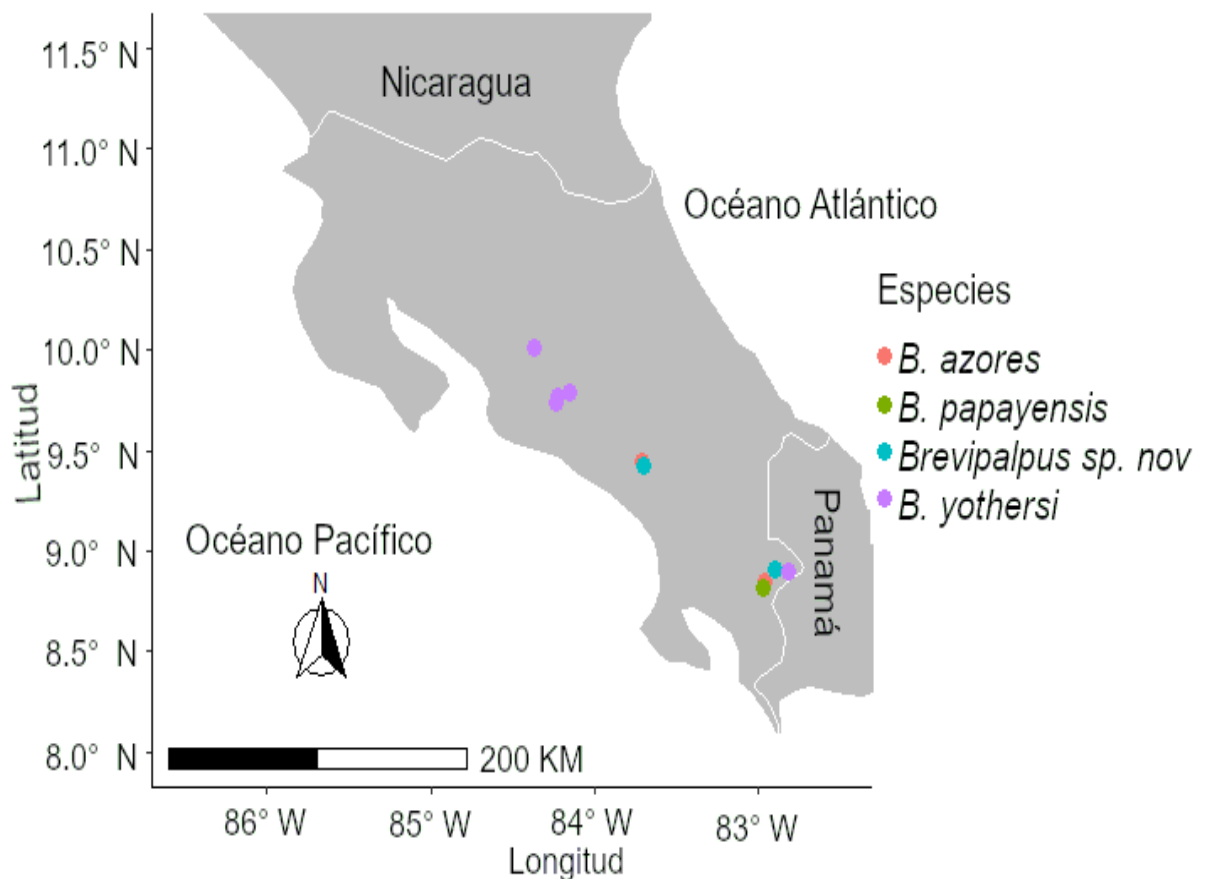
## **10. Porcentaje de identidad de las secuencias virales dentro del NCBI**

Las amplificaciones obtenidas de las muestras positivas fueron enviadas a secuenciar a la empresa MacroGen Inc, editadas y analizadas utilizando BioEdit v.7.0.5.3 (Hall 1999), estas secuencias fueron comparadas con las encontradas en el NCBI, para confirmar su identidad.

## D. RESULTADOS

### a) Muestreo en tres diferentes regiones del país

En el muestreo realizado se recolectaron un total de 48 muestras de las regiones Central, Brunca y Huetar Norte, donde para la última región solamente fue encontrado un huevo de *Brevipalpus* spp., que no llegó a término. Del total de fincas muestreadas 30 fueron positivas para *Brevipalpus* spp., encontrándose huevos, larvas, protoninfas, deutoninfas o adultos. Además del género *Brevipalpus* se identificaron asociados a los cítricos ácaros de la familia Phytoseiidae, también las especies *Panonychus citri* (McGregor,) y *Phyllocoptruta oleivora* (Ashmead), sin embargo, su frecuencia y densidad fue inferior a 10 individuos por finca.



**Figura 3.** Ubicación de fincas y distribución de las especies encontradas en el cultivo de naranja (*C. sinensis*).

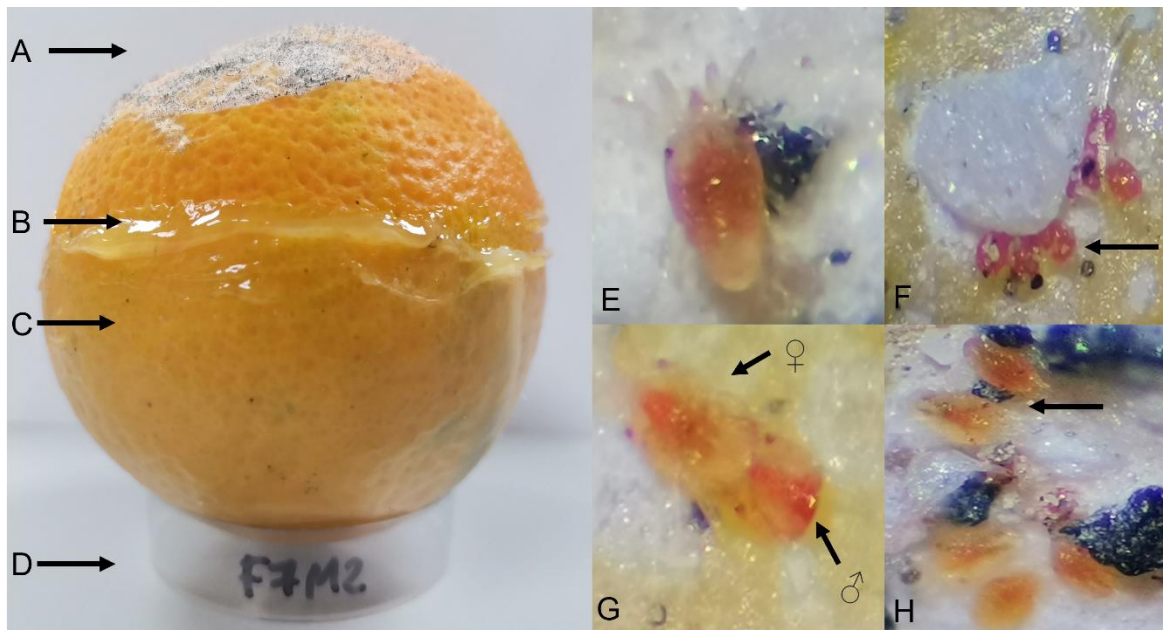
El promedio de las poblaciones encontradas, en las tres regiones del país muestreadas osciló entre 1 y 42 ácaros (Cuadro 1), donde el mayor número de individuos fue encontrado en: San Vito y Sabalito, Coto Brus y Páramo, Pérez Zeledón. Además, con respecto a la distribución geográfica de las especies recolectadas, se encontró a *B. yothersi* en la región Central y Brunca, y a *B. papayensis*, *B. azores* y *Brevipalpus* sp.nov., en la región Brunca (Figura 3).

**Cuadro 1.** Número de individuos de *Brevipalpus* spp. encontrados por finca en las muestras recolectadas en *Citrus sinensis* expresados en promedio (Max-Min).

<b>Regiones socioeconómicas</b>	<b>Localidad/Fincas muestreadas</b>	<b>□ (Max-Min) individuos</b>
Región Huetar Norte	Birmania, Upala, F15, F16, F17	1 (1-0)
	Santa Eulalia, Atenas, F1, F2 y F4	1 (3-0) 3 (4-2) 11 (30-2)
Región Central	San Ignacio, Acosta, F5 y F6	1 (1-0) 1 (2-0)
	Cangrejal, Acosta F7 y F8	1 (1-0) 2 (3-0)
Región Brunca	San Vito, Coto Brus, F9 y F10	3 (7-0) 3 (7-0)
	San Isidro, Pérez Zeledón, F11	5 (10-2)
	San Vito, Coto Brus, F12	12 (27-0)
	Páramo, Pérez Zeledón, F13	20 (39-2)
	Sabalito, Coto Brus, Walter, F14	42 (74-9)

## 11. Número de individuos provenientes de las colonias establecidas

Del total de colonias establecidas en el laboratorio (Figura 4), cuatro sobrevivieron; dos provenientes de Santa Eulalia en Atenas, mismo número para Cangrejal, Acosta (Cuadro 2). Para estas colonias se obtuvo un mínimo de 31 individuos y un máximo de 313. Las principales causas de pérdida de colonias fueron provocadas por la muerte del individuo colocado en la naranja, seguido de pérdidas por contaminación de hongos o bacterias en las naranjas preparadas.



**Figura 4.** Colonia preparada y desarrollo de *Brevipalpus yothersi*, (A) arena, (B) vaselina, (C) capa de parafina, (D) placa petri plástica. (E) hembra, (F) huevos, (G) macho y hembra copulando, (H) estadios inmaduros en frutos de naranja (*C. sinensis*).

**Cuadro 2.** Número de individuos totales establecidos en colonias en el Laboratorio de Acarología, UCR, San Pedro de Montes de Oca, San José.

Regiones socioeconómicas	Localidad	Número de individuos	Especie establecida
	Santa Eulalia, Atenas, F1 y F4	50	
Región Central	.....	31	<i>Brevipalpus yothersi</i>
	Cangrejal y San Ignacio, Acosta	313	
	F7 y F8	47	

## 12. Identificación morfológica de especies de *Brevipalpus* presentes en Costa Rica

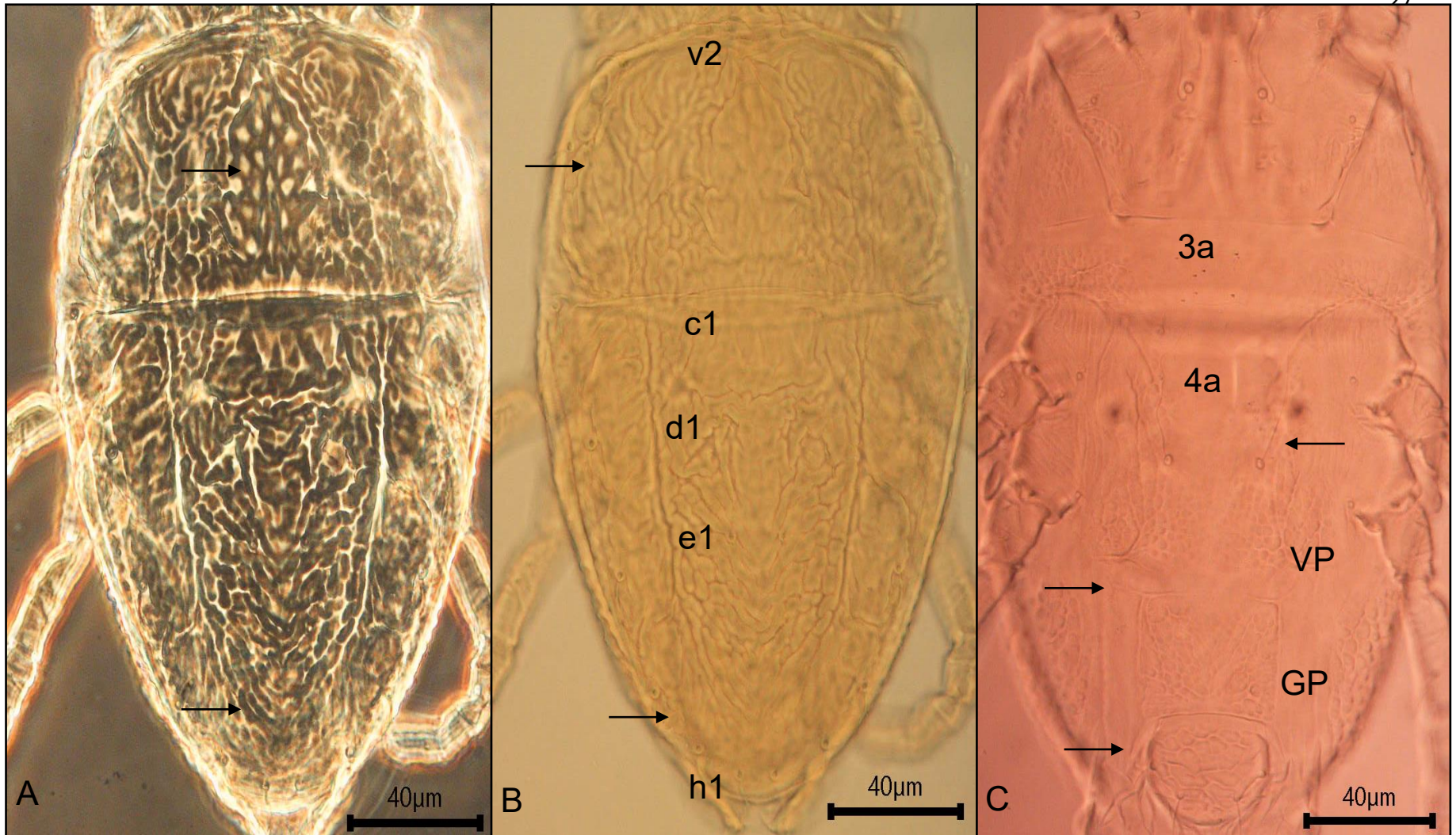
En las poblaciones de *B. yothersi* se observó que estas presentaban un cuerpo ovoide con reducción del ancho en el opistosoma (Figura 5). El largo mínimo entre las setas v2 y h1 fue de 197  $\mu\text{m}$  y un máximo de 220  $\mu\text{m}$ , donde el promedio fue de 208  $\mu\text{m}$ . El ancho entre las setas sc2-sc2 promedio fue de 130  $\mu\text{m}$  con un mínimo de 120  $\mu\text{m}$  y un máximo de 150  $\mu\text{m}$ . En el caso del ancho entre las setas c3-c3 se obtuvo un promedio de 139  $\mu\text{m}$  con un mínimo de 130  $\mu\text{m}$  y un máximo de 150  $\mu\text{m}$  (Anexo 7).

Las poblaciones se caracterizaron por presentar un prodorso central con muchas areólas (es decir la presencia de círculos formados por la reticulación en la cutícula) y elongado longitudinalmente, entre las setas c1-c1 a d1-d1 se observó una reticulación suave, entre d1-d1 y e1-e1 débilmente reticulado o arrugado y entre e1-e1 y h1-h1 la cutícula presentó fuertes pliegues en forma de V (Figura 5, A y B), mientras que la parte ventral con la presencia de celdas de forma irregular ubicadas principalmente en la placa ventral y genital (Figura 5, C y D).

La seta dorsal de *B. yothersi* del fémur genu de forma palpal barbada y delgada, (Figura 6 A), también se observó la presencia de dos solenidios en la pata II (Figura 6 B). Además, en la cutícula entre las setas 3a y 4a se observaron celdas redondeadas haciéndose débiles centralmente, encontrando una mayor presencia de las celdas hacia la parte posterior de la seta 4a (Figura 6 C). Se logró observar la presencia de espermatecas conformadas por un ducto delgado que termina en una vesícula esclerotizada redondeada con presencia de un estipe (Figura 6 D).

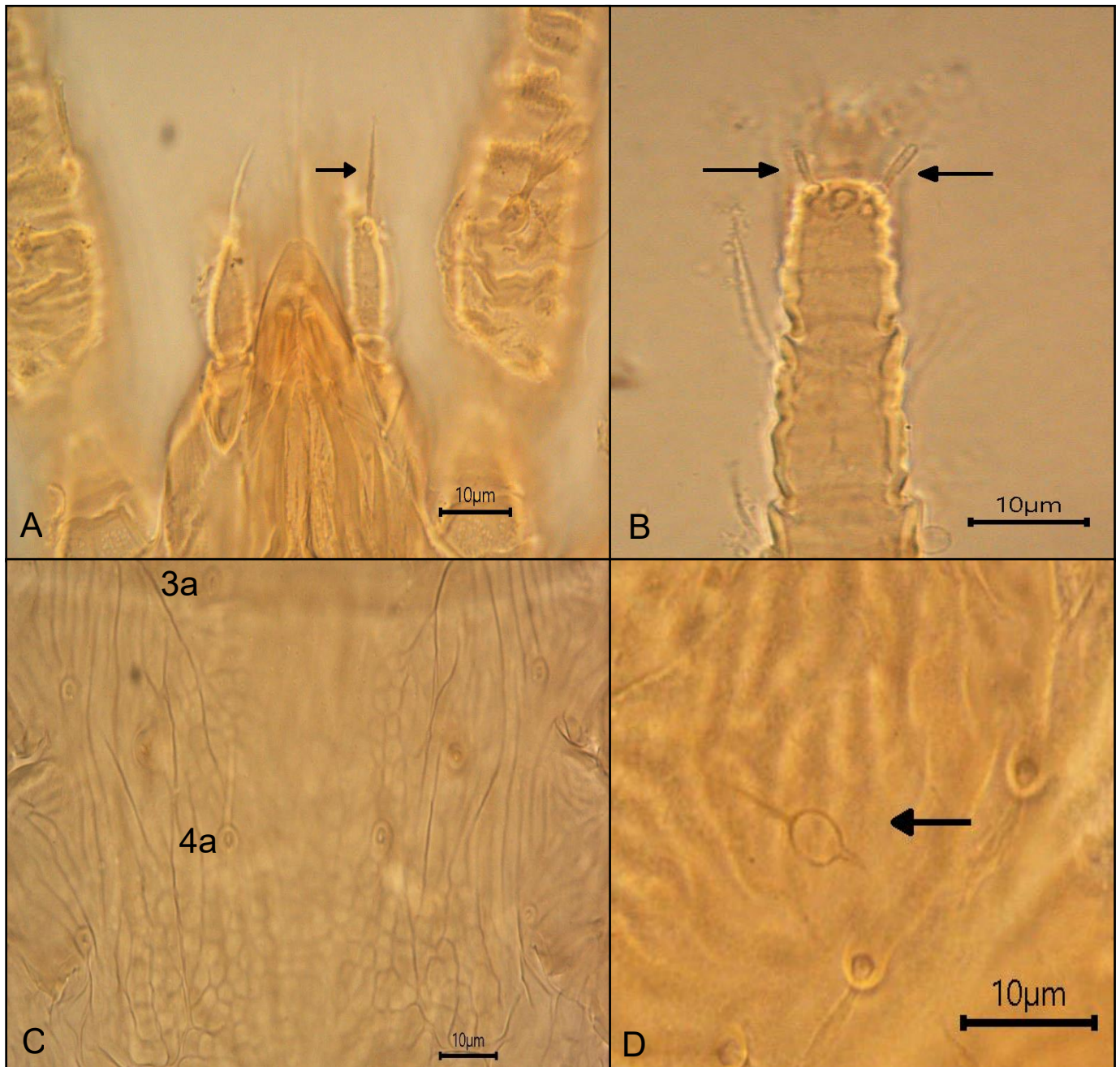
La cutícula central del propodosoma dorsal se observó con areólas y la formación de celdas alargadas en forma longitudinal en la cutícula sublateral, (Figura 7 A), así como el propodosoma ventral con la presencia de celdas redondas en los laterales (Figura 7 B). En el opistosoma entre las setas e1 y h1 se observaron pliegues fuertes en forma de V debilitándose hacia 1 (Figura 7 C), la placa ventral (VP) presentó de forma uniforme celdas redondas. En el caso de la reticulación en la GP se observan verrugas fusionadas que resultan en celdas alargadas (Figura 7 D).



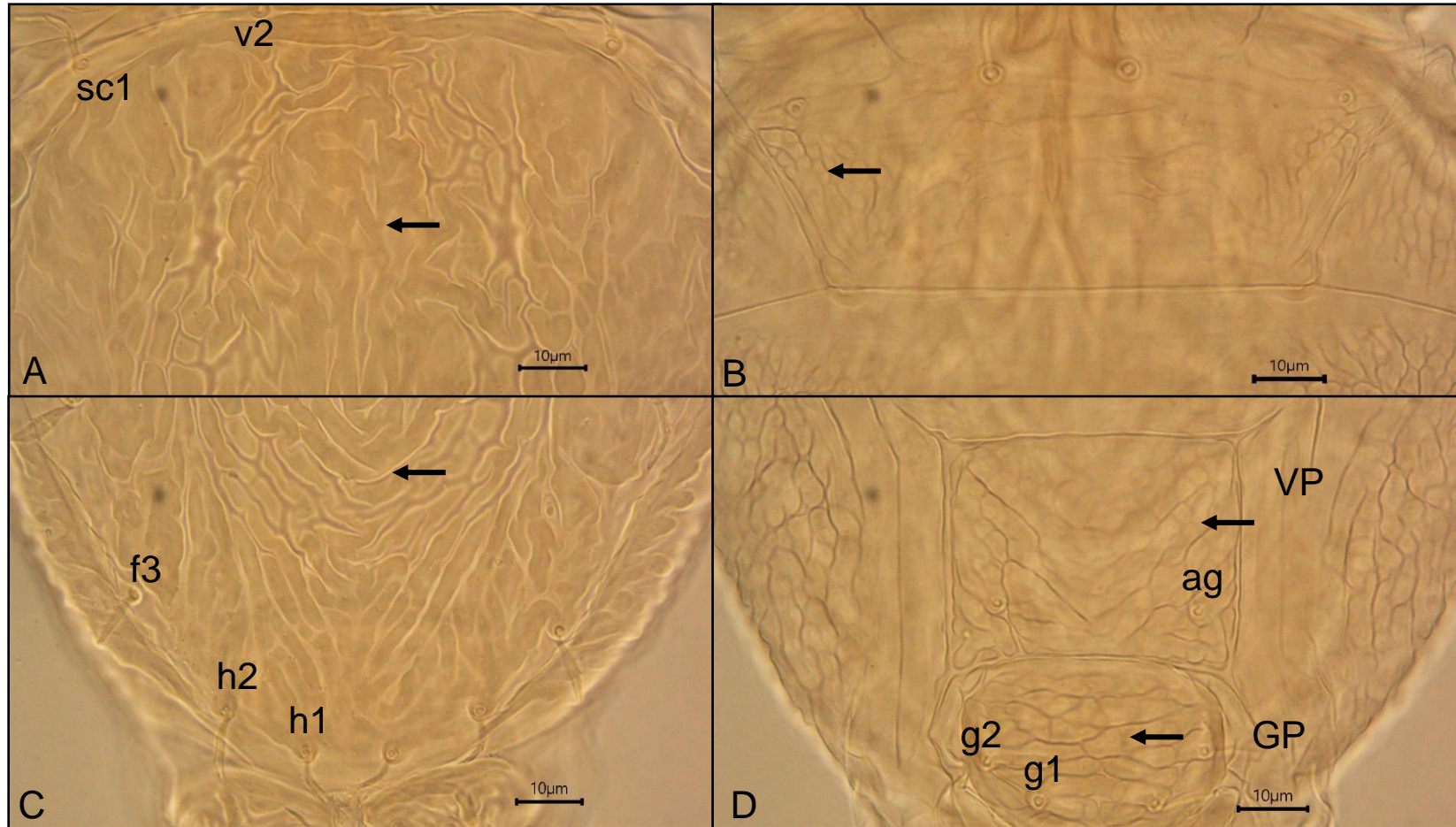


**Figura 5.** Hembra de *Brevipalpus yothersi*. A) y B) vista dorsal con areólas presentes en el propodosoma y líneas en forma de V en el opistosoma (contraste de fases y DIC, respectivamente), C) vista ventral con la presencia de pequeñas areólas en la placa ventral (VP), placa genital (GP) con celdas fusionándose, formando celdas de mayor tamaño (DIC).





**Figura 6.** Hembra de *Brevipalpus yothersi*. A) Gnatosoma (la flecha indica la seta en el palpo), B) solenidios pata II (flechas indican los solenidios), C) areólas presentes entre las setas 3a-4a, D) espermateca con estipe distal.



**Figura 7.** Hembra de *Brevipalpus yothersi*. A) propodosoma reticulado, B) ventralmente con celdas redondas en los laterales, C) opistosoma con pliegues en forma de V hacia la seta h1, D) placas ventrales (VP) y genitales (GP) con areólas fusionadas.

Las poblaciones de *Brevipalpus* sp. nov. (F12, F13 y F14) encontradas en la Región Brunca, presentaron forma del cuerpo ovoide (Figura 8). Según las mediciones realizadas, presentaron un largo entre la seta v2 y h1 (Figura 8) promedio de 232  $\mu\text{m}$  con un mínimo de 220  $\mu\text{m}$  y máximo de 243  $\mu\text{m}$ , el ancho entre las setas sc2-sc2 fue en promedio de 147  $\mu\text{m}$  con un mínimo de 141  $\mu\text{m}$ , y máximo de 153  $\mu\text{m}$  y entre las setas c3-c3 un promedio de 153  $\mu\text{m}$  con un mínimo de 153  $\mu\text{m}$ , y un máximo de 160  $\mu\text{m}$ .

Se observó la cutícula central con fuerte areolado (Figura 8) con algunas celdas alargadas en la cutícula sublateral, mientras que la cutícula entre la seta c1-c1 hasta d1-d1 con la presencia de algunas reticulaciones débiles principalmente transversales, entre las setas d1-d1 a e1-e1 la cutícula es lisa o débilmente reticulada, y de la seta e1-e1 a h1-h1 con reticulaciones transversales poco curvadas convirtiéndose longitudinales hacia h1 (Figura 8).

La seta dorsal del fémur gena palpal es lanceolada, serrada (Figura 9 A), presencia de dos solenidios en pata II, uno en posición axial y otro abaxial (Figura 9 B), la cutícula entre las setas 3a-4a con líneas longitudinales que se van entrecruzando y curvando hacia 4<sup>a</sup> (Figura 9 C), se encontró desarrollo de un ducto delgado y largo terminando en una vesícula esclerotizada con forma semi-esférica en la parte distal y en forma de V en la parte proximal ambos extremos con pequeñas apéndices que la rodean la vesícula (Figura 9 D).

El propodosoma central se caracterizó por tener muchas areólas, con celdas elongadas (Figura 10 A), por su parte, en la parte ventral tiene vesículas laterales, con algunas unidas formando celdas de mayor tamaño que se incrustan transversalmente hacia la parte central donde se debilitan (Figura 10 B). En la parte lateral de las setas e1 se encontró un pliegue ubicado en forma oblicua y entre las bases de las setas e1 se observó una figura con un símbolo similar a ohm  $\Omega$  (Figura 10 C), desde e1 hasta h1, los pliegues transversales que son curvados en su parte central se convierten en pliegues perpendiculares hasta desaparecer (Figura 10 D).

La placa ventral (VP) tiene pliegues transversales curvados, con algunas celdas alargadas en los laterales, mientras que la placa genital (GP) tiene celdas alargadas transversales en su mayoría y algunas celdas fusionadas formando pliegues más largos (Figura 10, E).



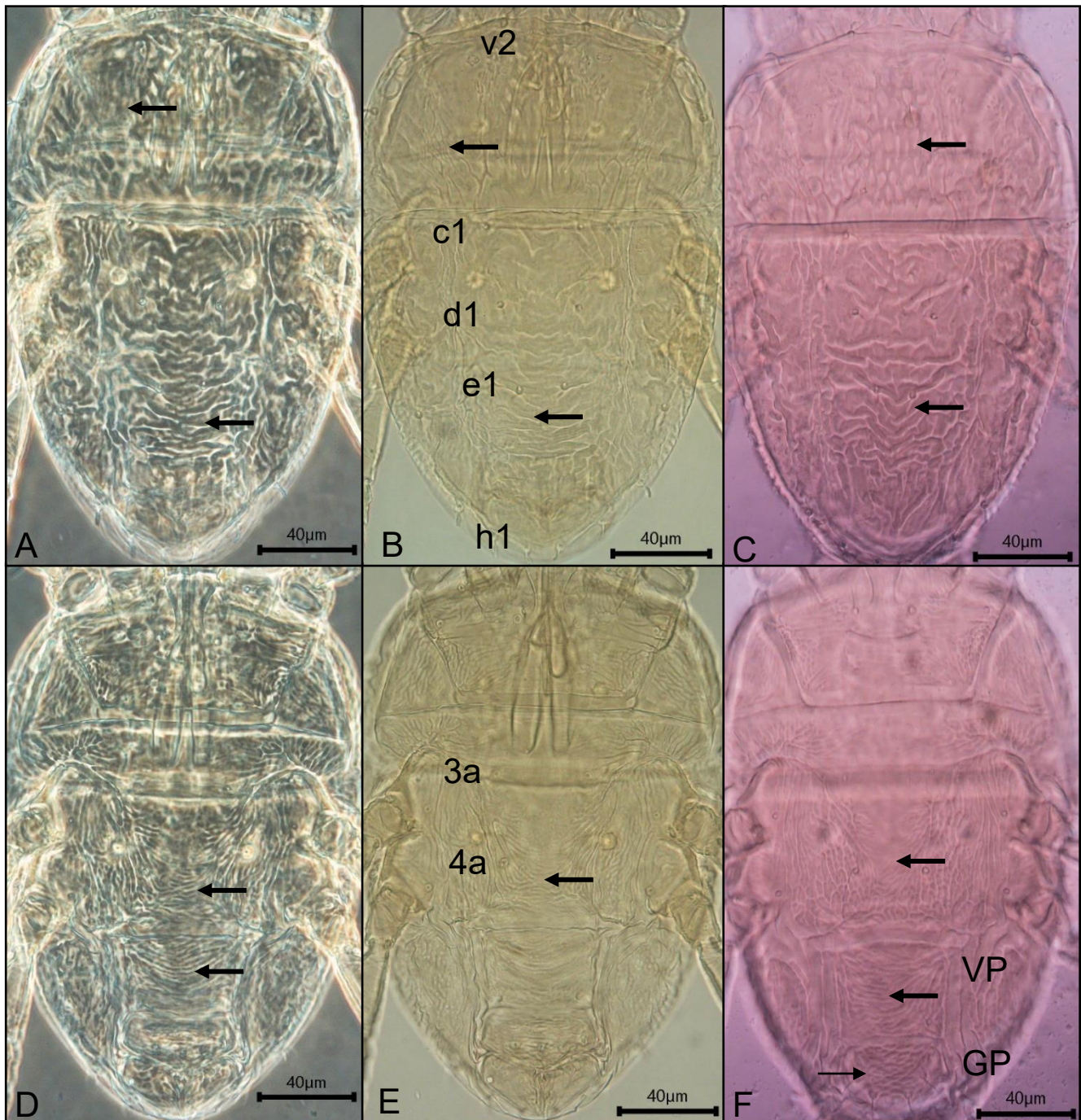
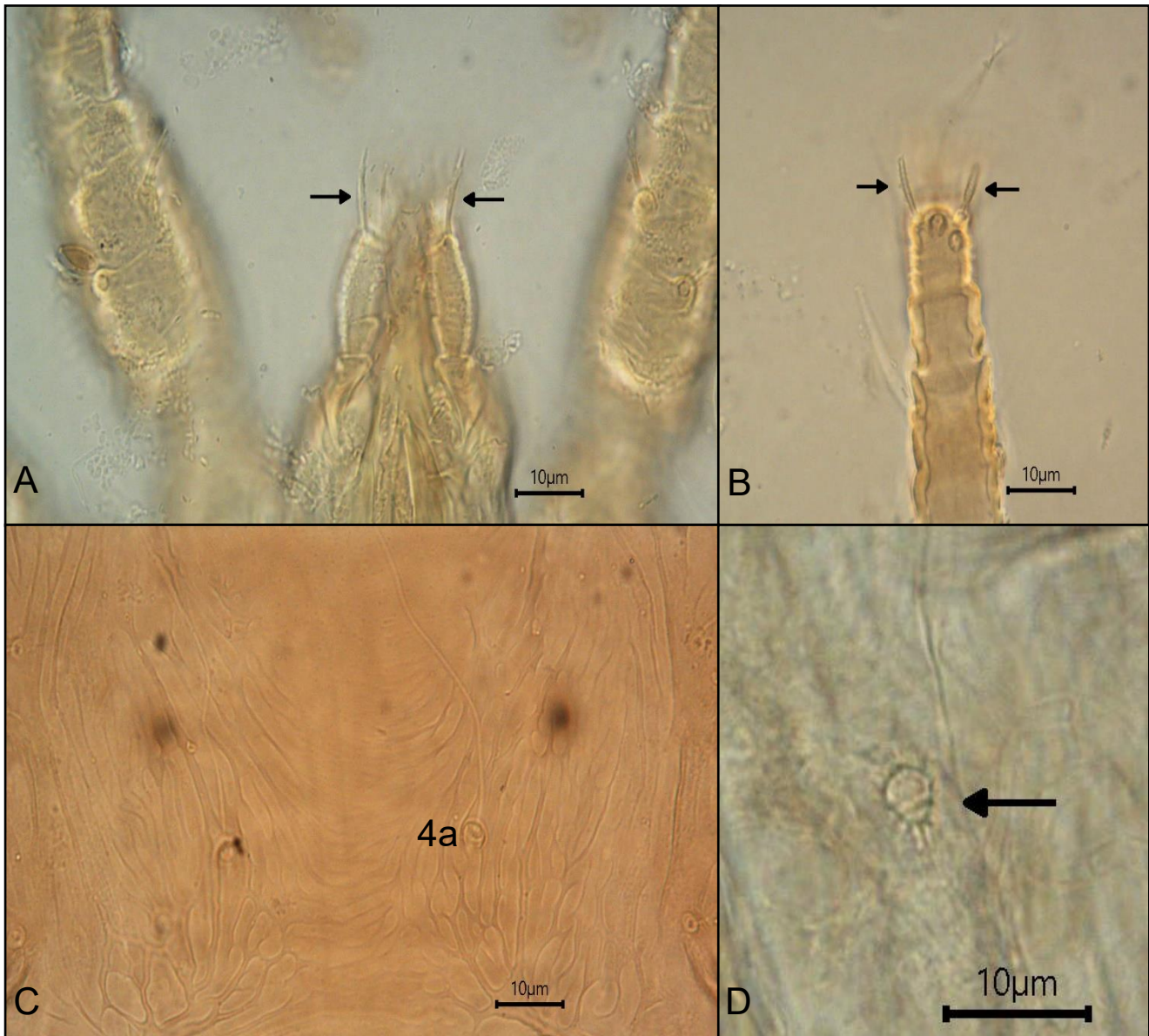
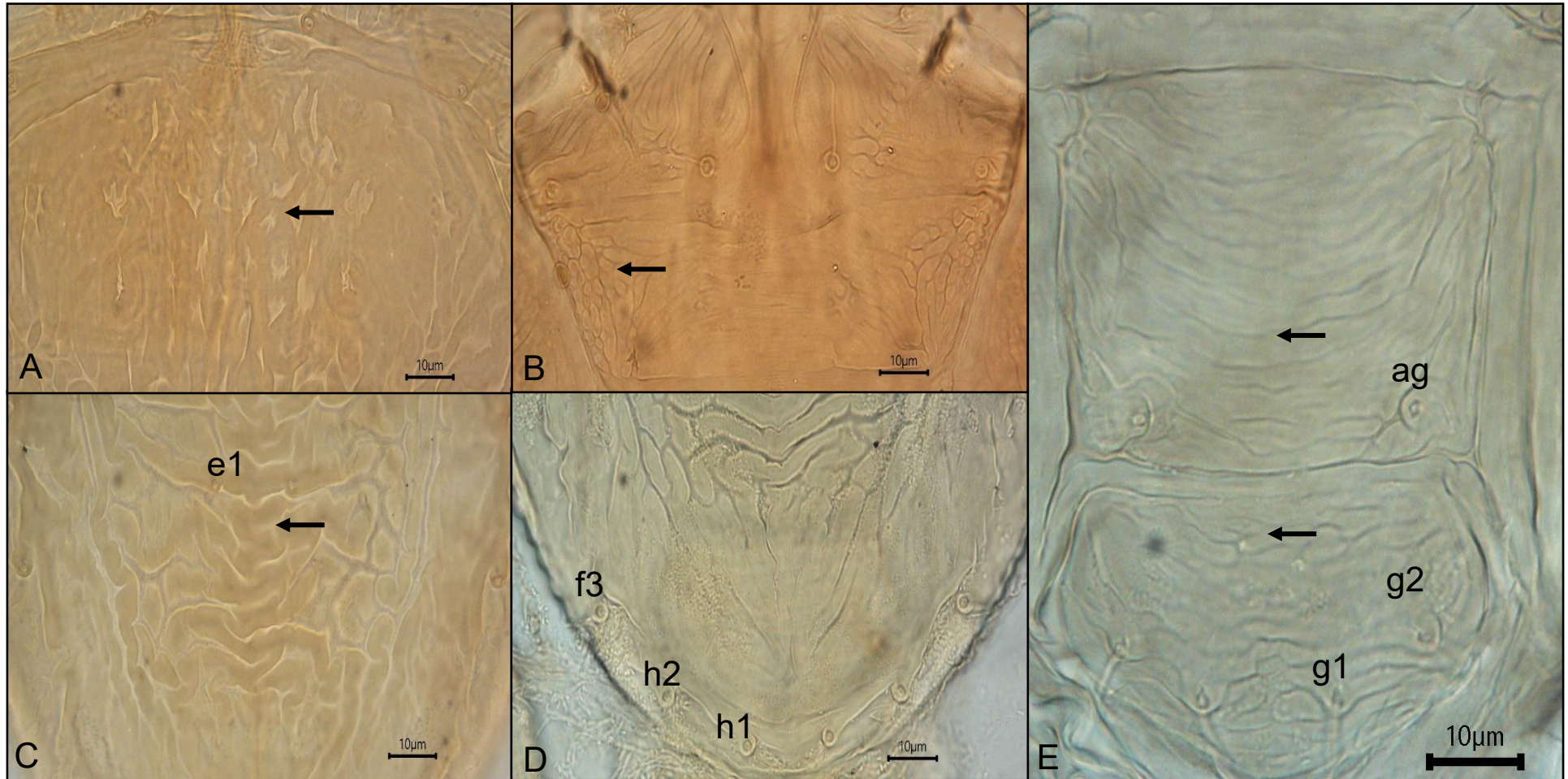


Figura 8. Hembra de *Brevipalpus* sp. nov. (F12, F13 y F14), A) presencia de areolas y reticulación lateral en el propodosoma (contraste de fases), B) y C) presencia de areolas y reticulación lateral en el propodosoma y la reticulación en opistosoma, D) presencia de líneas longitudinales entre las setas 3a-4a, también en placas ventrales (VP) y genitales (GP) (contraste de fases), E) y F) presencia de líneas longitudinales entre las setas 3a-4a, también en placas ventrales (VP) y genitales (GP) (DIC).





**Figura 9.** Hembra de *Brevipalpus* sp. nov. (F12, F13 y F14) A) gnatosoma (la flecha indica la seta en el palpo), B) solenidios pata II (flechas indican los solenidios). C) reticulación entre las setas 3a-4a con líneas longitudinales débiles hacia el centro, D) espermateca con vesícula esclerotizada con proyecciones (DIC).



**Figura 10.** Hembra de *Brevipalpus* sp. nov. (F12, F13 y F14) A) reticulación en propodosoma dorsal, B) presencia de areolas en los laterales C) reticulación en bandas longitudinales en opistosoma dorsal central, D) líneas longitudinales se convierten en verticales hacia h1, E) placa ventral con líneas longitudinales curvadas en el centro (VP) y placa genital (GP) con celdas fusionadas formando bandas alargadas (DIC).

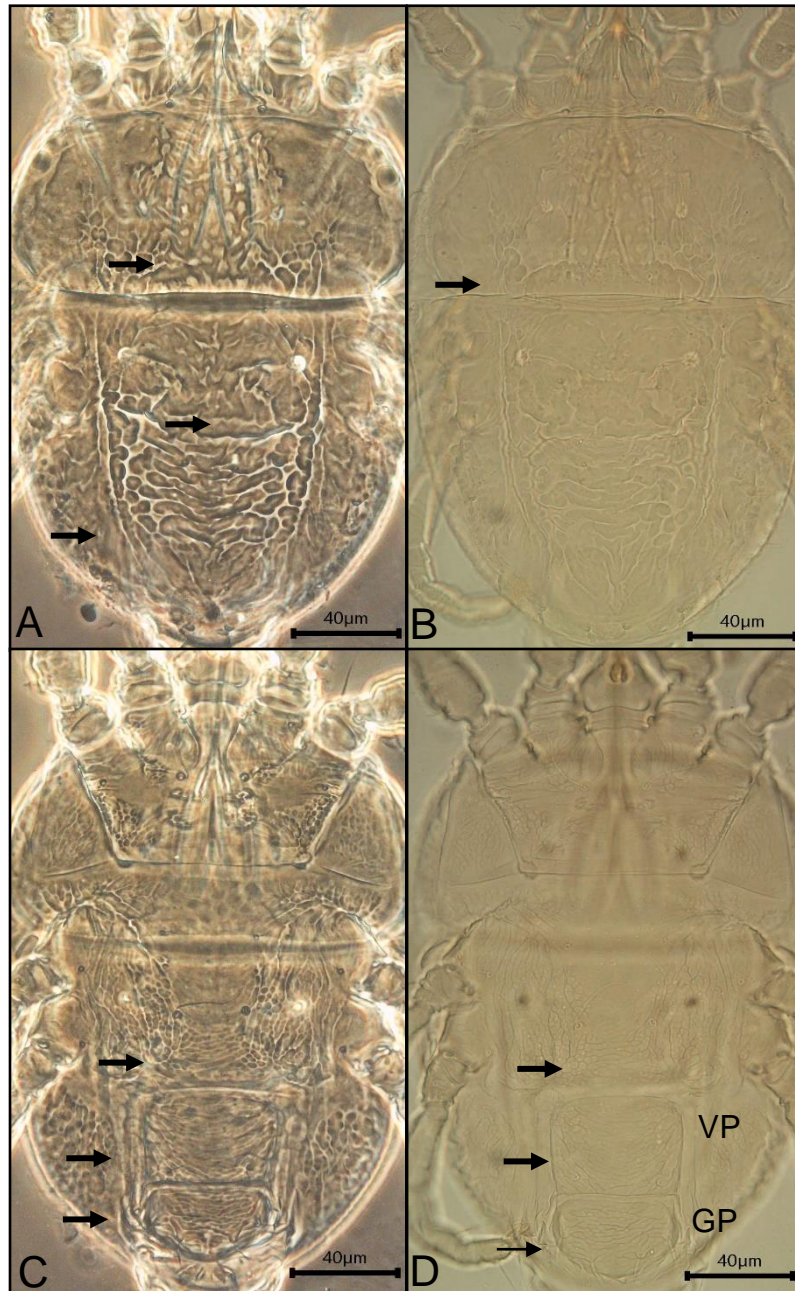


Las poblaciones de *B. azores* presentaron una longitud promedio entre las setas v2 y h1 de 231  $\mu\text{m}$  con un mínimo encontrado de 220  $\mu\text{m}$  y un máximo de 239  $\mu\text{m}$ , mientras que el ancho mínimo entre las setas sc2-sc2 fue de 141  $\mu\text{m}$  con un máximo de 160  $\mu\text{m}$ , donde el promedio obtenido fue de 155  $\mu\text{m}$ . En el caso del ancho entre las setas c3-c3 el promedio fue de 162  $\mu\text{m}$  con un mínimo de 132  $\mu\text{m}$  y un máximo obtenido de 171  $\mu\text{m}$ .

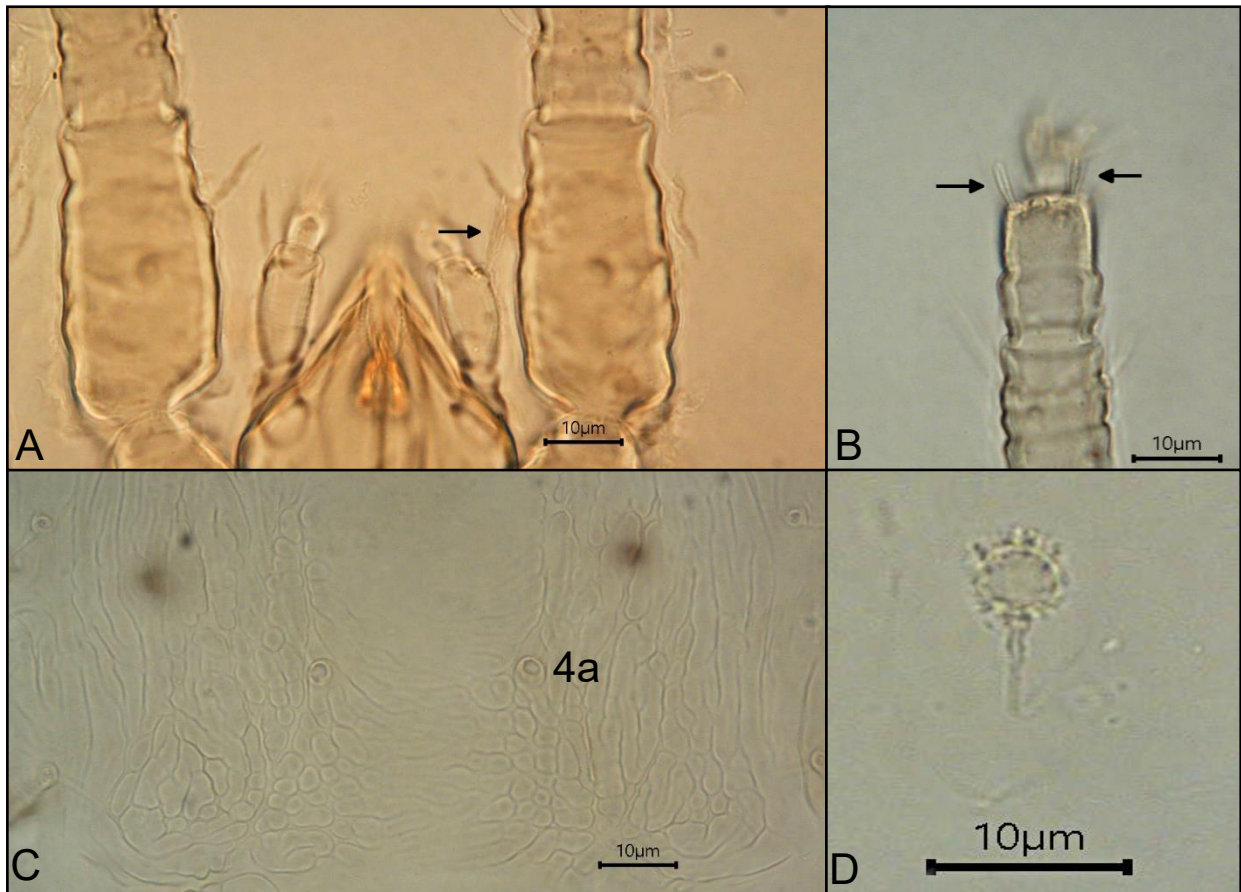
Estos individuos presentaron una cutícula central en el prodorso con areólas de mayor tamaño, cutícula sublateral con celdas redondeadas, cutícula entre las setas c1-c1 y d1-d1 lisa o débilmente arrugada, la cutícula entre las setas d1-d1 a e1-e1 lisa o débilmente reticulada, en el caso de la cutícula entre las setas e1-e1 a h1-h1 con pliegues trasnversos convirtiéndose a abruptamente longitudinales hacia h1-h1, la placa ventral se caracterizó por tener la presencia de verrugas redondeadas, mientras que la placa genital con la presencia de bandas longitudinales (Figura 11).

La seta dorsal del fémur genu palpal para *B. azores* es ancha, aplanada y barbada (Figura 12 A). Con presencia de dos solenidios en la pata II, uno en posición axial y otro en posición abaxial (Figura 12 B). La cutícula cercana a las setas 3a-4a con areólas, incluso algunas fusionadas formando celdas alargadas, principalmente en las partes laterales y acercándose a la placa ventral (Figura 12 C). Se observó la presencia de espermatecas conformadas por un ducto largo y delgado que culmina en una vesícula esclerotizada redondeada que se encuentra rodeada de apéndices (Figura 12 D).

La cutícula encontrada en el propodosoma central con areólas, mientras que en la porción sub-lateral de la cutícula se pueden observar celdas redondeadas (Figura 13 A), en la misma posición pero ventralmente se observan pequeñas celdas en los laterales mientras que centralmente estas se encuentran fusionadas formando celdas de mayor tamaño (Figura 13 B). Desde la seta e1 hasta la seta h1 se observaron pliegues transversos convirtiéndose en longitudinales conforme se acercan hacia h1 (Figura 13 C). La placa ventral presentó bandas transversas que se debilitan en el interior de la placa, al igual que la placa ventral que presentó bandas angostas oblicuas (Figura 13 D).

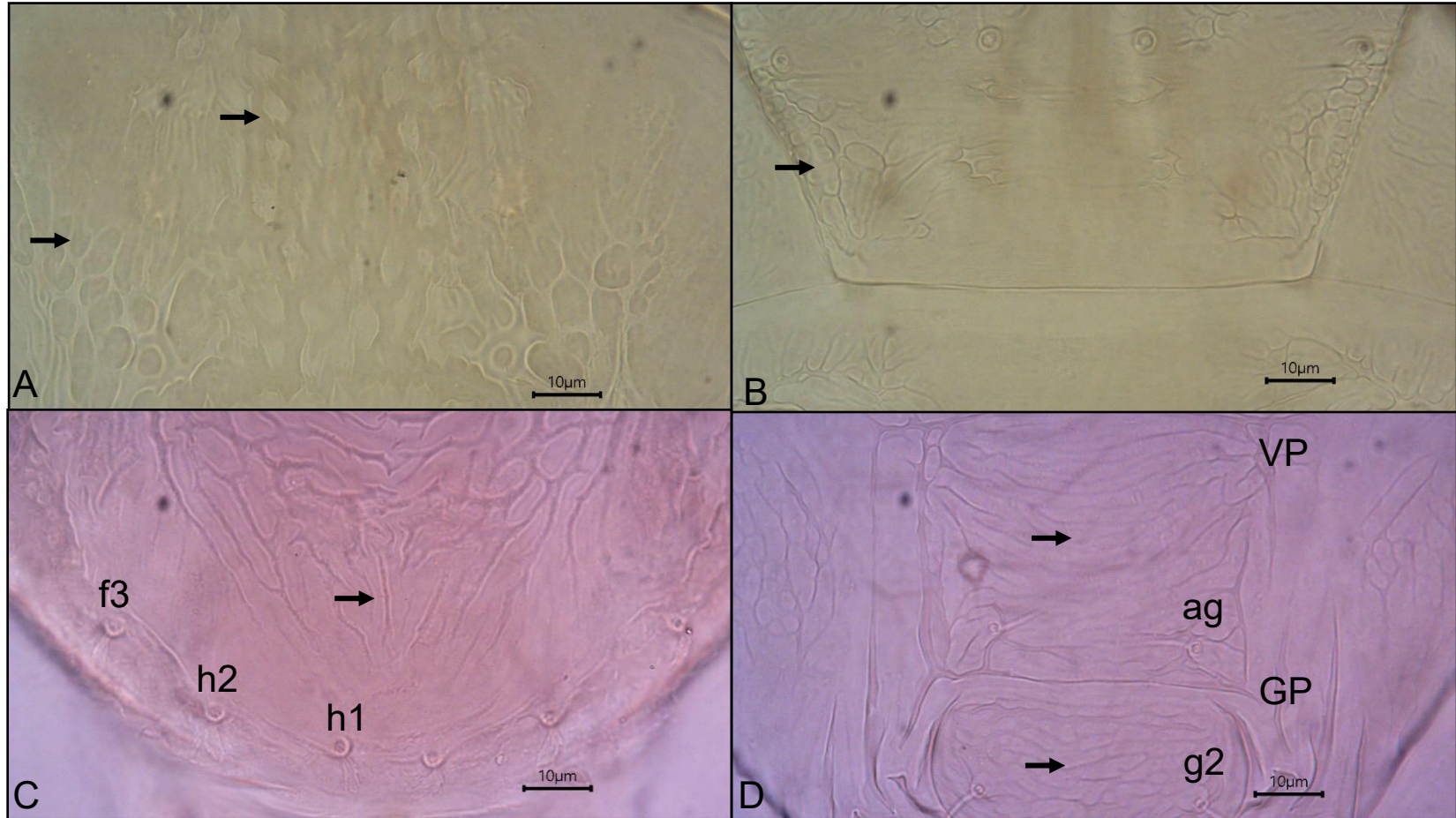


**Figura 11.** Hembra de *Brevipalpus azores* (F12, F13). A) y B) propodosoma con areólas, cutícula lateral formando celdas largas, cutícula sublateral del opistosoma dorsal con celdas formando domos, opistosoma con líneas longitudinales convirtiéndose en verticales C) y D) presencia de verrugas entre las setas 3a-4a y hacia la placa ventral, con placas ventrales (VP) bandas mayormente longitudinales, y placas genitales (GP) con cutícula irregular con bandas transversas (DIC).



**Figura 12.** Hembra de *Brevipalpus azores* (F12, F13). A) gnatosoma (la flecha indica la seta en el palpo), B) solenidios pata II (flechas indican la ubicación de los dos solenidios) C) entre 4a y la placa ventral presencia de verrugas con algunas fusionadas en bandas cortas, D) espermateca con una vesícula esclerotizada con proyecciones alrededor (DIC).





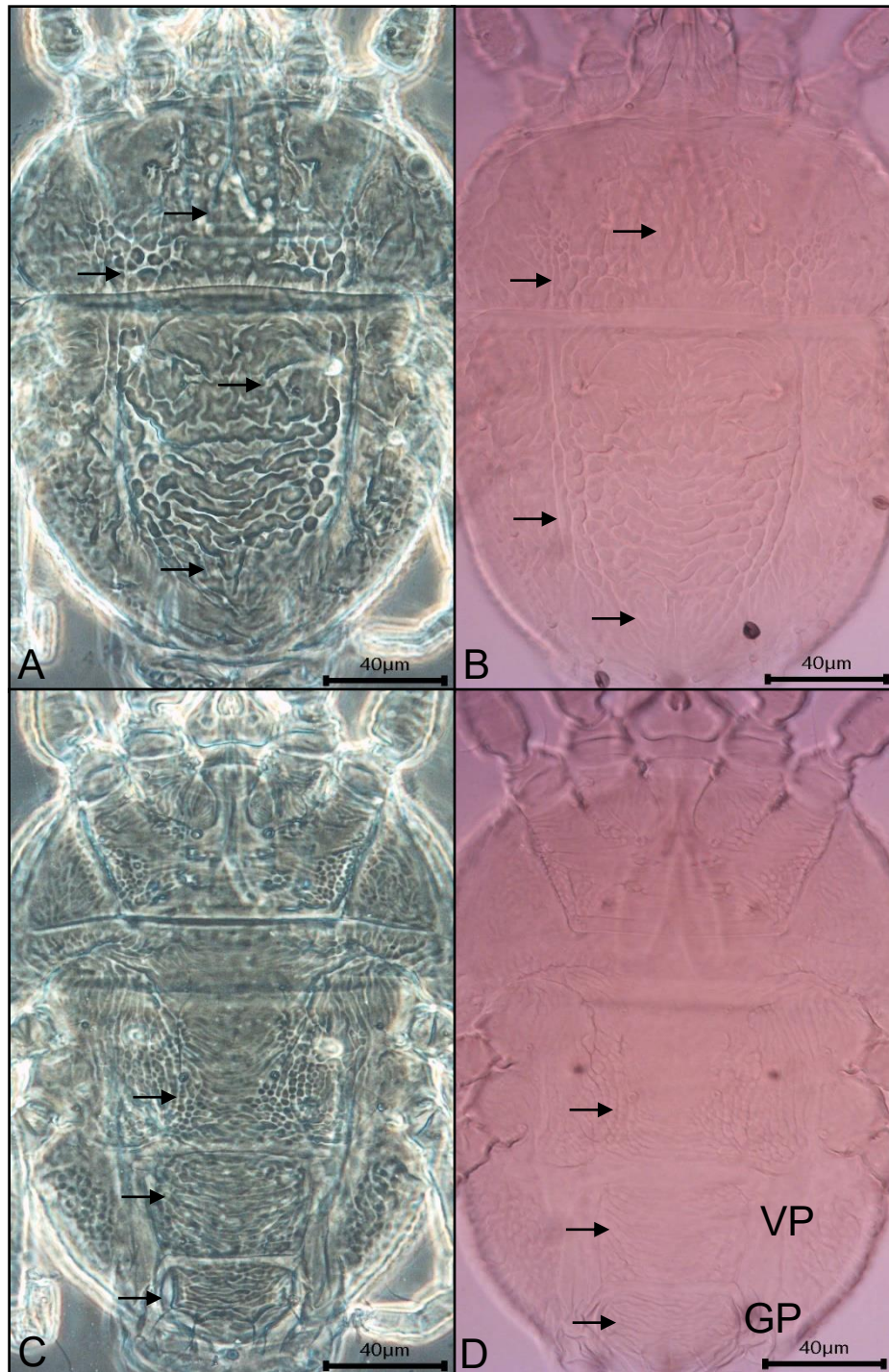
**Figura 13.** Hembra de *Brevipalpus azores* (F12, F13). A) propodosoma dorsal con areólas con algunas celdas laterales redondas, B) propodosoma ventral con areolas lateralmente, fusionadas y curvadas centralmente, C) opistosoma dorsal con líneas longitudinales que se hacen transversales hacia h1, D) patrones de reticulación en placa ventral (VP) y la placa ventra (VP).

La población de *B. papayensis* encontrada presentó una longitud promedio entre la seta v2 y la seta h1 de 232  $\mu\text{m}$ , con una longitud mínima de 219  $\mu\text{m}$  y una máxima de 244  $\mu\text{m}$ . El ancho entre las setas sc2-sc2 obtuvo un promedio de 153  $\mu\text{m}$  con un mínimo de 144  $\mu\text{m}$  y un máximo de 159  $\mu\text{m}$ . Por otra parte, el ancho entre las setas c3-c3 promedio fue de 165  $\mu\text{m}$  con un mínimo de 156  $\mu\text{m}$  y un máximo de 172  $\mu\text{m}$ .

Las hembras de esta especie presentaron una forma oval y reticulada en el dorso central con areólas con alguna reticulación en la cutícula sublateral (Figura 14) La cutícula entre las setas c1-c1 a d1-d1 va de lisa a débilmente arrugada, de d1-d1 a e1-e1 la cutícula es lisa con la presencia de algunos pliegues irregulares, de e1-e1 a h1-h1 la cutícula tiene muchos pliegues transversales convirtiéndose en longitudinales hacia h1, la cutícula sublateral con celdas redondas terminando en elongadas hacia h1, así como la presencia de pequeñas celdas redondas en vista ventral (Figura 14). La seta del palpo es ancha, setiforme y barbada (Figura 15 A). Con la presencia de dos solenidios en la pata II (Figura 15 B).

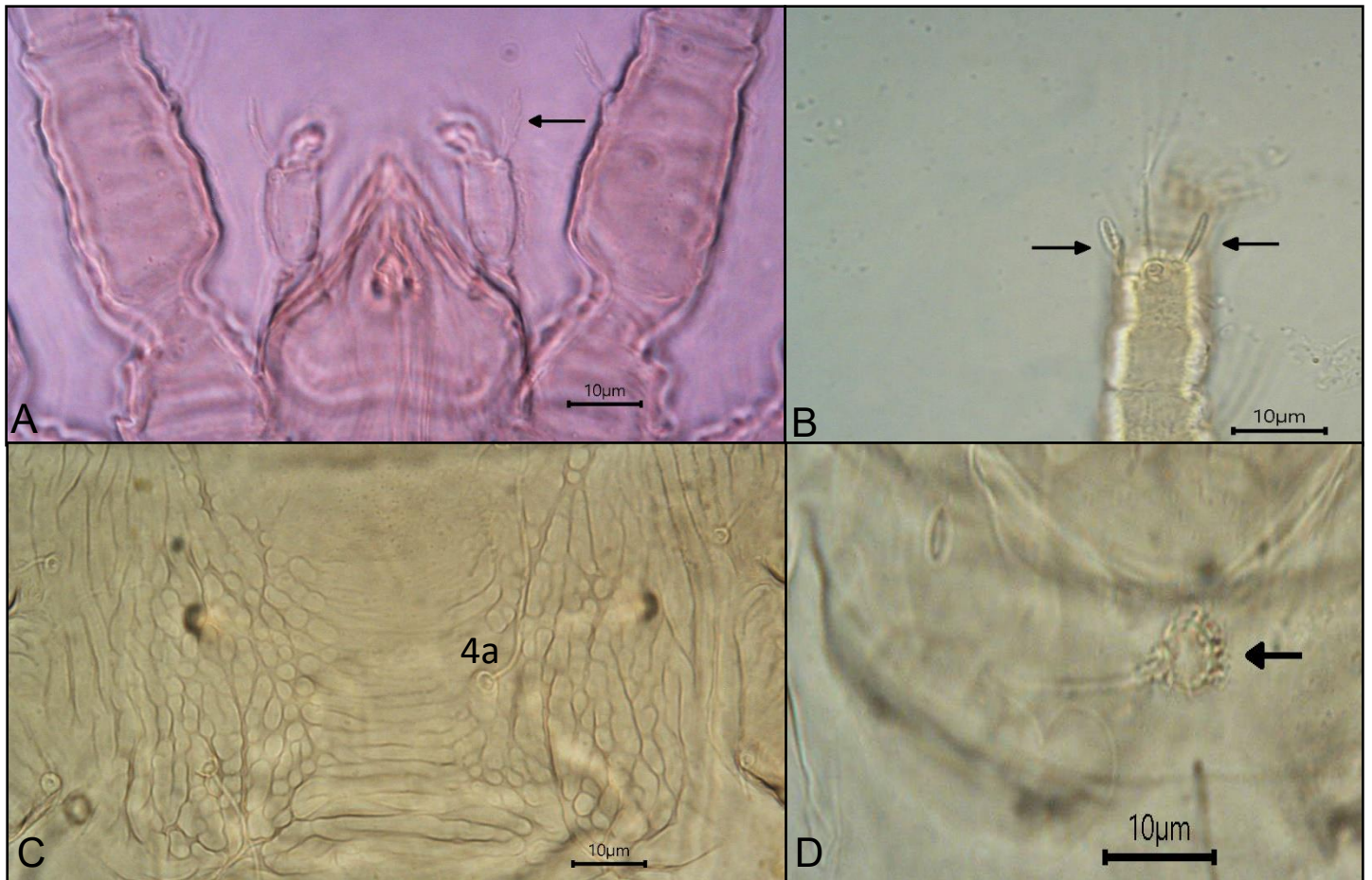
La cutícula entre la seta 3a y 4a con celdas redondas en los laterales, y la presencia de bandas transversales siendo delgadas desde 3a y ganando grosor hasta el límite con la placa dorsal (Figura 15 C), se observó la presencia de una espermateca redondeada esclerotizada cubierta de una corona de proyecciones (Figura 15 D).

En la parte central del propodosoma la cutícula presentó areólas y en la parte sublateral la reticulación da paso a la formación de celdas más largas (Figura 16 A). En el propodosoma ventral se observaron verrugas redondas y pequeñas en la parte sublateral formando bandas transversales alargadas en la cutícula central (Figura 16 B). En el opistosoma se encontraron pliegues irregulares, con la presencia de bandas transversales convirtiéndose bruscamente en bandas longitudinales hasta h1 (Figura 16 C). La placa ventral fue identificada por tener bandas transversales y en ella la incrustación de una o más bandas oblicuas y en el caso de la placa genital se caracterizó por tener bandas transversas (Figura 16 D).

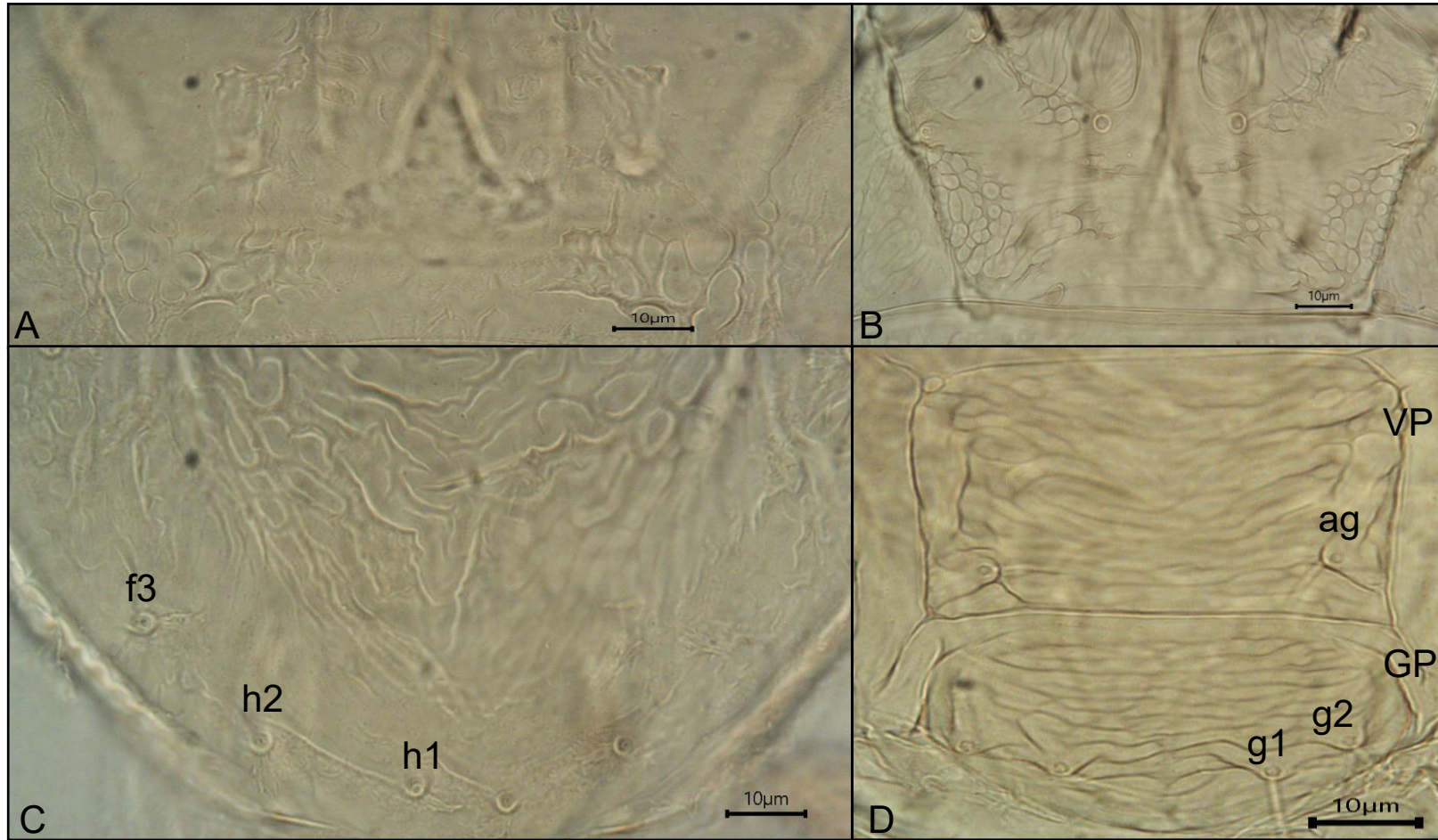


**Figura 14.** Hembra de *Brevipalpus papayensis* (F14) A) y B) prodorso con areólas, sublaterales formando celdas alargadas, opistosoma con líneas laterales finalizando hacia h1 en líneas transversas, C) y D) cutícula entre las setas 3a-4a con celdas redondeadas hacia la placa ventral débiles centralmente entre 3a-4a, placa ventral (VP) con bandas longitudinales, placa genital (GP) con bandas transversas.





**Figura 15.** Hembra de *Brevipalpus papayensis* (F14). A) gnatosoma (la flecha indica la seta en el palpo), B) solenidios pata II (flechas indican los solenidios) C) Cutícula entre las setas 3a - 4a cutícula lateral con celdas redondeadas, con presencia de bandas curvadas longitudinales centralmente, D) espermateca esclerotizada con proyecciones que la rodean (DIC).



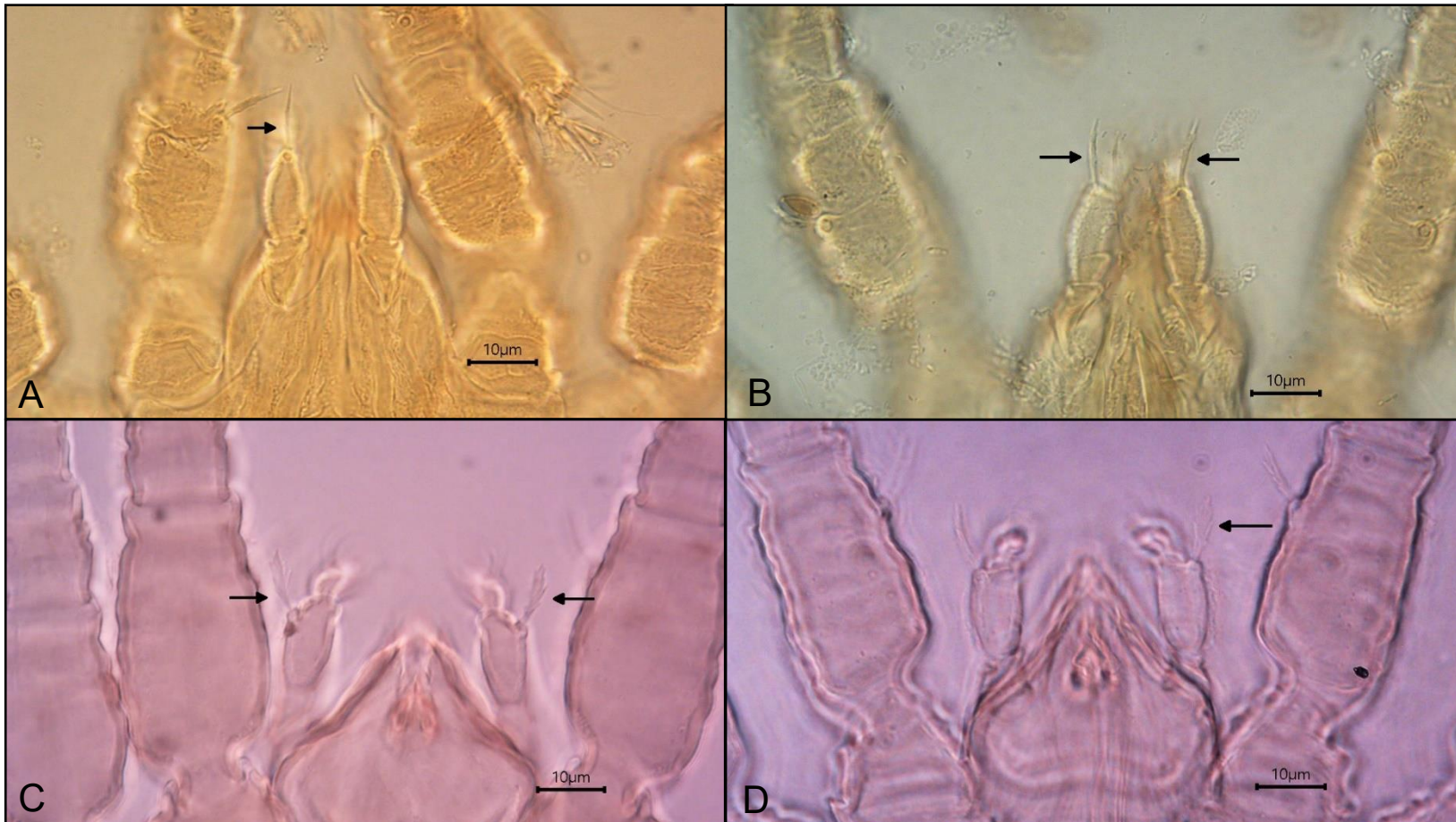
**Figura 16.** Hembra de *Brevipalpus papayensis* (F14). A) propodosoma dorsal central con areólas, B) propodosoma ventral con areólas laterales y bandas curvas centralmente, C) tiene pliegues en el opistosoma transversos que cambian a líneas transversales hacia h1, D) opistosoma ventral, placas ventrales (VP) con bandas en diferentes sentidos de orientación, placa genital (GP) cutícula con bandas irregulares, angostas y transversas (DIC).

La forma de la seta del fémur genu palpal presentó variaciones entre las especies, por ejemplo, *Brevipalpus yothersi* y *Brevipalpus* sp. nov , presentaron una seta delgada y barbada (Figura 17, A y B), mientras que *B. azores* y *B. papayensis* tienen esta seta ancha y plana, de igual forma barbadas (Figura 17, C y D). Por su parte, *B. azores* se diferencia con *B. yothersi* en que presenta centralmente bandas transversas débiles, y algunas areolas fusionadas que forman celdas más grandes (Figura 18, A y B).

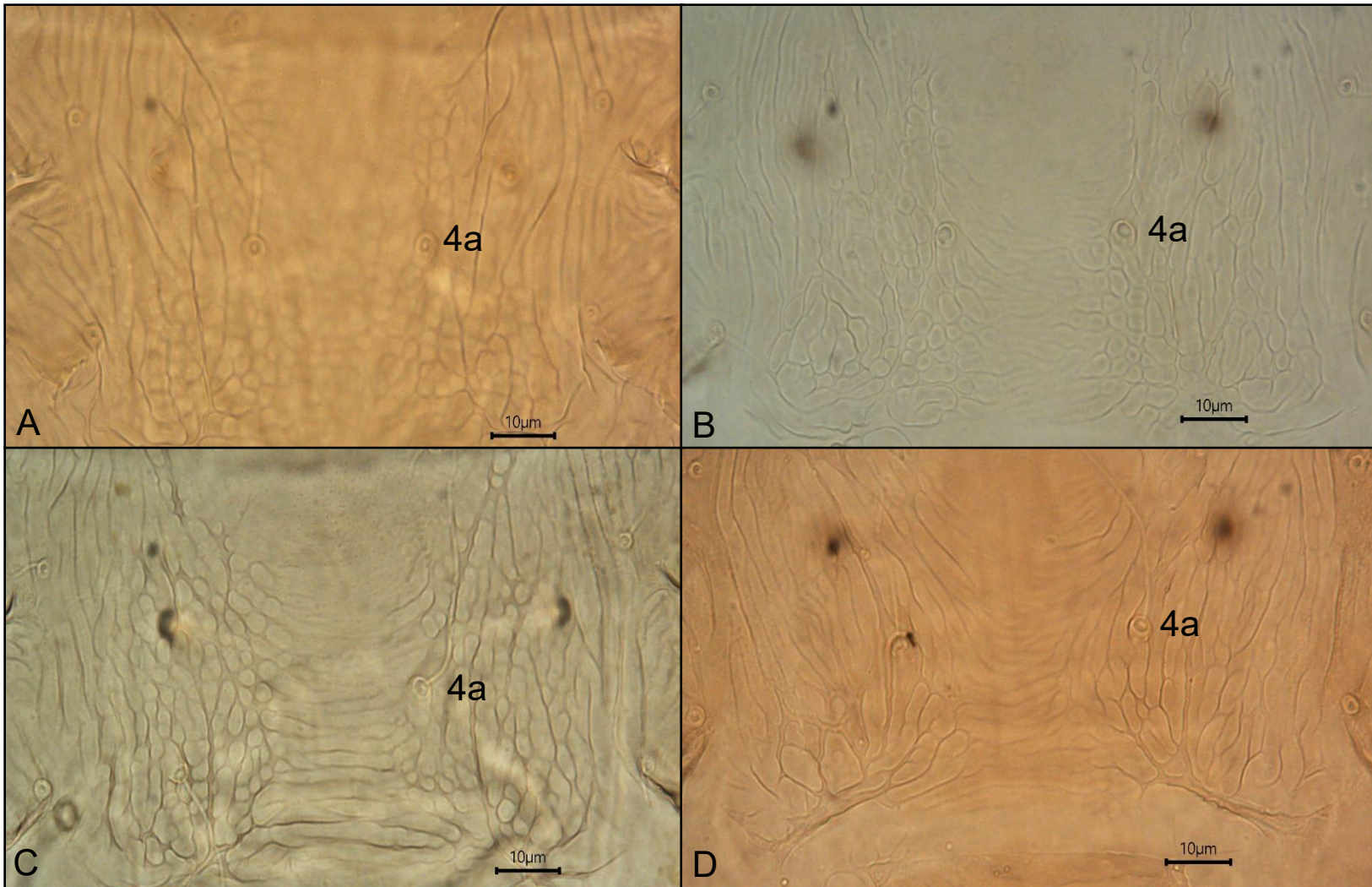
La cutícula entre las setas 3a-4a de *B. azores* y *B. papayensis* es muy similar, sin embargo, se diferencian porque *B. papayensis* tiene las bandas centrales definidas (Figura 18, C) y *B. azores* presenta areolas o celdas con forma irregular entre las setas 4a y el inicio de la placa ventral. Con respecto al nivel de rugosidad entre las setas 3a-4a y 4a-placa ventral, *Brevipalpus* sp. nov se diferencia de estas dos especies porque no presenta areolas, sino que tiene bandas longitudinales, curvadas, y en los laterales posee bandas o celdas cortas orientadas transversalmente (Figura 18, D).

Por su parte, las espermatecas se observaron en al menos un individuo de cada especie. *Brevipalpus yothersi* presentó una vesícula oval con estipe distal (Figura 19, A), en contraste, las espermatecas de *B. azores*, *B. papayensis* y *Brevipalpus* sp. nov, tienen formas redondeadas con proyecciones alrededor de la vesícula y son muy similares entre sí; la espermateca de *Brevipalpus* sp. nov, tiene una forma más angosta cercana al ducto, en estas poblaciones se encontraron espermatecas con desarrollo incompleto o reducido (Figura 19, B,C y D).



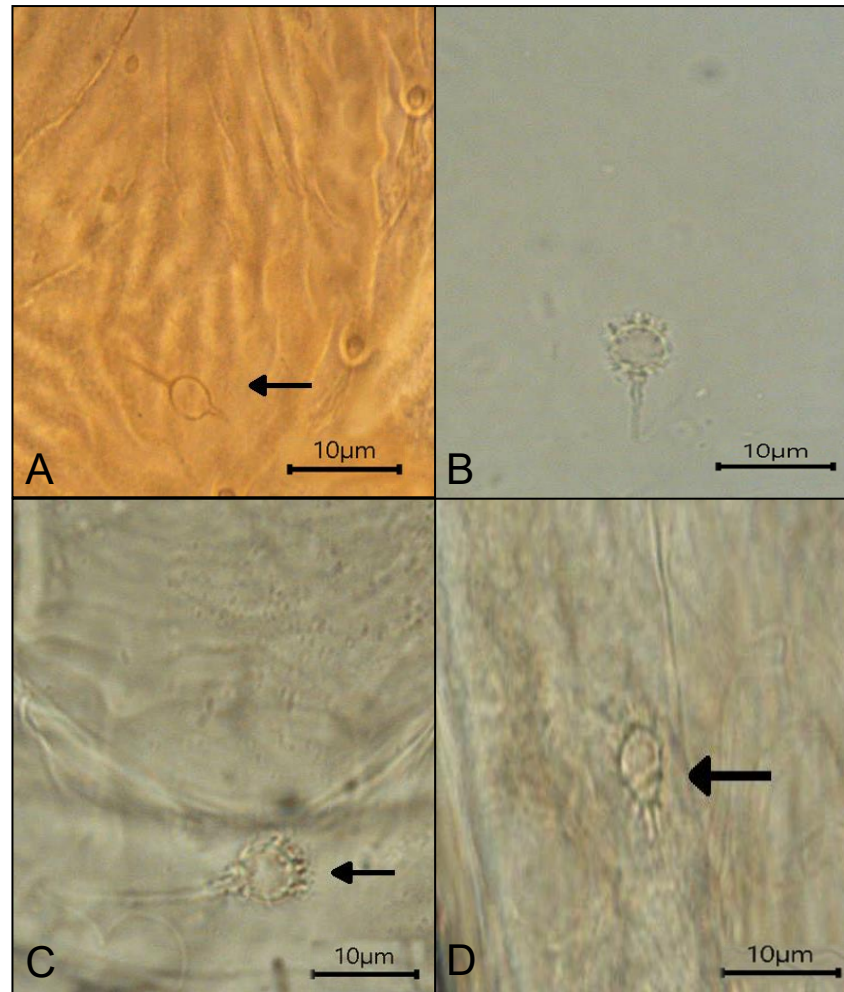


**Figura 17.** Diferentes setas del femúr-genu palpal de hembras de las especies A) *Brevipalpus yothersi* delgada y barbada, B) *Brevipalpus* sp. nov., delgada y barbada, C) *Brevipalpus azores* ancha y barbada, D) *Brevipalpus papayensis* ancha y barbada.



**Figura 18.** Rugosidad en cutícula entre las setas 3a-4a de hembras de las especies A) *Brevipalpus yothersi* con presencia de areolas, B) *Brevipalpus azores* con bandas débiles centralmente, y con areolas en los laterales, C) *Brevipalpus papayensis* con presencia de bandas longitudinales y areolas en los laterales y D) *Brevipalpus* sp. nov., delgada y barbada.





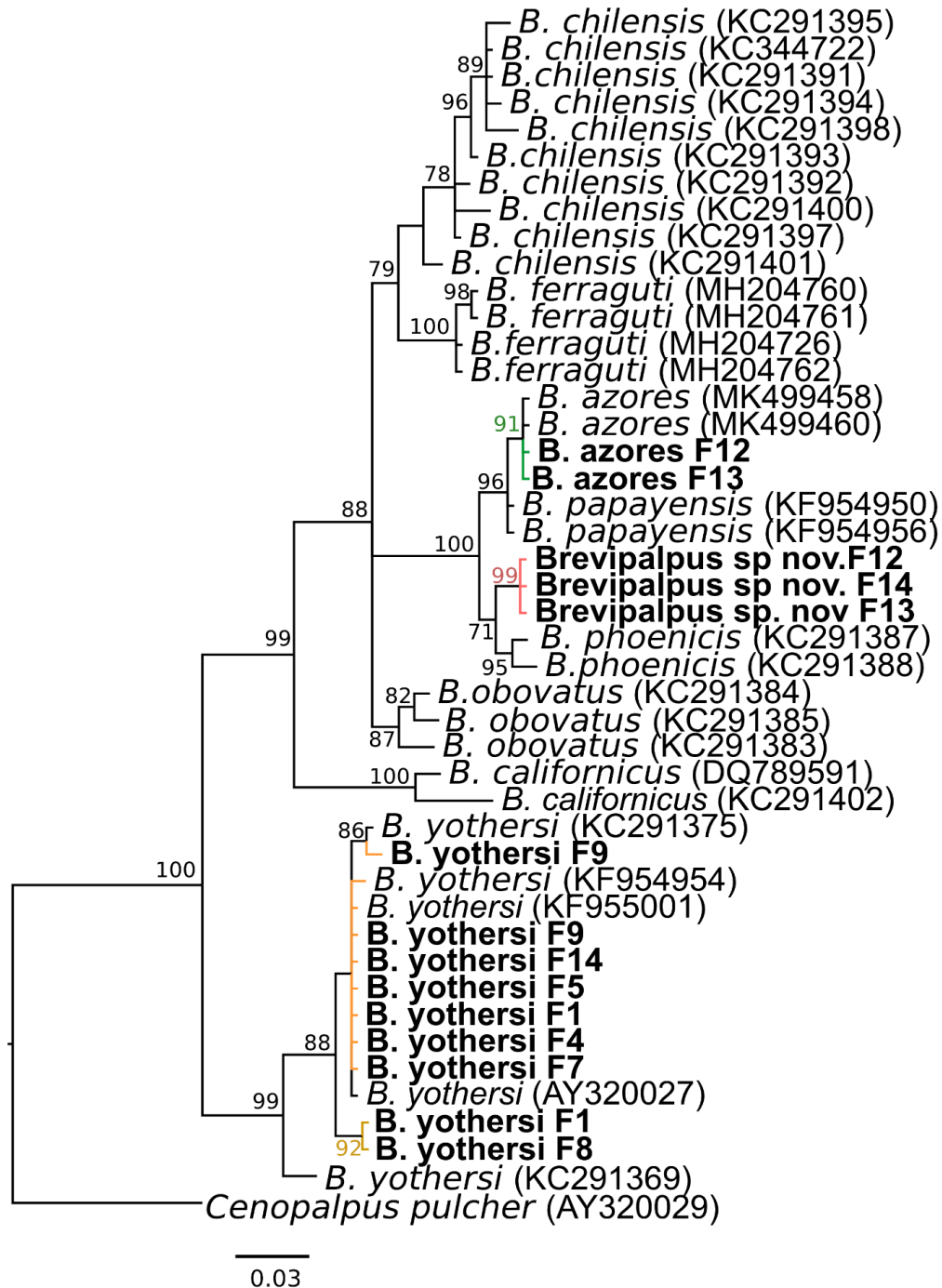
**Figura 19.** Forma de la espermateca de hembras de las especies A) *Brevipalpus yothersi* vesícula ovalada con estipe distal, B) *Brevipalpus azores* vesícula redonda con proyecciones C) *Brevipalpus papayensis* vesícula redonda con proyecciones D) *Brevipalpus* sp. nov., vesícula con forma oval y proyecciones alrededor de la vesícula.

### 13. Filogenia de *Brevipalpus* spp. inferida a partir del gen COXI

Los productos de PCR que amplificaron y fueron secuenciados tuvieron en promedio un tamaño de banda de 1050 pb, sin embargo, el fragmento fue analizado en dos segmentos diferentes uno de 372 pb correspondiente a la región amplificada por Navajas *et al.* (1996) y uno de 650 pb donde se encuentra la región barcoding de Folmer *et al.* (1994)(Anexo 8). El árbol filogenético (Figura 20) mostró la presencia de tres especies del género *Brevipalpus* en el país para el cultivo de naranja en todas las regiones muestreadas. La más frecuente fue *B. yothersi* la cual se encontró en la Región Central y la Región Brunca. Esta especie se separó en dos clados diferentes en el árbol filogenético. El primero agrupó la mayoría de las poblaciones muestreadas correspondientes a F7, F4, F1, F5, F9 y F14 (haplotipo 1) junto a F9 (haplotipo 2) y las accesiones del banco de genes KC291375, AY320027 y KF955001. El segundo grupo asoció a las poblaciones F1 y F8 de *B. yothersi* con un 92% de probabilidad posterior (PP).

La segunda especie hallada fue *B. azores* en la Región Brunca, para esta se encontró un único haplotipo en las poblaciones F12 Y F13, junto a las accesiones MK499458 y MK499460, estas fueron separadas en un mismo clado con un 91% PP (Figura 20).

La tercera especie encontrada *Brevipalpus* sp. nov., se recolectó en la Región Brunca. El árbol filogenético separó a esta especie en un clado monofilético con un 99% del PP (Figura 20). Los individuos de esta nueva especie se encontraron en las fincas F12 y F13 (provenientes de Pérez Zeledón) mezclada con *B. azores*, y F14 (provenientes de Sabalito) mezclada junto con *B. yothersi*.



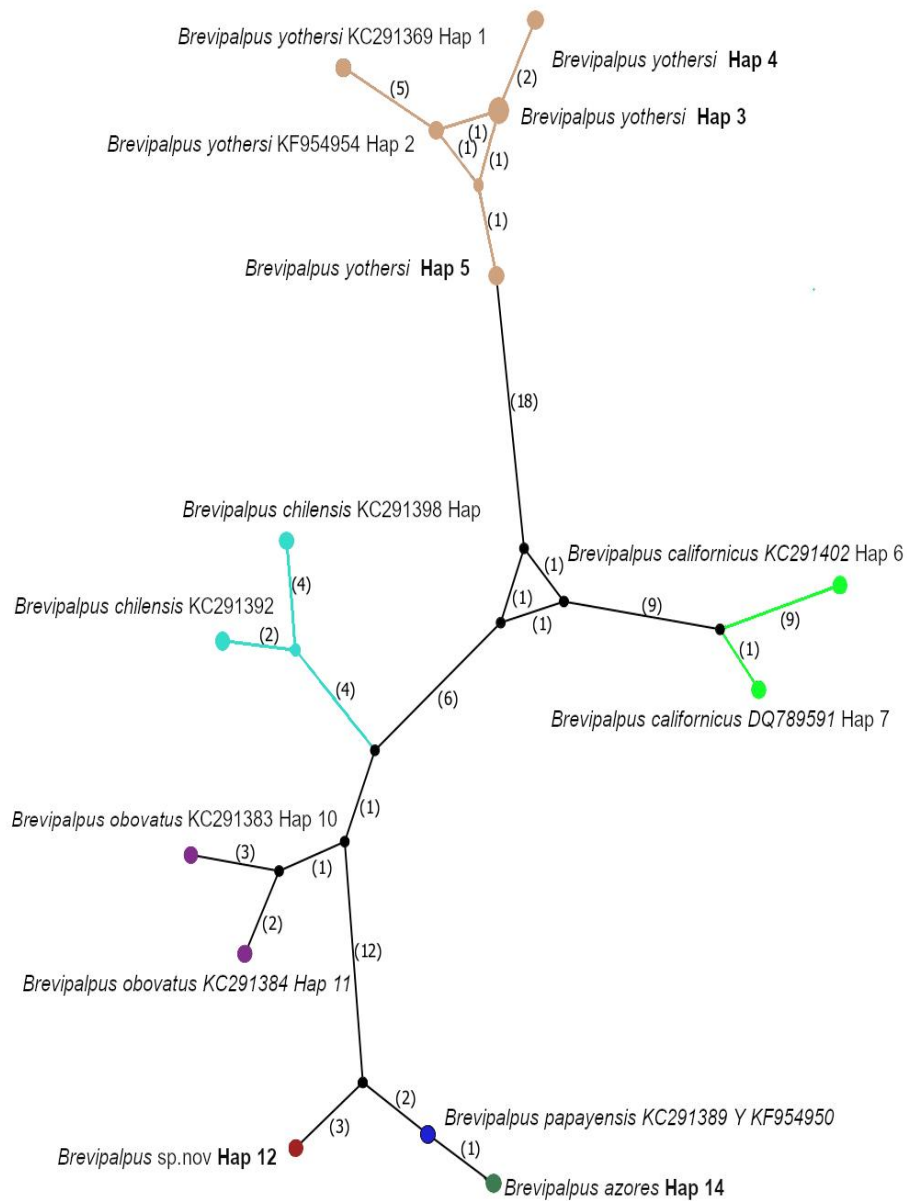
**Figura 20.** Árbol filogenético inferido a partir de un análisis bayesiano de una región del gen *COX1* para *Brevipalpus* spp., en el cultivo de naranja, en Costa Rica. Modelo HKY+I+G. Las probabilidades posteriores se muestran como porcentajes en los nodos del árbol. Las secuencias obtenidas en esta investigación se encuentran en negrita. Escala: cambios esperados por sitio.



#### **14. Red de haplotipos de *Brevipalpus* spp.**

Se realizó la red de haplotipos tomando en cuenta las secuencias generadas en esta investigación más las obtenidas en el banco de genes NCBI (Figura 21).

De acuerdo con la red de haplotipos (Figura 21), se encontraron 14 distintos haplotipos para todas las 41 secuencias analizadas. De estas, los primeros 5 haplotipos corresponden a *B. yothersi*, posteriormente se obtuvieron dos haplotipos para *B. californicus*, dos de *B. chilensis* y dos para *B. obovatus*. Las especies *B. papayensis*, *B. azores* y *Brevipalpus* sp nov., mostraron un solo haplotipo para cada una. La mayor cantidad de pasos mutacionales se encontró entre el haplotipo 1 de *B. yothersi* y el haplotipo 14 de *B. azores* contabilizándose 48 pasos mutacionales entre estos.



**Figura 21.** Red de haplotipos de *Brevipalpus* spp. Los grupos se encuentran diferenciados por colores, en negrita aparecen las poblaciones secuenciadas durante esta investigación, así como secuencias obtenidas del banco de genes (NCBI). Los números en paréntesis corresponden a los pasos mutacionales encontrados entre las diferentes especies.

## 15. Distancias genéticas entre las especies de *Brevipalpus* presentes en Costa Rica

Las distancias genéticas indican qué tan cercana es una población con respecto a otra, entre mayor es la variación más alejada genéticamente se encuentran las poblaciones o especies (Nei 1987). Las mayores variaciones interespecíficas de las secuencias obtenidas en esta investigación se encontraron entre las especies *B. azores* versus *B. yothersi*, seguido de *Brevipalpus* sp. nov versus *B. yothersi* y finalmente *Brevipalpus* sp.nov y *B. yothersi* tanto para el K2P (Kimura 2-parámetros) y el valor no corregido respectivamente (Cuadro 3), también fueron comparadas contra las secuencias contradas en el banco de genes NCBI donde el valor mínimo tanto para el valor de K2P y el no corregido fue entre las especies *B. azores* y *B. papayensis* con un 0, 29, mientras que las especies más alejadas genéticamente fueron *B. yothersi* y *B. chilensis* con un K2P de 10,62 y un no corregido de 10, 69 (Anexo 4).

**Cuadro 3.** Porcentajes de variación intra e interespecífica para *Brevipalpus yothersi*, *Brevipalpus* sp. nov y *Brevipalpus azores* con los valores de K2P (Kimura 2-parámetros) y no corregido,  $\bar{X}$ = promedio, Max= Máximo, Min= mínimo.

Comparación	K2P				No corregido			
	$\bar{X}$	Max	Min	Desviación estándar	$\bar{X}$	Max	Min	Desviación estándar
<i>Brevipalpus</i> sp.nov vs <i>Brevipalpus</i> sp.nov	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. azores</i> vs <i>B. azores</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. yothersi</i> vs <i>B. yothersi</i>	0,87	2,66	0,58	0,39	0,73	1,44	0,28	0,31
<i>Brevipalpus</i> sp.nov vs <i>B. azores</i>	1,77	1,79	1,76	0,01	1,74	1,76	1,73	0,01
<i>Brevipalpus</i> sp.nov vs <i>B. yothersi</i>	9,54	10,05	9,21	0,23	8,98	9,41	8,67	0,18
<i>B. azores</i> vs <i>B. yothersi</i>	10,19	10,64	9,87	0,22	9,55	9,91	9,24	0,18

## 16. Valores de Phi

El análisis de estos resultados toma como hipótesis nula que los organismos se pueden recombinar entre sí, por lo que, si la probabilidad es igual a 1 la recombinación no se da. La comparación entre *B. yothersi* (F4, F5, F7, F9, F14) y *B. yothersi* (F8) obtuvo un 1, así como las poblaciones de *B. azores* versus *Brevipalpus* sp.nov que al igual a los anteriores resultados fue de un 1.

## **17. Evaluación de la presencia de los virus de la leprosis de los cítricos**

Con el fin de comprobar que la extracción de ARN y retrotranscripción (RT) se realizó de la forma correcta, se efectuó un PCR con el gen 18S de planta, utilizado como un control interno de la muestra. Como resultado las 48 muestras dieron positivo, lo que corrobora que se tiene ADN copia (ADNc) sin la presencia de inhibidores de amplificación. Seguidamente, se realizaron las PCR, para los virus CiLV-C, CiLV-C2, CiLV-N y OFV-Citrus, en donde todas las muestras dieron resultado negativo (Cuadro 4).

La leprosis de los cítricos es una enfermedad cuarentenaria, por lo tanto, solamente se tuvo acceso a una muestra de ARN control positivo que corresponde a una muestra de naranja infectada con CiLV-C (Anexo 5) proveniente de la frontera sur del país de árboles que fueron erradicados. Por su parte, no se contó con controles positivos para los otros virus de interés CiLV-C2, CiLV-N y OFV-Citrus. Como una forma de verificar que un resultado negativo no corresponde a la presencia de inhibidores de PCR o degradación en la extracción de ARN, se realizó PCR para detectar al virus de la tristeza de los cítricos. CTV es otro virus de ARN de simple cadena, similar a los virus de la leprosis de los cítricos, y se encuentra ampliamente distribuido en Costa Rica. Para este virus se contó con control positivo correspondiente a la colección de virus de LaFOV-CIBCM. Todas las muestras dieron positivo para CTV (Cuadro 4). Secuenciación de cinco de los amplicones obtenidos y su comparación en el banco de genes (NCBI) confirman la identidad del virus y su presencia en las muestras de naranja dulce colectadas en esta

investigación, por su lado todas las pruebas PCR que obtuvieron un resultado positivo para el virus de la variegación de los cítricos resultaron ser falsos positivos confirmados por medio de secuenciación dando como resultado todas las fincas negativas para la variegación de los cítricos (Anexo 6).

**Cuadro 4.** Pruebas PCR-RT para la identificación de virus de la leprosis de los cítricos citoplasmático (CiLV-C), virus de la leprosis de los cítricos citoplasmático (CiLV-C2), virus de la leprosis de los cítricos nuclear (CiLV-N), OFV-Citrus, virus de la tristeza de los cítricos (CTV) e Ilarvirus (CVV).

Virus/gen evaluado	Región Huetar Norte	Región Central	Región Brunca
Gen 18Sr planta (control interno)	+	+	+
CiLV-C <sup>1</sup>	-	-	-
CiLV-C2 <sup>2</sup>	-	-	-
CiLV-N <sup>3</sup>	-	-	-
OFV-citrus <sup>4</sup>	-	-	-
CVV <sup>5</sup>	-	-	-
CTV <sup>6</sup>	+	+	+

1= Virus de la leprosis de los cítricos citoplasmático, 2= Virus de la leprosis de los cítricos citoplasmático tipo 2, 3= Virus de la leprosis de los cítricos nuclear, 4= orchid fleck virus, 5= virus de la variegación de los cítricos, 6= virus de la tristeza de los cítricos.

## E. DISCUSIÓN

La identificación de especies dentro del género *Brevipalpus* presenta complicaciones para su clasificación taxonómica debido a la dificultad que existe para diferenciarlas tanto morfológica como molecularmente (Gerson 2008, Navia *et al.* 2013, Beard *et al.* 2015, Ochoa *et al.* 2016).

Durante este trabajo se identificó a las especies *B. yothersi* (Baker), *B. azores* (Beard y Ochoa), *B. papayensis* (Baker) asociadas a muestras de cítrico en Costa Rica por medio de caracteres morfológicos. La presencia de dos solenidios en pata II y la ausencia de la seta f3 permitieron determinar que los especímenes analizados en esta investigación pertenecen al grupo phoenicis (Pritchard y Baker 1958). Caracteres morfológicos más específicos como, la forma de la seta fémur genu palpal, rugosidad en cutícula tanto en el dorso como en las placas ventrales, forma de la espermateca (Beard *et al.* 2015), permitieron distinguir entre estas tres especies.

### 1. Especies de *Brevipalpus* encontradas en la zona sur de Costa Rica

Por su parte, tres poblaciones (correspondientes a *Brevipalpus* sp.nov. ) procedentes de la zona sur del país presentaron características morfológicas muy similares entre sí, dentro de las cuales destacan, la forma de la seta del fémur genu palpal la cual es delgada y barbada (Figura 17, A y D), la cutícula entre las setas 3a-4a y 4a-placa ventral sin areolas, con bandas longitudinales y curvadas, y en los laterales se observa la presencia de bandas o celdas cortas orientadas transversalmente, además de presentar espermateca redondeada con



proyecciones (Figura 19, D y E), todas estos caracteres en conjunto no coinciden con otra especie descrita hasta el momento para este género. Aunadas a esto, el análisis filogenético mostró que estas tres poblaciones se posicionan en un clado monofilético con un 99% del PP (Figura 20), donde además son parte de un mismo haplotipo (Figura 21), por lo que se plantea la hipótesis de que estas poblaciones corresponden a una especie no descrita.

Estas poblaciones de *Brevipalpus* sp.nov. se diferencian de *B. papayensis*, *B. azores* y *B. phoenicis* por presentar en las placas ventrales y genitales múltiples celdas, areólas, y bandas longitudinales lineales, así como la seta dorsal del fémur genu palpal ancha y abierta (Figura 15, 16 (A, C) y 18, 19 (A, C)) (Beard *et al.* 2015). Sin embargo, comparten características en la distancia entre las setas v2- h1 y las setas sc2-sc2 similares (Anexo 7), y reticulación en la cutícula dorsal similar.

La identificación molecular como método complementario a la caracterización morfológica de especies, aspecto que no se había realizado anteriormente en Costa Rica para ninguna especie de *Brevipalpus*, permitió observar que las secuencias obtenidas de esta población se ubicaron en un clado monofilético junto a las especies *B. papayensis*, *B. azores* y *B. phoenicis*, tanto en las relaciones filogenéticas (Figura 20) como en la red de haplotipos (Figura 21) donde estas secuencias se ubicaron divididas en *B. azores* (Beard y Ochoa) Haplotipo 12, *B. papayensis* (Baker) haplotipo 13 y *Brevipalpus* sp. nov. haplotipo 14.

La variabilidad genética intraespecífica de *Brevipalpus* sp.nov., al igual que las de *B. azores* (Beard y Ochoa) fue de 0%, lo cual nos indica que estas especies posiblemente provengan de una misma población geográficamente muy cercanas y se concentraron dentro de la misma región sur del país. Este tipo de distribución podría deberse a que existen factores climáticos tropicales que forman microambientes como temperatura y humedad, que pueden propiciar la distribución diferenciada de las especies dentro del país (Castro-Resendiz *et al.* 2021). La principal implicación de la cercanía de estas tres especies reside en la posibilidad de que puedan ser vectores de virus, ya que *B. papayensis* es vector de virus tales como, el Coffee ringspot virus (CoRSV) y el virus de la leprosis de los cítricos citoplasmático (CiLV-C) (Nunes *et al.* 2018) ambos reportados previamente en el país.

## **2. Distribución de *B. yothersi* y posible *Brevipalpus* sp. nov 2 o en proceso de especiación**

*Brevipalpus yothersi* fue encontrada tanto en la Región Central como Región Brunca (Figura 5), siendo la especie con la mayor distribución geográfica del país para *C. sinensis*. . Adicionalmente, esta fue la única especie que se logró establecer en colonias de naranja de forma exitosa durante esta investigación (Cuadro 2), en las colonias de las demás especies murieron sin producir descendencia o la naranja que los contenía fue pérdida por contaminación ( por hongos o bacterias).

Molecularmente fue la que presentó mayor variabilidad intraespecífica, encontrándose en las relaciones filogenéticas tres sub-clados y tres haplotipos diferentes (Figuras 22, 23). Sin embargo, morfológicamente no se observaron características que las separen, a excepción del largo entre la seta v2-h1 donde las poblaciones F7, F4, F5 y F14 presentaron un promedio de 208  $\mu\text{m}$ , y la población F8 (*Brevipalpus* sp.nov 2) midió 214  $\mu\text{m}$ , siendo más grande esta última población, sin embargo, esta medición para *B. yothersi* según Beard *et al.* (2015) fue de 216  $\mu\text{m}$  por lo que se encontraría dentro del rango esperado.

Estos resultados podrían estar dentro del marco de tres posibles escenarios debido a la diversidad genética observada, uno donde la variabilidad intraespecífica de *B. yothersi* fue un K2P de 0,87 y no corregido de 0,73, mientras que las demás especies entre sí no presentaron variabilidad intraespecífica. Aunque presenten variabilidad intraespecífica su valor tanto de K2P como del porcentaje no corregido es muy pequeño como para considerarse especies diferentes, por lo que no hay suficiente fundamento con la información obtenida para catalogarse como una nueva especie (Navia *et al.* 2013, Sánchez-Velázquez *et al.* 2015, Beard *et al.* 2015, Tassi 2018).

El segundo escenario, es que la especie podría estar dentro de un proceso de especiación evolutiva y/o debido a que es una de las especies más distribuidas geográficamente por lo que representa un mayor número de poblaciones con una mayor variación en busca de adaptación a las condiciones ambientales o diferentes hospederos (Manson, 1967; González, 1975; Tassi 2018).

El tercer escenario, que es una nueva especie, debido al análisis de concordancia genealógica de reconocimiento de especies filogenéticas su Phi fue igual a 1 en comparación con las demás poblaciones de *B. yothersi* (F1, F4, F5, F7, F9, F14) lo que indican que estas dos poblaciones no se pueden recombinar entre sí resultando en especies diferentes, ya que este concepto se basa en la definición biológica de especie que considera que individuos de la misma especie se pueden recombinar, en este caso los valores varían entre 0 a 1 y ha sido utilizado principalmente en hongos del género *Fusarium* que presentan variabilidad intraespecífica (Taylor *et al.* 2000). Es utilizado para determinar especies crípticas putativas que exhiben reproducción asexual (Nguyen *et al.* 2015), donde las especies encontradas en esta investigación tienen reproducción asexual por lo que este método es similar al normalmente utilizado

Sin embargo, la información genética generada en esta investigación no es suficiente para definirla como una nueva especie, ya que se requieren de comparaciones más exhaustivas como análisis multilocus o secuenciación de nueva generación para una mejor comparación entre las filogenias, además de examinar de forma más detallada las características morfológicas como las microplacas con microscopía electrónica, debido a que no se encontraron diferencias en los caracteres morfológicos revisados.

### **3. Presencia de leprosis de los cítricos CiLV-C, CiLV-C2, OFV-citrus, CTV e Ilarvirus**

Todas las muestras analizadas para la detección de los virus que forman el complejo de la leprosis de los cítricos resultaron negativas. Esto puede deberse principalmente al programa de cuarentena y erradicación de cualquier árbol con sospechas o síntomas de leprosis de los cítricos en la zona fronteriza con Panamá, por parte del Servicio Fitosanitario del Estado (SFE) (SFE, 2021).

Desde el 2001 al 2021 el SFE<sup>1</sup> ha encontrado 4007 árboles sintomáticos por CiLV-C y se han eliminado 12 500 árboles. Este virus se encuentra en condición de baja prevalencia y bajo control oficial debido a que durante todo este período el virus se ha mantenido confinado en la línea fronteriza con Panamá, a la altura de Paso Canoas y Coto Brus.

Finalmente, se encontró al virus de la tristeza de los cítricos en todas las fincas donde se recolectó material, por lo que se mantiene la prevalencia y amplia distribución en el país. La presencia no es nueva ya que anteriormente, el CTV fue identificado mediante ensayo inmuno-absorbente ligado a enzimas (ELISA) encontrado en las provincias de Alajuela, San José, Limón, Guanacaste y Puntarenas (Lastra *et al.* 1990; Gottwald *et al.* 2002). El virus de la variegación de los cítricos fue reportado en lima dulce de Palestina (*C. limettioides*) sin embargo fue exitosamente transmitido a naranja valencia (*C. sinensis*) (Moreira *et al.* 2011) por lo que la transmisión si es posible, sin embargo, al no encontrarse en ninguna de las muestras, una posible hipótesis puede ser que no se encuentra de momento distribuido ampliamente en el país por lo menos en el cultivo de naranja.

<sup>1</sup> Meza, C. 26 de octubre de 2021. Estado de la leprosis de los cítricos (correo electrónico). comunicación personal. Coto Brus, Servicio Fitosanitario del Estado

## F. CONCLUSIONES

El uso de características morfológicas permitió identificar a las especies *B. azores*, *B. yothersi* y *Brevipalpus* sp.nov. Adicionalmente, la secuenciación del gen COX1 confirmó la presencia de las especies citadas anteriormente. La diversidad encontrada muestra la capacidad de encontrar diferentes especies incluso en un cultivo.

Basado en la información morfológica y molecular generada en esta investigación se propone una nueva especie dentro del género *Brevipalpus*.

Se plantea la hipótesis de que las poblaciones F1 y F8 se encuentran en proceso de especiación o son una segunda nueva especie detectada en este trabajo y relacionada con *B. yothersi*.

Los resultados de esta investigación permitieron determinar la ausencia de los virus de la leprosis de los cítricos CiLV-C, CiLV-C2, OFV-citrus y CiLV-N y el virus de la variegación de los cítricos CVV en las zonas muestreadas.

El CTV se encuentra distribuido en los cítricos de todas las regiones que fueron utilizadas en esta investigación, ya que mediante el uso de técnicas moleculares se detectó el 100% de las fincas productoras de cítricos positivas para dicho virus.

## G.LITERATURA

- Aguilar, H; Murillo, P. 2012. Nuevos hospederos y registros de ácaros fitófagos para Costa Rica 2008-2012. *Agronomía Costarricense* 36(2):11-28.
- Araya, J. 2000. Informe sobre la prospección de la “leprosis de los cítricos” en la zona fronteriza (Costa Rica – Panamá). Panamá: Ministerio de Agricultura y Ganadería. Costa Rica.
- Araya, J. 2001. Acciones de prevención contra la leprosis de los cítricos en Costa Rica. Informe, 4 p.
- Ávalos, JM. 2019. Determinación morfométrica-molecular de una población aberrante de *Brevipalpus californicus* y su papel como vector de Citrus leprosis virus (CiLV-C y OFV-citrus). Montecillo, México, Programa de postgrado en fitosanidad entomología y acarología. 69 p.
- Ávalos, JM.2016. Determinar especies de ácaros del género *Brevipalpus* (Acari: Tenuipalpidae) en cítricos y reconocer posibles vectores de la leprosis de los cítricos. Aguilar, H; Solano, AM. II Congreso Latinoamericano de Acarología (2), 2016, Montenegro, Quindío, Colombia. Sociedad Latinoamericana de Acarología. 318p.
- Baker, E; Suigong, Y. 1988. A catalog of the false spider mites (Tenuipalpidae: Acari) of the United States. *International Journal of Acarology* 14(3):143-155.
- Bandelt, H; Forster, P; Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1), 37–48.



Bastianel, M; Freitas-Astúa, J; Kitajima, E; Machado, M. 2010. The citrus leprosis pathosystem. *Summa Phytopathologica* 32(3):211-220. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-54052006000300001>.

Bastianel, M; Novelli, VM; Kitajima, EW; Kubo, KS; Bassanezi, RB; Machado, MA; Freitas-Astúa, J. 2010. Citrus Leprosis: centennial of an unusual mite-virus pathosystem. *Plant Disease* 94(3):284-292. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-3-0284>.

Beard, J.J; /mites/ Ochoa, R; Bauchan, G.R; Trice, M; Redford, A; Walters, T; Mitter, C. 2013. Flat mites of the world (en línea, sitio web). Disponible en <http://idtools.org/id flatmites/>.

Beard, JJ; Ochoa, R; Braswell, WE; Bauchan, GR. 2015. *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) species complex (Acari: Tenuipalpidae a closer look. *Zootaxa* 3944(1):1-67-1-67. DOI: <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3944.1.1>.

Bitancourt, A. A. 1934. Relação das doenças e fungos parasitas observados na Secção de Fitopatologia durante os anos de 1931 e 1932. *Arquivos do Instituto Biológico. (Sao Paulo)* 5:185-196.

Bitancourt, A. 1940. A leprose dos citrus. *O Biológico.* 6:39-45.

CABI/EPPO, 2013. Citrus leprosis virus C. [Distribution map]. In: *Distribution Maps of Plant Diseases*, Wallingford, UK: CABI. Map 801 (Edition 2). DOI:10.1079/DMPD/20133161819

Castro, CA; Otero, G; Quijano, JA; Martínez, E; González, H; Cuellar, C; Soto, L. 2021. Potential areas for the establishment of citrus leprosis virus vectors,

*Brevipalpus* spp., in Mexico. *Experimental & Applied Acarology* 84(2):365-388

Chabi, C; Ramos, PL; Tassi, AD; Guerra, O; Kitajima, EW; Harakava, R; Beserra, JEA; Salaroli, RB; Freitas-Astúa, J. 2018. Identification and characterization of citrus chlorotic spot virus, a new *Dichorhavirus* associated with citrus leprosis-like symptoms. *Plant Disease* 102(8):1588-1598.

Childers, CC; Kitajima, EW; Welbourn, WC; Rivera, C; Ochoa, R. 2001. *Brevipalpus* como vectores de la leprosis de los cítricos, Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) No. 60 p. 66 - 70.

Childers, C.C; Rodrigues, J.C; Welbourn, WC. 2003a. Host plants of *Brevipalpus californicus*, *B. obovatus* and *B. phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) and their potential involvement in the spread of one or more viruses. *Experimental & Applied Acarology* 30 (1-3): 29-105 .

Childers, C; Derrick, K. 2003b. *Brevipalpus* mites as vectors of unassigned Rhabdoviruses in various crops. *Experimental & Applied Acarology* 30:1-3. DOI: <https://doi.org/10.1023/B:APPA.0000006542.96404.63>.

Childers, C; Rodrigues, J; Derrick, K; Achor, D; French, J; Welbourn, W; Ochoa, R; Kitajima, E. 2003c. Citrus leprosis and its status in Florida and Texas: Past and present. *Experimental & Applied Acarology* 30(1-3):181-202. DOI: <https://doi.org/10.1023/B:APPA.0000006548.01625.72>.

- Clement, M; Snell, Q; Walker, P; Posada, D; Crandall, K. 2002. TCS: Estimating gene genealogies. Parallel and Distributed Processing Symposium, International Proceedings, 2, 184.
- Cook, G; Kirkman, W; Clase, R; Steyn, C; Basson, E; Fourie, PH; Moore, SD; Grout, TG; Carstens, E; Hattingh, V. 2019. Orchid fleck virus associated with the first case of citrus leprosis-N in South Africa. European Journal of Plant Pathology 155(4):1373-1379. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01854-4>.
- Darriba, D; Taboada, GL; Doallo, R; Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics, and parallel computing. Nature Methods 9(8):772-772.
- Dawson, WO; Bar-Joseph, M; Garnsey, SM; Moreno, P. 2015. Citrus tristeza virus: making an ally from an enemy. Annual Review of Phytopathology 53(1):137-155.
- de Lillo, E; Freitas, J; Kitajima, E; Ramos, P; Simoni, S; Tassi, A; Valenzano, D. 2021. Phytophagous mites transmitting plant viruses: Update and perspectives. Entomologia Generalis 41:439-462. DOI: <https://doi.org/10.1127/entomologia/2021/1283>.
- Denmark, HA. 1984. *Brevipalpus* mites found on Floridacitrus. Dept.Agric. Consumer Serv., DPI Entomology Circular:69.
- Dominguez, F.S; Bandel A; Childers , C; Kitajima, EW. 2001. Leprose dos citros no Panama. Summa Phytopathologica:26:132 (Abstr.).

- Donnadieu, A-L. 1875. Recherches pour servir à l'histoire des Tétranyques. Thesis Ph.D Lyon, France Georg. 196 p.
- EPPO Global database. 2022. (en línea, sitio web). Consultado 31 may 2022. Disponible en <https://www.cabi.org/isc/abstract/20220166812>.
- Evans, G.A; Cromroy, H.A; Ochoa, R. 1993. The Tenuipalpidae of Honduras (Tenuipalpidae: Acari). 532 Florida Entomologist 76:126-155.
- FAO. 2019. Área sembrada de cultivos cítricos en Costa Rica (en línea, sitio web). Disponible en <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>.
- Fawcett, H.S.1911. Scaly bark or nail-head rust of citrus. Bull. Agricultural Experiment Station, Gainesville, USA 106. 41 pp.
- Fazal ur Rehman, F; Kalsoom, M; Ahmad, S; Iqbal, M; Junaid, S; Tariq, M; Sultan, A; Hayat, Q; Khan, J. 2020. Citrus Leprosis and its impacts on citrus food industry: A Review. 6:34-39.
- Folmer, O; Black, M; Wr, H; Lutz, R; Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial Cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular marine biology and biotechnology 3:294-9.
- Franco, CR; Casarin, NFB; Domingues, FA; Omoto, C. 2007. Resistência de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae) a acaricidas inibidores da respiração celular em citros: resistência cruzada e custo adaptativo. Neotropical Entomology 36(4):565-576.

- Freitas, J; Cavalcante, M; Locali, E; Antonioli, R; Domingues, A; Machado, M. 2004. RT-PCR detection of citrus leprosis virus in samples from the Northern region of Brazil. *Virus Reviews & Research* 9 1:246-247.
- French, N., Yu, S., Biggs, P., Holland, B., Fearnhead, P., Binney, B., Fox, A., Grove-White, D., Leigh, J. W., Miller, W., Muellner, P., & Carter, P. 2014. Evolution of *Campylobacter* species in New Zealand. In Sheppard, S. K. & Méric, G. (Eds.), *Campylobacter Ecology and Evolution* (pp. 221–240). Norfolk, England: Caister Academic Press.
- Frezzi, 1940: «La lepra explosiva del naranjo: investigaciones realizadas por el Laboratorio de Patología de Bella Vista (Bol. Frutas y Hortalizas, Min. Agr., Buenos Aires.
- García, P; Duran, Y; Otero, G; Valdovinos, G; Santillán, MT; Ortiz, CF; Velázquez, JJ; Sánchez, S. 2018. Transmission of viruses associated with cytoplasmic and nuclear leprosis symptoms by *Brevipalpus yothersi* and *B. californicus*. *Tropical Plant Pathology* 43(1):69-77.
- Gerson, U. 2008. The Tenuipalpidae: an under-explored family of plant-feeding mites. *Systematic and Applied Acarology* 13:83. DOI: <https://doi.org/10.11158/saa.13.2.1>.
- Gómez, R; Santillán, MT; Guzmán, AW; Valdovinos, G; Becerril, EA; Robles, PL. 2019. Spatiotemporal association between the mite *Brevipalpus yothersi* and citrus leprosis virus C in orange orchards. *Experimental & Applied Acarology* 79(1):69-86. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10493-019-00409-w>.

- Gonzalez, R.H. 1975. Revision of the *Brevipalpus phoenicis* complex' with descriptions of a new species from Chile and Thailand (Acarina, Tenuipalpidae). *Acarologia* (27): 81-91.
- Gottwald, T; Villalobos, W; Rivera, C. 2002. Comparative epidemiology of citrus tristeza virus in plantings of various citrus species in Costa Rica, and long distance spread by the brown citrus aphid. *International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010)* 15. DOI: <https://doi.org/10.5070/C52WT7T3CN>.
- Hall, T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series - Oxford Academic Series*. 41:95-98.
- Huson, D.H; Bryant, D. 2006 . Application of phylogenetic networks in evolutionary studies, *Molecular Biology and Evolution*, 23(2):254-267.
- INEC.2020. Encuesta nacional agropecuaria 2019. Resultados de la actividad agrícola y forestal. San José, Costa Rica. 91 p. <https://www.inec.cr/sites/default/files/documetos-biblioteca-virtual/reena-cultivos2018.pdf>.
- Knorr, LC; Denmark, HA; Burnett, HC. 1968. Occurrence of *Brevipalpus* mites, leprosis, and false leprosis on citrus in Florida. *Florida Entomologist* 51:11-17.

- Lastra, R; Leandro, G; Meneses, R. 1990. Diagnostic of citrus tristeza virus and its vector in Costa Rica (en línea). *Turrialba* 40(2) p. 235-237.
- Leon, G; Realpe, C; Garzon, P; Rodriguez, J; Moreno, M; Childers, C; Achor, D; Freitas-Astua, J; Antonioli-Luizon, R; Salaroli, R; Mesa, C; Kitajima, E. 2006. Occurrence of citrus leprosis virus in Llanos Orientales, Colombia. *Plant Disease* 90(5):682. DOI: <https://doi.org/10.1094/PD-90-0682C>.
- Librado , P; Rosas, J.2009.DnSP v5 : A software for compressive analysis for DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451-1452.
- Locali, EC; Freitas-Astua, J; de Souza, AA; Takita, MA; Astua-Monge, G; Antonioli, R; Kitajima, EW; Machado, MA. 2003. Development of a molecular tool for the diagnosis of leprosis, a major threat to citrus production in the Americas. *Plant Disease* 87(11):1317-1321.
- Maddisone, W; Maddisone, D. 2021. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.70 (en línea, sitio web). Disponible en <http://www.mesquiteproject.org>.
- Manson, D.C.M. 1963.Mites of the families Tetranychidae and Tenuipalpidae associated with citrus in Southeast Asia. *Acarologia, Paris* 5(3) :351-364.
- Mejia, L; Paniagua, A; Cruz, N; Porras, M; Palmieri, M. 2002. Citrus leprosis, disease that endangers plantations in Guatemala. *In Proceedings of the 42nd Annual Meeting of the American Phytopathological Society. Caribbean Division, Antigua, APS.* p. 17-19.



Mesa, C. 2009. Disponible en: América Latina Hoy 52:41-61. DOI: <https://doi.org/1130-2887>.

Moreira, L; Albertazzi, FJ; Garital, L; Ortiz, B; Villalobos, W. 2011. First report of citrus variegation virus in Palestine sweet lime, as coffee shade in Costa Rica (en línea). International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010) 18(18). DOI: <https://doi.org/10.5070/C58V43F9RS>

Moreno, P; Ambrós, S; Albiach-Martí, M; Guerri, J; Peña, L. 2008. Citrus tristeza virus: a pathogen that changed the course of the citrus industry. Molecular Plant Pathology 9:251-68.

Muma, MH. 1970. Natural control potential of *Galendromus floridanus* (Acarina: Phytoseiidae) on Tetranychidae on Florida citrus trees. Florida Entomologist 53:79-88.

NAPPO. 2005. Organización Norteamericana de Protección a las Plantas. Sistema de Alerta Fitosanitaria. Detección de la leprosis en el estado de Chiapas, México. (en línea, sitio web). Disponible en <http://www.pestalert.org/%0Aespanol/oprDetail.cfm?oprID=165>. [Fecha consulta: Enero del 2019.

Navajas, M; Fournier, D; Lagnel, J; Gutiérrez, J; Boursot, P. 1996. Mitochondrial COI sequences in mites: evidence for variations in base composition. Insect Molecular Biology 5(4):281-285.

Navia, DD; Mendonça, RSRS; Ferragut, FF; Miranda, LCLC; Trincado, RCRC; Michaux, JJ; Navajas Navarro, MM. 2013. Cryptic diversity in *Brevipalpus* mites (Tenuipalpidae). *Zoologica Scripta* 42(4):406-426. DOI: <https://doi.org/10.1111/zsc.12013>.

Navia, D; Novelli, VM; Rombauts, S; Freitas-Astúa, J; Santos de Mendonça, R; Nunes, MA; Machado, MA; Lin, Y-C; Le, P; Zhang, Z; Grbić, M; Wybouw, N; Breeuwer, JAJ; Van Leeuwen, T; Van de Peer, Y. 2019. Draft genome assembly of the false spider mite *Brevipalpus yothersi*. *Microbiology Resource Announcements* 8(6):e01563-18. DOI: <https://doi.org/10.1128/MRA.01563-18>.

Nguyen, HDT; Jančič, S; Meijer, M; Tanney, JB; Zalar, P; Gunde-Cimerman, N; Seifert, K. 2015. Application of the phylogenetic species concept to *Wallemia sebi* from house dust and indoor air revealed by multi-locus genealogical concordance. *PLOS ONE* 10(3): e0120894. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120894>

Nei, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics* (en línea). Columbia University Press. DOI: <https://doi.org/10.7312/nei-92038>.

Nunes, MA; de Carvalho Mineiro, JL; Rogerio, LA; Ferreira, LM; Tassi, A; Novelli, VM; Kitajima, EW; Freitas-Astúa, J. 2018. First Report of *Brevipalpus papayensis* as vector of coffee ringspot virus and citrus leprosis virus C. *Plant Disease* 102(5):1046-1046.

- Ochoa, R; Aguilar, H; Vargas, C. 1991. Ácaros fitófagos de América Central: guía Ilustrada. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 251 p.
- Ochoa, R; Otero-Colina, G; Beard, J; Mineiro, J; Elliot, K; Regonat, M; Navia, D; Rodrigues, J; Bauchan, G. 2016. Avances sobre ácaros del género *Brevipalpus* asociados a los cítricos en las Américas. Conference: Proceedings II Congreso Latinoamericano de Acarología At: Montenegro, Quindío, Colombia Volume: Vol. 1, Simposio 7: Acaros de Importancia Cuarentenaria: 97-98 pp.
- Ochoa, R; Salas, LA. 1989. The genus *Brevipalpus* in Costa Rica (Acari: Tenuipalpidae). International Journal of Acarology 15(1):21-30
- Parnell, S; van den Bosch, F; Gottwald, T; Gilligan, CA. 2017. Surveillance to inform control of emerging plant diseases: an epidemiological perspective. Annual Review of Phytopathology 55(1):591-610.
- Pritchard, A.E; Baker, E.W.1958. The false spider mites (Acarina: Tenuipalpidae). University of California. Publications in Entomology , 14 (3), 175-274.
- Rambaut, A; Drummond, A. 2012. FigTree version 1.4.3 (en línea, sitio web). Disponible en <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>.
- Ramos, PL; Chabi, C; Guerra, O; Breton, MC; Arena, GD; Nunes, MA; Kitajima, EW; Machado, MA; Freitas, J. 2016. Phylogenetic and molecular variability studies reveal a new genetic clade of citrus leprosis virus C. Viruses 8(6):153. DOI: <https://doi.org/10.3390/v8060153>.

Ramos, PL; Chabi, C; Guerra, O; Tassi, AD; Kitajima, EW; Harakava, R; Salaroli, RB; Freitas, J. 2017. Citrus leprosis virus N: a new *Dichorhavirus* causing citrus leprosis disease. *Phytopathology*® 107(8):963-976. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-17-0042-R>.

Rangel, E; Kitajima; E. W; Cerneli, M; Centeno, F.2000 «Recientes avances en el estudio de la leprosis de los cítricos en Venezuela», Memorias del VII Congreso Nacional Fruticultura San Cristobal, Universidad Nacional, Tachira, p.154

Rodrigues, J.C.V; Kitajima, EW. 2005. Levantamento de vírus transmitidos por *Brevipalpus* (Acari: Tenuipalpidae) na região de Manaus e Urucu, AM. *Summa Phytopathologica* 31:26.

Rodrigues, J; Elliot, K; Childers, C; Chagas, C. 2003. Citrus leprosis virus vectored by *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) on citrus in Brazil. *Experimental & Applied Acarology* 30:161-79.

Rodrigues, J.C.; Zuniga; J.A; Achor; D.S; Childers; C.C. ; Kitajima, E. W.2006.«Occurrence and distribution of citrus leprosis virus in Honduras», *New Disease Reports*, June, EE.UU.

Ronquist, F; Teslenko, M; van der Mark, P; Ayres, DL; Darling, A; Höhna, S; Larget, B; Liu, L; Suchard, MA; Huelsenbeck, JP. 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61(3):539-542.

- Roy, A; Choudhary, N; Guillermo, LM; Shao, J; Govindarajulu, A; Achor, D; Wei, G; Picton, DD; Levy, L; Nakhla, MK; Hartung, JS; Brlansky, RH. 2013. A novel virus of the genus *Cilevirus* causing symptoms similar to citrus Leprosis. *Phytopathology*® 103(5):488-500.
- Roy, A; León, MG; Stone, AL; Hartung, JS; Brlansky, RH. 2014. First report of citrus leprosis virus nuclear type in sweet orange in Colombia. *Plant Disease* 98(8):1162-1162. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-14-0117-PDN>.
- Roy, A; Hartung, JS; Schneider, WL; Shao, J; Leon, G; Melzer, MJ; Beard, JJ; Otero-Colina, G; Bauchan, GR; Ochoa, R; Brlansky, RH. 2015b. Role bending: complex relationships between viruses, hosts, and vectors related to citrus leprosis, an emerging disease. *Phytopathology*® 105(7):1013-1025.
- Roy, A; Stone, AL; Shao, J; Otero G; Wei, G; Choudhary, N; Achor, D; Levy, L; Nakhla, MK; Hartung, JS; Schneider, WL; Brlansky, RH. 2015a. Identification and molecular characterization of nuclear citrus leprosis virus, a member of the proposed *Dichorhavirus* genus infecting multiple citrus species in Mexico. *Phytopathology*® 105(4):564-575. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-14-0245-R>.
- Salinas-Vargas, D; Santillán-Galicia, T; Guzman-Franco, A; Hernández-López, A; Ortega, L; Mora-Aguilera, G. 2016. Analysis of genetic variation in *Brevipalpus yothersi* (Acari: Tenuipalpidae) populations from four species of citrus host plants. *PLOS ONE* 11:e0164552. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164552>.

- Sánchez, EJ; Santillán, MT; Novelli, VM; Nunes, MA; Mora-Aguilera, G; Valdez, JM; Otero, G; Freitas, J. 2015. Diversity and genetic variation among *Brevipalpus* populations from Brazil and Mexico. PLOS ONE 10(7):e0133861. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133861>.
- SEPSA. 2021. Costa Rica. 141 p. Boletín Estadístico Agropecuario.
- SEPSA. 2022. Costa Rica, s.e. 141 p. Boletín Estadístico Agropecuario 2018-2021.
- SFE. 2021. Informe de fin de gestión.44 p. (INFORME DE FIN DE GESTIÓN).
- Smith, M. 1979. The Tenuipalpidae (Acari) of Africa with keys to the world fauna. Entomology Memoirs of the Department of Agricultural Technological Service 50:1-135.
- Spegazzini, C.1920. Sobre algunas enfermedades y hongos que afectan plantas de agrios en el Paraguay», Anales de la Sociedad Científica Argentina 90:155-188, Argentina
- Sumabat, LG; Kemerait, RC; Brewer, MT. 2018. Phylogenetic diversity and host specialization of *Corynespora cassiicola* responsible for emerging target spot disease of cotton and other crops in the southeastern United States. Phytopathology® 108(7):892-901.

- Tassi, A. D., Garita-Salazar, L. C., Amorim, L., Novelli, V. M., Freitas-Astúa, J., Childers, C. C., & Kitajima, E. W. 2017. Virus-vector relationship in the citrus leprosis pathosystem. *Experimental & Applied Acarology*, 71(3), 227–241. <https://doi.org/10.1007/s10493-017-0123-0>
- Tassi, AD. 2018. Diversidade morfológica e genética de diferentes espécies de *Brevipalpus* (Acari: Tenuipalpidae) e suas competências como vetores de vírus (en línea). Tesis Ph.D., São Paulo, Brasil, Universidade de São Paulo. DOI: <https://doi.org/10.11606/T.11.2018.tde-17072018-160552>.
- Taylor, JW; Jacobson, DJ; Kroken, S; Kasuga, T; Geiser, DM; Hibbett, DS; Fisher, MC. 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in Fungi. *Fungal Genetics and Biology* 31(1):21-32. DOI: <https://doi.org/10.1006/fgbi.2000.1228>.
- Untiveros, M; Perez-Egusquiza, Z; Clover, G. 2010. PCR assays for the detection of members of the genus *Illavirus* and family *Bromoviridae*. *Journal of Virological Methods* 165(1):97-104. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.01.011>.
- Vaidya G, Lohman DJ, Meier R (2011) Sequence matrix: concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. *Cladistics* 27(2): 171–180. <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2010.00329>.

Wang, Y; Yang, Z; Zhao, J; Li, R; Wang, Q; Li, J; Li, Z; Zhou, Y. 2020. Development of a sensitive and reliable reverse transcription-droplet digital polymerase chain reaction (RT-dPCR) assay for the detection of Citrus tristeza virus. *European Journal of Plant Pathology* 156(4):1175-1180.

Zhu, X; Li, X; Chen, W; Chen, J; Lu, W; Chen, L; Fu, D. 2012. Evaluation of new reference genes in papaya for accurate transcript normalization under different experimental conditions. *PLOS ONE* 7(8): e44405.



## H. ANEXOS

Anexo 1. Números de accesión de las muestras utilizadas en el árbol COX1,372 pb correspondiente a la región amplificada por Navajas et al. (1996), procedentes del banco de genes NCBI.

Especie	Número de accesión
<i>B. chilensis</i>	KC291395
	KC344722
	KC291391
	KC291394
	KC291398
	KC291393
	KC291392
	KC291400
	KC291397
KC291401	
<i>B. ferraguti</i>	MH204760
	MH204761
	MH204726
	MH204762
<i>B. azores</i>	MK499458
	MK499460
<i>B. papayensis</i>	KF954950
	KF954956
<i>B. phoenicis</i>	KC291387
	KC291388
<i>B. obovatus</i>	KC291384
	KC291385
	KC291383
<i>B. californicus</i>	KC291402
	DQ789591
<i>B. yothersi</i>	KC291375
	KF954954
	KF955001
	AY320027
	KC291369
<i>Cenopalpus pulcher</i>	AY320029

**Anexo 2.** Número de accesión de las muestras utilizadas en el árbol COX1,650 pb correspondiente a la región barcoding de Folmer *et al.* (1994).

Especie	Número de accesión
<i>B. papayensis</i>	MT664888
	MT664887
<i>B. phoenicis</i>	MT664886
<i>B. obovatus</i>	MG458800
	MG458801
<i>B. chilensis</i>	MG458833
	MG458834
	MG458824
<i>B. ferraguti</i>	MG458825
	MG458857
<i>B. californicus</i>	MG458861
	MG458864
<i>B. lewisi</i>	MG458869
	MG458870
<i>B. yothersi</i>	MG458853
	MG458862
<i>B. incognitus</i>	MG458854
	MG458856
<i>B. cuneatus</i>	MG458795
	MG458855
<i>Raoiella indica</i>	ON386174

**Anexo 3.** Caracterización de los diferentes cebadores para la amplificación utilizados.

Organismo objetivo	Nombre del iniciador	Gen	Secuencia	Referencia	Tamaño de amplicón
<i>Brevipalpus</i> spp.	LCO1490-F	COX1	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'	Folmer <i>et al.</i> 1994	1100 pb
	DNR		5'- TGATTTTTTGGTCACCCAGAAG-3'	Navajas <i>et al.</i> 1996	
Gen planta	IF18S2-F	18S	5'TCTGCCCGTTGCTCTGATGA3'	Zhu <i>et al.</i> 2012	193 pb
	IF18S2-R		5'CCTTGGATGTGGTAGCCGTTT3'		
CiLV-C	MPF		5'GCGTATTGGCGTTGGATTTCTGAC 3'	Locali <i>et al.</i> 2003	339 pb
	MPR		5'TGTATACCAAGCCGCCTGTGAACT3'		
CiLV-C2	CPG-F	Proteína de movimiento	5'ATGAGTAACATTGTGTGCGTTTTCTGTTGT 3'	Roy <i>et al.</i> 2013	795 pb
	CPG-R		5'TCACTCTTCTGTTTCATCAACCTGTT3'		
CiLV-N	N-DC-F	Proteína de la nucleocápside	5'CCGTACCCATTGTGAAAATA3'	Ramos-González <i>et al.</i> 2017	420 pb
	N-DC-R		5'GAACCCCTTTGAGGAATG 3'		
OFV-citrus	NPF-F		5'ATGGCTAACCCAAGTGAGATCGATTA3'	Roy <i>et al.</i> 2014	681 pb
	NPF-R		5'AGTTGCCTTGAGATCATCACATTGGT3'		
CTV	CTV6-F	Proteína cubierta	5'TCCGACTCTGATAACGATG3'	Wang <i>et al.</i> 2020	159 pb
	CTV6-R		5'ACCGCTAACGATACCAAC3'		
CVV (Iarvirus)	Ilar 1F5 Ilar 1R7		GCNNGWTGYGGDAARWCNAC AMDGGWAYYTGYTYNGTRTCACC	Untiveros <i>et al.</i> 2010	

F- Iniciador sentido, R-iniciador antisentido

**Anexo 4.** Porcentajes de variación interespecífica e intraespecífica para *B. yothersi*, *Brevipalpus* sp. nov y *B. azores* versus secuencias provenientes del NCBI.

Comparación	K2P				No corregido			
	Promedio	Max	Min	Desviación estándar	Promedio	Max	Min	Desviación estándar
<i>B. azores</i> vs <i>B. papayensis</i>	0,29	0,29	0,28	0,01	0,29	0,29	0,28	0,01
<i>B. yothersi</i> vs <i>B. yothersi</i>	0,43	0,87	0,28	0,27	0,51	0,86	0,28	0,28
<i>Brevipalpus</i> sp.nov vs <i>B. papayensis</i>	1,47	1,48	1,46	0,01	1,45	1,47	1,44	0,02
<i>B. yothersi</i> vs <i>B. phoenicis</i>	2,02	2,08	1,76	0,10	2,09	2,60	2,02	0,19
<i>B. azores</i> vs <i>B. obovatus</i>	5,57	5,75	5,39	0,18	5,37	5,53	5,20	0,17
<i>Brevipalpus</i> sp.nov vs <i>B. obovatus</i>	5,58	5,80	5,39	0,16	5,38	5,58	5,20	0,17
<i>Brevipalpus</i> sp.nov vs <i>B.chilensis</i>	6,69	7,10	6,33	0,36	6,39	6,76	6,06	0,32
<i>B. azores</i> vs <i>B. chilensis</i>	7,00	7,35	6,64	0,37	6,67	6,99	6,35	0,34
<i>B. yothersi</i> vs <i>B. californicus</i>	7,65	10,32	0,28	3,38	8,97	9,82	7,80	0,60
<i>B. californicus</i> vs <i>B. yothersi</i>	9,57	10,53	8,24	0,70	8,97	9,82	7,80	0,60
<i>B. yothersi</i> vs <i>B. papayensis</i>	9,82	10,20	9,54	0,21	9,22	9,53	8,95	0,18
<i>B. yothersi</i> vs <i>B. obovatus</i>	9,85	10,53	8,88	0,51	9,24	9,82	8,38	0,43
<i>Brevipalpus</i> sp.nov vs <i>B.californicus</i>	9,28	10,40	8,24	1,08	8,72	9,70	7,80	0,96
<i>Brevipalpus</i> sp.nov vs <i>B. phoenicis</i>	9,27	9,38	9,21	0,10	8,72	8,82	8,67	0,09
<i>Brevipalpus</i> sp.nov vs <i>B. yothersi</i>	9,60	9,72	9,54	0,10	9,00	9,11	8,95	0,09
<i>B. azores</i> vs <i>B. phoenicis</i>	9,92	9,96	9,87	0,06	9,28	9,32	9,24	0,06
<i>B. azores</i> vs <i>B. californicus</i>	9,60	10,64	8,56	1,15	9,30	9,91	8,16	0,99
<i>B. yothersi</i> vs <i>B. azores</i>	10,11	10,33	9,87	0,18	9,51	9,82	9,24	0,18
<i>B. yothersi</i> vs <i>B. chilensis</i>	10,62	11,36	9,55	0,54	9,96	10,69	8,95	0,51

**Anexo 5.** Secuencia obtenida del virus de la leprosis de los cítricos citoplasmática (CILV-C), región fronteriza Costa Rica con Panamá.

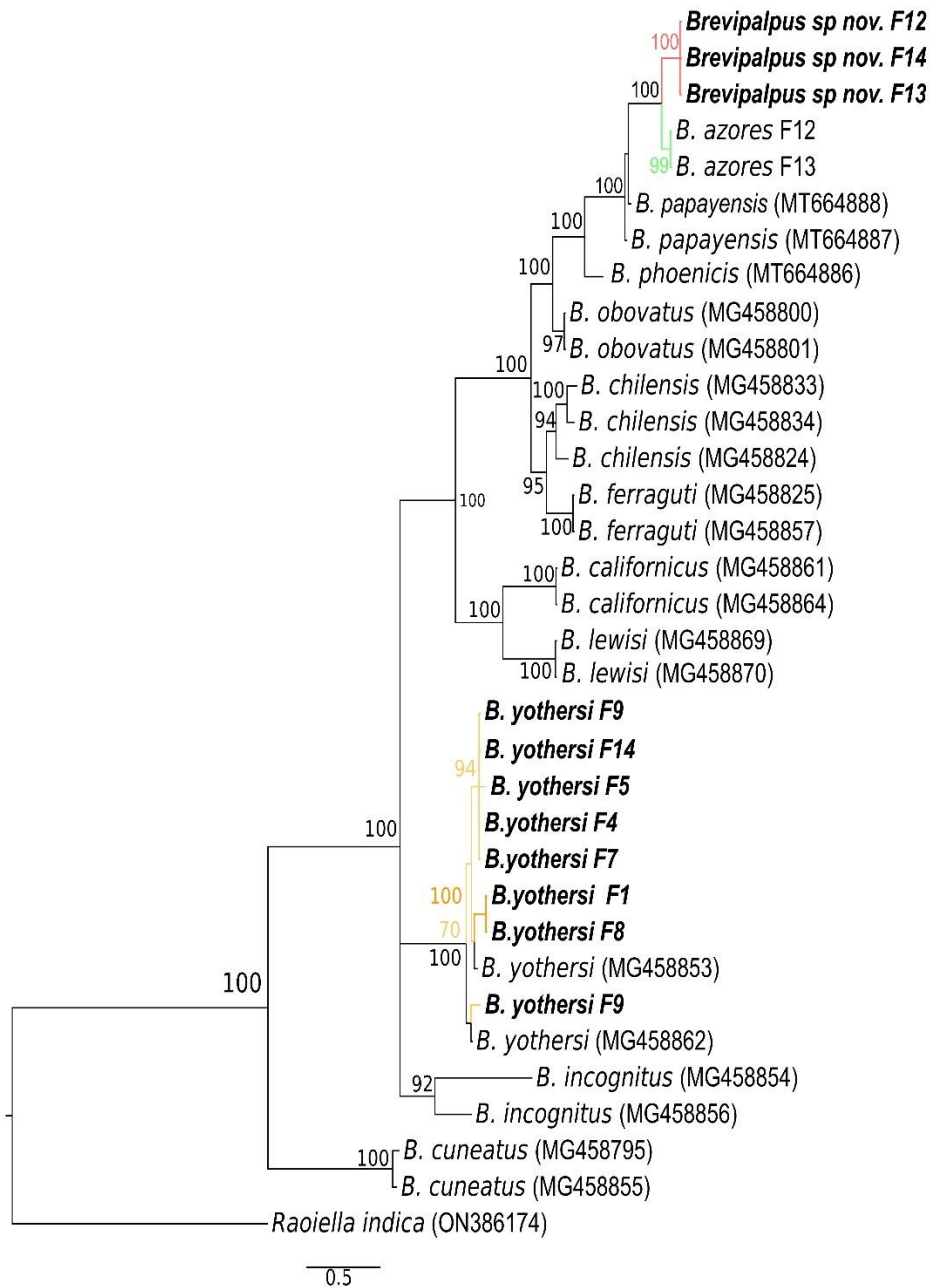
Secuencia sentido 5'-3' editadas	
San Vito, Costa Rica	GTTGGATTTCTGACACCGAACGATATGATTTCTCGTTTGGTTGGGTTTCATA AACCGTAAAGCTGAAGACGCTGGGGTTAGATCTGTGGAGTCTTTTAGGCA GATATCTGATGTCGTGCTTATAATTGTGCCGCAGATAGCGCTCCCGGCCG AGCTGTGCTAAAGCTTGTGCGATTGCTAATACTAGAGGCTGTTAAT GACCAAGAGGTCACTGTCAATAGTACTGGTGGTCCATGTGTTGTTGTCAT GAACTGTGCCCATTCGATTCCGAATGAGGACAGGACTCATGTTAATGGAT CTGAAGTTCACAGGCCG

**Anexo 6.** Secuencias obtenidas del virus de la tristeza de los cítricos.

Finca	Secuencia sentido 5'-3' editadas
F1	TTCCGACTCTGATAACGATGAACGATGTGCGTCAGTTAGGTACCCAACAGAAC GCCGCTTTGAACAGAGATTTGTTCCCTTACTTTGAAAGGGAAGTATCCTAATTT GTCTGATAAAGATAAAGGACTTTCACCTTAGCTATGATGTTGTATCGTTTAGCGGT A
F5	TTTCCGACTCTGATAACGATGAACGATGTGCGTCAGTTGGGTACCCAACAGAA TGCCGCTTTGAACAGAGATTTGTTTCTTACTTTGAAAGGGAAGTATCCTAATTT GTCTGATAAAGATAAAGGACTTTCACATAGCTATGATGTTGTATCGTTTAGCGGT A
F9	TTTTCCGACTCTGATAACGATGAACGATGTGCGTCAGTTAGGTACCCAACAGA ACGCCGCTTTGAACAGAGATTTGTTCCCTTACTTTGAAAGGGAAGTATCCTAATT TGTCTGATAAAGATAAAGGACTTTCACCTTAGCTATGATGTTGTATCGTTTAGCGG T
F13	TTTCCGACTCTGATAACGATGAACGATGTGCGTCAGTTAGGTACCCAACAGAA CGCCGCTTTGAACAGAGATTTGTTCCCTTACTTTGAAAGGGAAGTATCCTAATTT GTCTGATAAAGATAAAGGACTTTCACCTTAGCTATGATGTTGTATCGTTTAGCGGT T
F17	TTTTCCGACTCTGATAACGATGAACGATGTGCGTCAGTTAGGTACCCAACAGA ACGCCGCTTTGAACAGAGATTTGTTCCCTTACTTTGAAAGGGAAGTATCCTAATT TGTCTGATAAAGATAAAGGACTTTCACCTTAGCTATGATGTTGTATCGTTTAGCGG T

**Anexo 7.** Mediciones ( $\mu\text{m}$ ) de las diferentes especies encontradas en los muestreos (mínimo-máximo (promedio $\pm$  desviación estándar), para las poblaciones en estudio  $n=12$ , y todas las mediciones son dadas en micrómetros ( $\mu\text{m}$ ).

Especies/poblaciones	V2 -H1	SC2-SC2	C3-C3
<i>B. yothersi</i> (F7, F4, F5 y F14)	197-220 ( <b>208</b> $\pm$ 6,45)	120-141 ( <b>130</b> $\pm$ 5,01)	130-150 ( <b>139</b> $\pm$ 5,03)
<i>B. yothersi</i> (F8)	200-222 ( <b>214</b> $\pm$ 6,92)	127-142 ( <b>136</b> $\pm$ 4,65)	134-151 ( <b>144</b> $\pm$ 4,63)
<i>B. yothersi</i> (Beard <i>et al.</i> 2015)	200-226 ( <b>216</b> )	131-146 ( <b>143</b> )	140-158 ( <b>152</b> )
<i>B. azores</i> (F12 y F13)	220-239 ( <b>231</b> $\pm$ 5,10)	141-160 ( <b>155</b> $\pm$ 5,82)	132-171 ( <b>162</b> $\pm$ 11,25)
<i>B. azores</i> (Beard <i>et al.</i> 2015)	220-238 ( <b>238</b> )	145-158 ( <b>156</b> )	154-168 ( <b>163</b> )
<i>B. papayensis</i> (F14)	219-244 ( <b>232</b> $\pm$ 6,45)	144-159 ( <b>153</b> $\pm$ 5,01)	156-172 ( <b>165</b> $\pm$ 5,03)
<i>B. papayensis</i> (Beard <i>et al.</i> 2015)	232-244 ( <b>240</b> )	146-152 ( <b>152</b> )	166-174 ( <b>166</b> )
<i>Brevipalpus</i> sp. nov (F12, F13 y F14)	220-243 ( <b>232</b> $\pm$ 7,70)	141-153 ( <b>147</b> $\pm$ 3,71)	145-160 ( <b>153</b> $\pm$ 3,91)



**Anexo 8.** Árbol filogenético inferido a partir de un análisis bayesiano de la región barcoding de Folmer et al. (1994) 650 pb del gen COX1 para *Brevipalpus* spp., en el cultivo de naranja, en Costa Rica. Modelo HKY+I+G. Las probabilidades posteriores se muestran como porcentajes en los nodos del árbol. Las secuencias obtenidas en esta investigación se encuentran en negrita. Escala: cambios esperados por sitio.