



Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas

ISSN: 2007-0934

revista_atm@yahoo.com.mx

Instituto Nacional de Investigaciones

Forestales, Agrícolas y Pecuarias

México

Peña-Carrillo, Kenzy Iveth; González-Hernández, Alejandro; López-Arroyo, José Isabel; Varela-Fuentes, Sostenes

Haplotipos del parasitoide *Tamarixia radiata* (Waterston) (Hymenoptera: Eulophidae) en los cítricos del estado de Tamaulipas, México

Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, vol. 5, núm. 4, junio-agosto, 2014, pp. 661-672

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

Estado de México, México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=263130476010>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Haplotipos del parasitoide *Tamarixia radiata* (Waterston) (Hymenoptera: Eulophidae) en los cítricos del estado de Tamaulipas, México*

Haplotypes of parasitoid *Tamarixia radiata* (Waterston) (Hymenoptera: Eulophidae) in citrus in the state of Tamaulipas, Mexico

Kenzy Ivveth Peña-Carrillo^{1§}, Alejandro González-Hernández², José Isabel López-Arroyo¹ y Sostenes Varela-Fuentes³

¹Campo Experimental General Terán-INIFAP, Carretera Montemorelos-China km 31, Nuevo León, México C. P. 67400, ²Universidad Autónoma de Nuevo León, Av. Pedro de Alba, Manuel L. Barragán, s/n, Cd. Universitaria, C. P. 66450, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. (lopez.jose@inifap.gob.mx). (alejandro.gonzalezhd@uanl.edu.mx/agonzahdz@gmail.com). ³Facultad de Ingeniería y Ciencias, Universidad Autónoma de Tamaulipas, C. P. 87194, Cd., Victoria Tamaulipas, México. (svarela@uat.edu.mx). Tel: 01 834 318 17 21. Ext. 212. [§]Autora para correspondencia: pena.kenzy@inifap.gob.mx.

Resumen

Tamarixia radiata (Waterston) (Hymenoptera: Eulophidae) es un ectoparasitoide específico de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) vector de *Candidatus Liberibacter* spp., el agente causal del Huanglongbing, una enfermedad devastadora de los cítricos a nivel mundial. El parasitoide se introdujo accidentalmente a diversas regiones del continente Americano, entre ellas México, en donde actualmente es reproducido masivamente y liberado. Como contribución al conocimiento del uso de las poblaciones silvestres del parasitoide en beneficio de la citricultura mexicana, el objetivo del presente estudio fue caracterizar genéticamente poblaciones de *T. radiata* en el estado de Tamaulipas, México; mediante secuenciación de ADN mitocondrial (gen de la citocromo oxidasa subunidad 1) analizando muestras del parasitoide colectadas durante los años 2006-2013. De los especímenes obtenidos se encontraron dos haplotipos (H1 y H2) de los cuales el H1 se ha encontrado en la mayor parte de las zonas citrícolas infestadas por *D. citri* en México, mientras que el H2 sólo ha sido detectado hasta el momento en los estados de Tamaulipas y Yucatán. La distribución limitada del H2 sugiere las posibles entradas del parasitoide a México, lo cual es apoyado por el agrupamiento del H2 en el análisis estadístico de parsimonia con haplotipos que hasta el momento sólo se han encontrado en Florida.

Abstract

Tamarixia radiata (Waterston) (Hymenoptera: Eulophidae) is a specific ectoparasite of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) vector of *Candidatus Liberibacter* spp., the causative agent of Huanglongbing, a devastating disease of citrus worldwide. The parasitoid was accidentally introduced to various regions of the Americas, including Mexico, where currently it is massively reproduced and released. Contributing to the knowledge of parasitoid wild populations use to benefit the Mexican citrus industry, this study aimed to genetically characterize *T. radiata* populations in the state of Tamaulipas, Mexico, by sequencing mitochondrial DNA (cytochrome oxidase subunit 1 gene), analyzing parasitoid samples collected during the years 2006-2013. From the specimens two haplotypes (H1 and H2) were found, from which H1 is present in most citrus areas infested by *D. citri* in Mexico, while H2 has only been detected so far in the states of Tamaulipas and Yucatán. The limited distribution of H2 suggests the possible entries of the parasitoid to Mexico, which is supported by the clustering of H2 in the statistical parsimony analysis with haplotypes only found in Florida so far.

Keywords: *Diaphorina citri*, biological control, haplotype, parasitoid.

* Recibido: agosto de 2013
Aceptado: febrero de 2014

Palabras clave: *Diaphorina citri*, control biológico, haplotipo, Parasitoide.

Introducción

Tamarixia radiata (Waterston) (Hymenoptera: Eulophidae) es un ectoparasitoide ninfal del psílido asiático de los cítricos, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) (Étienne and Aubert, 1980), vector de la bacteria *Candidatus Liberibacter* spp., el agente putativo de la enfermedad Huanglongbing (HLB), la plaga más devastadora de los cítricos a nivel mundial (da Graca, 1991; da Graca and Korsten, 2004; Halbert and Manjunath, 2004; Bové, 2006). El parasitoide es considerado como uno de los principales agentes de control biológico del vector, debido a que su capacidad de parasitismo y disminución de las poblaciones de *D. citri* han sido notables en las diversas partes del mundo a donde se ha introducido como parte de programas de control biológico del psílido asiático de los cítricos (Etienne and Aubert, 1980; Quilici, 1986; Chiu *et al.*, 1988; Hoy *et al.*, 1999; Étienne *et al.*, 2001).

En México, *T. radiata* se ha presentado de forma accidental al igual que en Argentina (Cáceres y Aguirre, 2005; Lizondo *et al.*, 2007), Brasil (Gómez-Torres *et al.*, 2006), Colombia (Kondo *et al.*, 2012), Cuba (González *et al.*, 2005), Puerto Rico (Pluke *et al.*, 2008), Texas (French *et al.*, 2001) y Venezuela (Barr *et al.*, 2009). En México, durante el año 2003, se encontró por primera vez un parasitoide del género *Tamarixia* en ninfas de *D. citri* colectadas en el estado de Tamaulipas (Coronado-Blanco *et al.*, 2003). Posteriormente, en el año 2009, se registró la presencia de *T. radiata* en colectas de Colima, Michoacán, Nuevo León, Sinaloa, Sonora y Tamaulipas, las cuales fueron efectuadas durante los años 2005 a 2008 (González-Hernández *et al.*, 2009).

En el año 2010 se inició el análisis de la diversidad genética del parasitoide en México, mediante el uso de las regiones ITS1, ITS2 y citocromo oxidasa subunidad I (COI) (González Hernández *et al.*, 2010a, b); mediante este último gen se identificó la existencia de cinco haplotipos distribuidos en los estados de Campeche, Colima, Jalisco, Michoacán, Nuevo León, Oaxaca, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán. Recientemente, Peña-Carrillo (2012) indica que en el estado de Tamaulipas se encuentran dos de los

Introduction

Tamarixia radiata (Waterston) (Hymenoptera: Eulophidae) is a nymphal ectoparasitoid of Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) (Etienne and Aubert, 1980), vector of the bacterium *Candidatus Liberibacter* spp., the putative agent of Huanglongbing (HLB) disease, the most devastating citrus pest worldwide (da Graca, 1991; da Graca and Korsten, 2004; Halbert and Manjunath 2004; Bové, 2006). The parasitoid is considered one of the main agents of biological control of the vector, because its ability for parasitism and diminish populations of *D. citri* has been remarkable in various parts of the world where it has been introduced as part of biological control programs of citrus Asian psyllid (Etienne and Aubert, 1980; Quilici, 1986; Chiu *et al.*, 1988; Hoy *et al.*, 1999; Etienne *et al.*, 2001).

In Mexico, *T. radiata* was brought accidentally as in Argentina (Cáceres and Aguirre, 2005; Lizondo *et al.*, 2007), Brazil (Gómez -Torres *et al.*, 2006), Colombia (Kondo *et al.*, 2012), Cuba (González *et al.*, 2005), Puerto Rico (Pluke *et al.*, 2008), Texas (French *et al.*, 2001) and Venezuela (Barr *et al.*, 2009). In Mexico, in 2003, for the first time, a parasitoid of the genus *Tamarixia* was found in *D. citri* nymphs collected in the state of Tamaulipas (Coronado-Blanco *et al.*, 2003). Subsequently, in 2009, the presence of *T. radiata* was recorded in collections of Colima, Michoacán, Nuevo León, Sinaloa, Sonora and Tamaulipas, which were made during the years 2005 to 2008 (González-Hernández *et al.*, 2009).

In 2010 the analysis of the parasitoid genetic diversity began in Mexico, using the ITS1, ITS2 and cytochrome oxidase subunit I (COI) regions (González Hernández *et al.*, 2010a, b); by the latter gene the existence of five haplotypes were identified, distributed in the states of Campeche, Colima, Jalisco, Michoacán, Nuevo León, Oaxaca, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz and Yucatán. Recently, Peña-Carrillo (2012) indicated that in the state of Tamaulipas there are two (H1 and H2) of the five haplotypes recorded by González-Hernández *et al.* (2010a), while in the states of Colima, Michoacán and Nuevo León, only H1 has been found. The H1 and H2 haplotypes located in Mexico, are the same that occur in populations of Taiwan and South Vietnam, that have been imported and released in the United States of America (USA) for *D. citri* control (Hoy and Nguyen, 2000; Skelley and

cinco haplotipos (H1 y H2) registrados por González-Hernández *et al.* (2010a), mientras que en los estados de Colima, Michoacán y Nuevo León, sólo se ha encontrado el H1. Los haplotipos H1 y H2 localizados en México, son los mismos que se presentan en las poblaciones de Taiwán y sur de Vietnam, que han sido importadas y liberadas en los Estados Unidos de América (EUA) para el control de *D. citri* (Hoy and Nguyen, 2000; Skelley and Hoy, 2004; Barr *et al.*, 2009) y cuya presencia ha sido registrada en Florida y Texas (EUA) (Barr *et al.*, 2009; De León and Setamou, 2010).

Debido al hallazgo de individuos con H2 en Tamaulipas (Peña-Carrillo, 2012), en la presente investigación se expandió el análisis de los haplotipos de esta región del noreste de México, con el objetivo de indagar la existencia de haplotipos propios de poblaciones locales, las cuales podrían ser útiles para el mejoramiento de las estrategias de control biológico de *D. citri* en el país. El conocimiento de la abundancia, frecuencia y dominancia de los haplotipos pueden ser indicativos de su adaptación a diferentes ambientes, y por ende contribuirá a un mejor manejo del vector de la enfermedad HLB en México.

Materiales y métodos

Los parasitoides utilizados durante la presente investigación provienen de recolectas de campo realizadas entre los meses de febrero-noviembre de los años 2006-2012 y primer semestre de 2013 en la zona citrícola del estado de Tamaulipas, así como plantas rutáceas del área urbana de Cd. Victoria, y Matamoros (Cuadro 1). Los especímenes se capturaron mediante red de golpeo y algunos se obtuvieron a partir de brotes infestados con ninfas de *D. citri* de tercer a quinto instar, parasitadas y mantenidas en cajas Petri de plástico a temperatura ambiente. Este material fue revisado diariamente durante dos semanas; los parasitoides emergidos se recolectaron con aspirador bucal y se conservaron en alcohol al 96%. Se seleccionó un total de 56 ejemplares distribuidos en los municipios de Güémez (recolectas del año 2006), Hidalgo (2006, 2007, 2011), Matamoros (2013), Reynosa (2013), San Fernando (2013) y Victoria (2007, 2008, 2010) (Figura 1), a partir de los cuales se aisló su ADN de manera individual y posteriormente se amplificó, se envió a secuenciar y se determinó a que haplotipo pertenecen.

Hoy, 2004; Barr *et al.*, 2009) and whose presence has been recorded in Florida and Texas (USA) (Barr *et al.*, 2009; De León and Setamou, 2010).

Because of the presence of individuals with H2 in Tamaulipas (Peña-Carrillo, 2012), in this investigation the analysis of haplotypes was expanded for this region of northeast Mexico, in order to investigate the existence of haplotypes of local populations, which could be useful for improving biological control strategies of *D. citri* in the country. Knowledge of the abundance, frequency and dominance of haplotypes may be indicative of adaptation to different environments, and thus contribute to a better management of the HLB disease vector in Mexico.

Materials and methods

The parasitoids used in this research come from field collections conducted between the months of February to November of the years 2006-2012 and the first half of 2013 in the citrus area of the state of Tamaulipas and *Rutaceae* plants in the urban area of Ciudad Victoria and Matamoros (Table 1). Specimens were captured by beating net and some were obtained from buds infested with *D. citri* nymphs from third to fifth instar parasitized and maintained in plastic Petri dishes at room temperature. This material was monitored daily for two weeks, the emerged parasitoids were collected with mouth aspirator and stored in 96% alcohol. A total of 56 individuals distributed in the municipalities of Güémez (collections in 2006), Hidalgo (2006, 2007, 2011), Matamoros (2013), Reynosa (2013), San Fernando (2013) and Victoria (2007, 2008, 2010) (Figure 1), from which DNA was isolated individually and amplified, and then sent for sequencing and determine their haplotype.

DNA was extracted using the PureLink® Genomic DNA kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The resulting DNA was kept at -20 °C until use. Subsequently, by endpoint PCR, a fragment of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (COI) gene was amplified, similarly to the studies reported by Barr *et al.* (2009), De León and Setamou (2010), González-Hernández *et al.* (2009) and Peña-Carrillo (2012), where the following oligonucleotides were used: CI-J-1718 (*forward*) 5'-GGAGGATTGGAAATTGATTAGTTCC-3' and CI-N-2191 (*reverse*) 5'CCCGGTAAATTAATATAAACTTC-3' designed by Simon *et al.* (1994).

Cuadro 1. Colectas y haplotipos encontrados en muestras de *T. radiata* de Tamaulipas.
Table 1. Collections and haplotypes found in *T. radiata* samples of Tamaulipas.

Fecha	Localidad	Coordenadas	Hospedero	Haplotipo
09-04-2006	Güémez	N 24°0'0.00"	Naranja valencia	H1
		W 99°9'0.00"		
22-10-2006	Güémez	N 23°55'7.37"	Naranja valencia	H1, H2
		W 99°0'20.09"		
15-10-2006	Hidalgo	N 24°0'55.68"	Naranja valencia	H1
		W 99°12'3.82"		
11-11-2006	Hidalgo	N 24°0'55.68"	Naranja valencia	H1
		W 99°12'3.82"		
05-02-2007	Victoria	N 23°42'85.1"	Limonaria	H2
		W 99°09'09.0"		
21-03-2007	Victoria	N 26°02'30.9"	Limonaria	H1
		W 98°14'15.3"		
28-03-2007	Victoria	N 23°42'85.1"	Limonaria	H1
		W 99°09'09.0"		
04-04-2007	Victoria	N 23°42'85.1"	Limonaria	H1
		W 99°09'09.0"		
25-04-2007	Victoria	N 23°42'85.1"	Limonaria	H1
		W 99°09'09.0"		
18-07-2007	Victoria	N 23°42'85.1"	Limonaria	H2
		W 99°09'09.0"		
23-07-2007	Victoria	N 23°42'85.1"	Limonaria	H2
		W 99°09'09.0"		
30-07-2007	Victoria	N 23°42'85.1"	Limonaria	H1
		W 99°09'09.0"		
13-08-2007	Hidalgo	N 24°0'55.68"	Naranja valencia	H1
		W 99°12'3.82"		
20-08-2007	Hidalgo	N 24°0'55.68"	Naranja valencia	H2
		W 99°12'3.82"		
04-11-2007	Victoria	N 23°42'85.1"	Limonaria	H1
		W 99°09'09.0"		
07-11-2007	Victoria	N 23°42'85.1"	Limonaria	H1
		W 99°09'09.0"		
23-04-2010	Victoria	N 23°43'34.7"	Limonaria	H1, H2
		W 99°07'39"		
31-07-2011	Hidalgo	N 24°0'55.68"	Naranja Valencia	H1
		W 99°12'3.82"		
14-08-2011	Hidalgo	N 24°0'55.68"	Naranja Valencia	H1
		W 99°12'3.82"		
11-09-2011	Hidalgo	N 24°0'55.68"	Naranja Valencia	H1
		W 99°12'3.82"		
09-10-2011	Hidalgo	N 24°0'55.68"	Naranja Valencia	H1
		W 99°12'3.82"		
06-11-2011	Hidalgo	N 24°0'55.68"	Naranja Valencia	H1
		W 99°12'3.82"		
20-03-2013	Matamoros	N 25°52'59.0"	Limonaria	H1
		W 97°29'54.6"		
20-03-2013	Matamoros	N 25°51'59.7"	Mandarina	H1
		W 97°30'19.0"		
21-03-2013	Reynosa	N 26°02'30.9"	Naranja valencia	H1, H2
		W 98°14'15.3"		
22-03-2013	San Fernando	N 24°49'60"	Naranja valencia	H1
		W 98°9'0"		

Para lograr la extracción de ácidos nucleicos se empleó el kit de extracción Pure Link Genomic DNA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); el ADN resultante se mantuvo a -20 °C hasta su uso. Posteriormente, mediante la técnica de PCR punto final se amplificó un fragmento del gen mitocondrial citocromo oxidasa subunidad I (COI) de igual forma a los estudios reportados por Barr *et al.* (2009), De León and Setamou (2010), González-Hernández *et al.* (2009) y Peña-Carrillo (2012); donde se utilizaron los oligonucleótidos CI-J-1718 (*forward*) 5'-GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC-3' y C1-N-2191 (*reverse*) 5'-CCCGGTAAAATTAATAAATACTTC-3' diseñados por Simon *et al.* (1994).

Las reacciones de PCR se prepararon de acuerdo a las concentraciones: Buffer 1x, dNTP's [2 mM], MgCl₂ [2 mM], oligonucleótidos 100 ng/μl, 1U de *Taq* polimerasa, y se realizaron de acuerdo a las siguientes condiciones: un ciclo de 94 °C-3 min.; 40 ciclos a 94 °C-20 seg.; 48 °C-20 seg.; 72 °C-40 seg.; y un ciclo adicional de extensión a 72 °C-10 min. Los productos obtenidos se visualizaron en gel de agarosa (2%) para la identificación del fragmento amplificado (550 pb aprox.), se compararon con un marcador de peso molecular (100-2200pb) y posteriormente fueron enviados a la compañía MacroGen EUA., para su secuenciación en ambos sentidos.

Las secuencias de ADN obtenidas se alinearon y compararon en el programa MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011) en donde se identificaron los puntos de mutación (haplotipos), acto seguido se determinó la distancia genética existente entre los haplotipos resultantes y con el mismo programa se realizó un árbol filogenético de Neighbor-Joining, inferido con el modelo Tamura-3-parametros; se incluyó la especie hermana *Tamarixia triozae* (Burks) Hymenoptera: Eulophidae, (número de acceso a gene bank, GQ912291.1) y *Gonatocerus metanotalis* (Ogloblin) (Hymenoptera: Mymaridae) (De León and Setamou, 2010; De León *et al.*, 2008, número de acceso a Gene Bank DQ922724.1) como grupos de referencia para señalar que las relaciones entre haplotipos son a nivel intraespecífico. Adicionalmente las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias disponibles en Gene Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), procedentes de los estudios de Barr *et al.* (2009) (Números de acceso GQ401914.1, GQ401916.1, GQ401918.1, GQ401920.1, GQ401921.1, GQ401870.1, GQ401875.1, GQ401880.1), De León and Setamou, (2010) (FJ807949.1, GQ912272.1-GQ912274.1, GQ912280.1-GQ912283.1), y secuencias proporcionadas por González-Hernández *et al.* (2009), las cuales también se incluyeron en el árbol filogenético y se distinguen por la presencia de (*), (**) y (***) respectivamente. Finalmente,

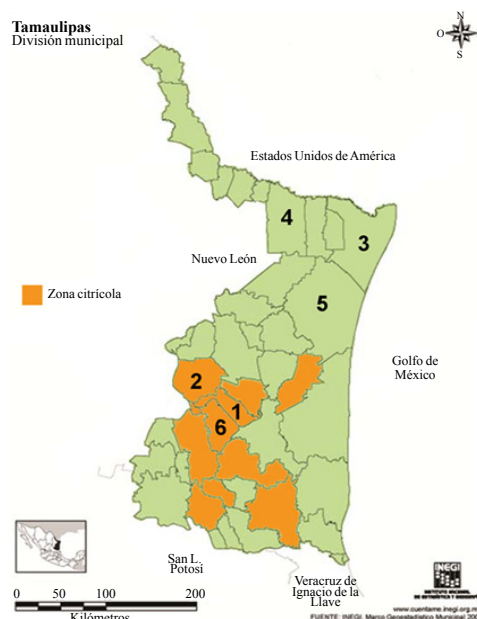


Figura 1. Mapa de Tamaulipas en el que se indican los municipios de recolecta de los parasitoides incluidos en esta investigación: 1. Güémez; 2. Hidalgo; 3. Matamoros; 4. Reynosa; 5. San Fernando; y 6. Victoria.

Figure 1. Tamaulipas map with municipalities of collected parasitoids included in this research: 1. Güémez; 2. Hidalgo; 3. Matamoros; 4. Reynosa; 5. San Fernando; and 6. Victoria.

PCR reactions were prepared according to the concentrations: Buffer 1x dNTP's [2 mM], MgCl₂ [2 mM], oligonucleotides 100 ng/μl, 1U of *Taq* polymerase, and were conducted according to the following conditions: a cycle at 94 °C - 3 min; 40 cycles at 94 °C - 20 s; 48 °C - 20 s; 72 °C - 40 s; and an additional extension cycle at 72 °C - 10 min. The obtained products were visualized on agarose gel (2%) for the identification of the amplified fragment (550 bp aprox.), and compared to a molecular weight marker (100-2 200 bp) and were subsequently sent to the MacroGen Company, USA, for sequencing in both directions.

The DNA sequences obtained were aligned and compared in the MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011) software where the mutation points were identified (haplotypes), then genetic distance between the resulting haplotypes was determined and using the same software a Neighbor-Joining phylogenetic tree was constructed, inferred with the Tamura 3-parameter model; the sister species was included: *Tamarixia triozae* (Burks), Hymenoptera: Eulophidae (Gene Bank accession number, GQ912291.1) and *Gonatocerus metanotalis* (Ogloblin) (Hymenoptera: Mymaridae) (De León and Setamou, 2010; De León *et al.*, 2008, Gene Bank accession number DQ922724.1)

con el programa TCS (Clement *et al.*, 2000) se estimó la estructura filogenética de los haplotipos, estimada con un análisis de redes de parsimonia con 95% de límite de conexión a partir de las diferencias nucleotídicas entre las secuencias.

Resultados

Se identificaron dos haplotipos los cuales corresponden a transiciones y transversiones (Cuadro 2), cada uno con una distancia genética de 0.112 diferencias por sitio en comparación con la especie hermana *T. triozae*, mientras que la distancia genética entre los haplotipos 1 y 2 fue de 0.005 (diferencias por sitio). La distancia genética que existe entre los haplotipos de *T. radiata* se observa reflejada en el árbol filogenético (Cuadro 3), la cual permite la separación de los haplotipos en ramas distintas. En el árbol se distinguen con números las muestras provenientes de Güémez (#2, 3, 21, 22, 55, 56), Hidalgo (#1, 4-6, 11-14, 38-47), Matamoros (#28-32, 35-37), Reynosa (#34, 48), San Fernando (#33) y Victoria (#7-10, 15-19, 23-27, 49-54) (Figura 2).

as reference groups to indicate that haplotypes are related at the intraspecific level. Additionally the obtained sequences were compared to sequences available in Gene Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), from studies of Barr *et al.* (2009) (Access Numbers GQ401914.1, GQ401916.1, GQ401918.1, GQ401920.1, GQ401921.1, GQ401870.1, GQ401875.1, GQ401880.1), De León and Setamou, (2010) (FJ807949.1, GQ912272.1 -GQ912274.1 , GQ912280.1- GQ912283.1), and sequences provided by González- Hernández *et al.* (2009), which were also included in the phylogenetic tree and are distinguished by the presence of (*), (**) and (***), respectively. Finally, with the TCS software (Clement *et al.*, 2000) the phylogenetic structure of haplotypes was estimated by a parsimony network analysis with 95% connection limit from the nucleotide differences among the sequences.

Results

Two haplotypes were identified, which correspond to transitions and transversions (Table 2), each with a genetic distance of 0.112 site differences compared to *T. triozae*

Cuadro 2. Cambios nucleotídico y frecuencia de haplotipos de *T. radiata* colectados en la región citrícola y áreas urbanas de Tamaulipas.

Table 2. Nucleotide changes and frequency of *T. radiata* haplotypes collected in the citrus region and urban areas of Tamaulipas.

Haplotipo	Posición: #nucleótido		Frecuencia (#individuos)	Municipio
	43	399		
1	T	G	4	Güémez
			19	Hidalgo
			8	Matamoros
			1	Reynosa
			1	San Fernando
2	C	T	14	Victoria
			2	Güémez
			1	Reynosa
Total			6	Victoria
			56	

Cuadro 3. Distancias genéticas entre los taxa incluidos en el análisis filogenético e inferidas con el programa Mega 5.0, mediante el modelo de 3 parámetros de Tamura.

Table 3. Genetic distances among taxa included in the phylogenetic analysis and inferred with Mega 5.0 program, using the Tamura 3-parameters model.

Especie	<i>T. radiata</i> H1	<i>T. radiata</i> H2	<i>T. triozae</i>
<i>T. radiata</i> H1	0.000	0.005	0.112
<i>T. radiata</i> H2	0.005	0.000	0.112
<i>T. triozae</i>	0.112	0.112	0.000

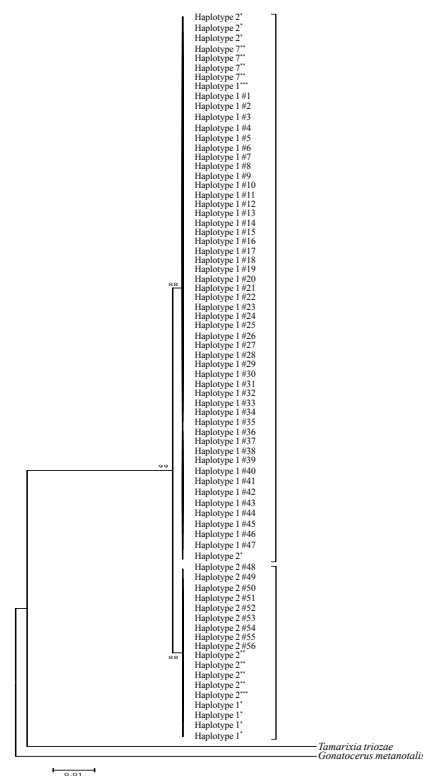


Figura 2. Árbol de Neighbor-Joining elaborado con los haplotipos de *Tamarixia radiata* encontrados en el estado de Tamaulipas, México. Junto a cada rama se encuentra el valor bootstrap de 1 000 réplicas.
Figure 2. Neighbor-Joining tree of *Tamarixia radiata* haplotypes found in the state of Tamaulipas, Mexico. Next to each branch is the bootstrap value of 1 000 replicates.

En la red de haplotipos (Figura 3) las diferencias nucleotídicas o mutaciones se encuentran representadas por líneas y algunos haplotipos hipotéticos derivados de las diferencias mutacionales se encuentran representados por puntos negros; los haplotipos existentes se encuentran delimitados por los círculos blancos. En la red se demuestra que posiblemente la mayoría de los haplotipos encontrados en América descienden del H1, con excepción del H5 de De León and Setamou (2010) que se encuentra totalmente aislado. Los cambios nucleotídicos separan al H2 del resto y lo ubican en un grupo formado con los haplotipos H3 de Barr *et al.* (2009) y H1 de De León and Setamou (2010) encontrados hasta el momento solo en Florida. Al igual que H2, el H6 de Barr *et al.* (2009) encontrado en Isla Guadeloupe y Puerto Rico se encuentra separado.

Además de inferir las relaciones filogenéticas de los haplotipos, se realizó una comparación cronológica de su orden de aparición en México y Estados Unidos de América basada en el año de recolecta de los ejemplares y publicación de la información, la cual se muestra a continuación (Barr *et al.*, 2009; De León and Setamou, 2010; González-Hernández *et al.*, 2010a, b) (Cuadro 4).

sister species, while the genetic distance between haplotypes 1 and 2 was 0.005 (differences per site). The genetic distance between *T. radiata* haplotypes was reflected in the phylogenetic tree (Table 3), which allows haplotypes separation in different branches. Numbers in the tree distinguish the samples from Güémez (# 2, 3, 21, 22, 55, 56), Hidalgo (# 1, 4-6, 11-14, 38-47), Matamoros (# 28-32, 35-37), Reynosa (# 34, 48), San Fernando (# 33) and Victoria (# 7-10, 15-19, 23-27, 49-54) (Figure 2).

In the haplotype network (Figure 3) nucleotide differences or mutations are represented by lines and some hypothetical haplotypes derived from mutational differences are represented by black dots, existing haplotypes are defined by the white circles. The network shows that possibly most haplotypes found in America descend from H1, except H5 from De Leon and Setamou (2010) which is fully isolated. The nucleotide changes separate H2 from the rest and place it in a cluster formed with H3 haplotypes from Barr *et al.* (2009) and H1 from De León and Setamou (2010) found only in Florida so far. Like H2, H6 from Barr *et al.* (2009) found in Guadeloupe Island and Puerto Rico is located separately.

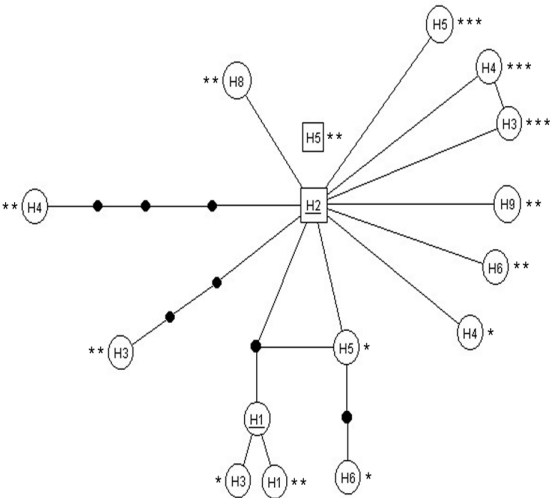


Figura 3. Red de haplotipos generada mediante un análisis de parsimonia estadística con los haplotipos encontrados en las muestras de Tamaulipas. En la red se distinguen los haplotipos registrados en América por Barr *et al.*, 2009*; De León and Setamou, 2010**; González-Hernández *et al.*, 2010a, b***. Cabe destacar que los haplotipos H1 y H2 del presente estudio se encuentran subrayados y son idénticos a los respectivos haplotipos H2, H1 de Barr *et al.* (2009), H7, H2 de De León and Setamou (2010) y H1, H2 de González-Hernández *et al.* (2010a, b); por esta razón en la red sólo aparece un representante H1 y H2. El resto de los haplotipos conserva el nombre original otorgado por los autores(as) antes citados(as).

Figure 3. Haplotype network generated by a statistical parsimony analysis of the haplotypes found in samples of Tamaulipas. In the network, haplotypes recorded in America by Barr *et al.*, 2009*, De León and Setamou, 2010**, and González-Hernández *et al.*, 2010a,b*** are distinguished. Notably, the H1 and H2 haplotypes of the present study are underlined and are identical to the respective haplotypes H2, H1 from Barr *et al.* (2009), H7, H2 from De León and Setamou (2010) and H1, H2 from González-Hernández *et al.* (2010a, b), for that reason, in the network there is only one representative of H1 and H2. The remaining haplotypes retains the original name given by the author (s) mentioned above (as).

Cuadro 4. Cuadro cronológico de las localidades y años de recolecta de los haplotipos H1 y H2 de *T. radiata* en México y EE. UU. Los haplotipos se detectaron en las posiciones nucleotídicas 43/399 del alineamiento.

Table 4. Chronological table of localities and collection years of *T. radiata* H1 and H2 haplotypes in Mexico and USA. The haplotypes were detected at nucleotide positions 43/399 of the alignment.

Año de colecta	Investigador(a)	Localidad	Haplotype	
			1 (T/G)	2 (C/T)
2004	Barr <i>et al.</i> , 2009	Florida, EE. UU.		✓
2006	Barr <i>et al.</i> , 2009	Florida, EE. UU.	✓	✓
	De León and Setamou, 2010	Texas, EE. UU.	✓	
	Peña-Carrillo, 2012	Güémez, Tamps, Méx.	✓	✓
		Hidalgo, Tamps, Méx.	✓	
2007	Barr <i>et al.</i> , 2009	Florida, EE. UU.		✓
	De León and Setamou, 2010	Sonora, Méx.	✓	
	González-Hernández <i>et al.</i> , 2010	Sinaloa, Méx.		
	Peña-Carrillo, 2012	Sonora, Méx.	✓	
		Hidalgo, Tamps, Méx.	✓	
		Victoria, Tamps, Méx.		✓
2008	Barr <i>et al.</i> , 2009	Cepas de laboratorio-China, Florida, EE. UU.		✓
		Cepa de laboratorio-Taiwán, Vietnam, Texas, EE. UU.		✓
		Texas, EE. UU.	✓	
	González-Hernández <i>et al.</i> , 2010	Colima, Méx.	✓	
		Michoacán, Méx.	✓	

Cuadro 4. Cuadro cronológico de las localidades y años de recolecta de los haplotipos H1 y H2 de *T. radiata* en México y EE. UU. Los haplotipos se detectaron en las posiciones nucleotídicas 43/399 del alineamiento (Cotinuación).**Table 4. Chronological table of localities and collection years of *T. radiata* H1 and H2 haplotypes in Mexico and USA. The haplotypes were detected at nucleotide positions 43/399 of the alignment (Cotinuación).**

Año de colecta	Investigador(a)	Localidad	Haplotipo	
			1 (T/G)	2 (C/T)
2009	González-Hernández <i>et al.</i> , 2010	Nuevo León, Méx.	✓	
		Yucatán, Méx.	✓	
2010	Peña-Carrillo, 2012	Nuevo León, Méx.	✓	
	De León y Setamou, 2010	Florida, E.U.A.		✓
	González-Hernández <i>et al.</i> , 2010a	Campeche, Méx.	✓	
		Oaxaca, Méx.	✓	
		Quintana Roo, Méx. Victoria,	✓	
		Tamps., Méx.	✓	
		Veracruz, Méx.	✓	
		Yucatán, Méx.	✓	
	González-Hernández <i>et al.</i> , 2010b	Yucatán, Méx.	✓	✓
	Peña-Carrillo, 2012	Colima, Méx.	✓	
		Victoria, Tamps, Méx.	✓	
2011	Peña-Carrillo, 2012	Hidalgo, Tamps, Méx.	✓	
2013	Peña-Carrillo <i>et al.</i> , 2013	Matamoros, Tamps, Méx.	✓	
		Reynosa, Tamps, Méx.	✓	
		San Fernando, Tamps, Méx.	✓	

Discusión

Aun cuando la presencia de *Tamarixia* sp. en territorio del estado de Tamaulipas se remonte al año 2003 (Coronado-Blanco *et al.*, 2003), el primer informe de haplotipos de la especie en dicha región se realizó a partir de muestras del año 2010 (González-Hernández *et al.*, 2010a), donde solo se indicó la presencia del H1. Con el presente estudio, ahora se enfatiza la presencia y persistencia del H2 en Tamaulipas, al encontrarlo en muestras recolectadas durante los años 2006, 2007, 2010 y 2013 (Cuadros 1, 4). Las muestras del año 2006 representan los registros de haplotipos más antiguos hasta el momento para México, y se centran en Tamaulipas. Al comparar la distribución del H2 en el estado y diversas áreas de EE. UU., es posible considerar una ruta probable de entrada al país.

De acuerdo a los primeros informes del H2 en el Continente Americano, éste se encontró en muestras de Florida (EE. UU.) de 2004 (Barr *et al.*, 2009) y posteriormente en Texas, EE.UU., y México (Güemez, Tamalipas) en el 2006 (De León y Setamou, 2010), en 2007 se encontró en los municipios de Güemez y Victoria, Tamaulipas., y en 2013

In addition to inferring phylogenetic relationships of haplotypes, a comparison was made on their chronological order of appearance in Mexico and the United States of America based on collection year of the individuals and publication of information, which is shown below (Barr *et al.*, 2009; De León and Setamou, 2010; González-Hernández *et al.*, 2010a, b) (Table 4).

Discussion

Even though the presence of *Tamarixia* sp., in territory of the Tamaulipas state dates back to 2003 (Coronado-Blanco *et al.*, 2003), the first report on this species haplotypes in this region was performed on samples from 2010 (González-Hernández *et al.* 2010a), where only the presence of H1 was indicated. In the present study, the presence and persistence of H2 is emphasized in Tamaulipas, found in samples collected during the years 2006, 2007, 2010 and 2013 (Tables 1, 4). Samples from 2006 represent the earliest records so far for haplotypes in Mexico, focused on Tamaulipas. Comparing the H2 distribution in the state and different areas in U.S.A. a probable route of entry may be considered.

en Reynosa, Tamaulipas (Figura 1). Al agrupar el H2 con haplotipos que hasta el momento solo se han encontrado en Florida, la posible historia evolutiva de los haplotipos que se encuentra representada en la red de parsimonia (Figura 3) apoya la idea de que Tamaulipas ha sido una entrada probable del parasitoide a México. Cabe destacar que a diferencia del H2, el resto de los haplotipos encontrados en México (H3, H4 y H5) por González-Hernández *et al.* (2010a) derivan directamente del H1, y solo los H3 y H4 se encuentran agrupados demostrando relaciones filogenéticas cercanas.

Además de la separación del H2, el hecho de haberlo encontrado con mayor frecuencia en Florida (Barr *et al.*, 2009), y que en México su distribución se ha limitado a los estados de Tamaulipas, y Yucatán, sugiere las posibles rutas de dispersión que ha mostrado el parasitoide desde el noreste y sureste del país. Además, es importante señalar que la distribución aparentemente localizada y persistente del H2 en Tamaulipas, podría estar asociada a condiciones microclimáticas o de nicho, determinantes para el desarrollo de las poblaciones en las que se encuentra dicho haplotipo (Rodríguez-Trelles *et al.*, 1998; Michalak *et al.*, 2001; Roslin *et al.*, 2009; McGaughan *et al.*, 2010). Estudios subsecuentes en los que se consideré un mayor número de muestras y áreas de colecta serán necesarios para evaluar estas hipótesis, así como el posible ensamblaje de los diferentes haplotipos en la región y su impacto en las poblaciones del vector del HLB.

According to the first reports of H2 in the Americas, it was found in samples from Florida (USA) in 2004 (Barr *et al.*, 2009) and later in Texas, USA, and Mexico (Güemez, Tamaulipas) in 2006 (De León and Setamou, 2010), was found in 2007 in the municipalities of Güemez and Victoria, Tamaulipas, and in 2013 in Reynosa, Tamaulipas (Figure 1). By clustering H2 with haplotypes only found in Florida so far, the possible evolutionary history of the haplotypes is represented in the parsimony network (Figure 3) supporting the idea that Tamaulipas has been a probable entry of the parasitoid to Mexico. Notably, unlike H2, the other haplotypes found in Mexico (H3, H4 and H5) by González-Hernández *et al.* (2010a) derive directly from H1, and only H3 and H4 are clustered showing close phylogenetic relationships.

In addition to the separation of H2, the fact of being found more frequently in Florida (Barr *et al.*, 2009), and its distribution in Mexico limited to the states of Tamaulipas and Yucatán, suggests possible dispersal routes shown by the parasitoid from the northeast and southeast. It must be noted that the H2 distribution, persistent and apparently located in Tamaulipas, may be associated with microclimatic conditions or niche, determining the development of populations containing this haplotype (Rodríguez-Trelles *et al.*, 1998; Michalak *et al.*, 2001; Roslin *et al.*, 2009; McGaughan *et al.*, 2010). Subsequent studies considering larger samples and collection areas will be needed to evaluate these hypotheses and the possible assembly of different haplotypes in the region and their impact on the HLB vector populations.

End of the English version

Agradecimientos

Los fondos para la realización de la presente investigación fueron provistos por el proyecto FONSEC SAGARPA-CONACYT número 2009-108591. Se agradece al M. C. Hugo Arredondo Bernal el habernos proporcionado ejemplares de *T. radiata*.

Literatura citada

- Barr, N. B.; Hall, D. G.; Weathersbee, A. A.; Nguyen, R.; Stansly, P.; Qureshi, J. A. and Flores, D. 2009. Comparison of laboratory colonies and field population of *Tamarixia radiata*, an ectoparasitoid of the Asian citrus psyllid, using ITS and COI DNA sequences. *J. Econ. Entomol.* 102(6):2325-2332.
- Bové, J. M. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *J. Plant Pathol.* 88:7-37.
- Cáceres, S. y Aguirre, M. R. A. 2005. Presencia de *Tamarixia radiata* (Waterston) (Hymenoptera: Eulophidae), parasitoide del psílido asiático *Diaphorina citri* Kuwayama (Sternorrhyncha: Hemiptera: Psyllidae) en cultivos cítricos de Corrientes. In: VI Congreso Argentino de Entomología, Tucumán, Argentina. 223 p.
- Chiu, S. C.; Auber, B. and Chien, C. C. 1988. Attempts to establish *Tetrastichus radiatus* Waterson (Hymenoptera: Chalcidoidea), a primary parasite of *Diaphorina citri* Kuwayama in Taiwan, Timmer, L. W.; Garnsey, S. M. and Navarro, L. (Eds.). Proceedings of the 10th. In: Conference of the International Organization of Citrus Virologists. International Organization of Citrus Virologists, University of California, Riverside, Ca., USA. 265-268 pp.
- Clement, M.; Posada, D. and Crandall, K. A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* 9:1657-1659.

- Coronado-Blanco, M. J.; Ruíz-Cancino, E.; Myartseva, S. N. y Gaona-García, G. 2003. *Tamarixia* sp. (Hymenoptera: Eulophidae), parasitoide del psílido asiático de los cítricos en Tamaulipas, México. In: XXVI Congreso Nacional de Control Biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico. Guadalajara, Jalisco, México. 71-73 pp.
- Da Graca, J. V. 1991. Citrus greening disease. Ann. Rev. Phytopathol. 29:109-136.
- Da Graca, J. V. and Korsten, L. 2004. Citrus Huanglongbing: review, present status and future strategies. Naqvi, S. A. M. H. (Ed.). In: diseases of fruits and vegetables. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. 1:229-245 pp.
- De León, J. H.; Logarzo, G. A. and Triapitsyn, S. V. 2008. Molecular characterization of *Gonatocerus tuberculifemur* (Ogloblin) (Hymenoptera: Mymaridae), a prospective *Homalodisca vitripennis* (Germa) (Hemiptera: Cicadellidae) biological control candidate agent from South America: divergent clades. Bull. Entomol. Res. 98(01):97-108.
- De León, J. H. and Setamou, M. 2010. Molecular evidence suggests that populations of the Asian citrus psyllid parasitoid *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) from Texas, Florida, and Mexico represent a single species. Ann. Entomol. Soc. Am. 103(1):100-110.
- Étienne, J. and Aubert, B. 1980. Biological control of psyllid vectors of greening disease on Reunion Island, In: proceedings of the 8th Conference, International Organization of Citrus Virologists. University of California, Riverside, Ca., USA. 118-121 pp.
- Étienne, J.; Quilici, S.; Marival, D. and Franck, A. 2001. Biological control of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Guadeloupe by imported *Tamarixia radiata* (Eulophidae). Fruits 56:307-315.
- French, J. V.; Kahlke, C. J. and Da Graca, J. V. 2001. First record of the Asian citrus psylla, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae), in Texas. Subtropical Plan Sci. 53:14-15.
- Gomez-Torres, M. L.; Nava, D. E.; Gravena, S.; Costa, V. A. and Parra J. R. P. 2006. Registro de *Tamarixia radiata* (Waterston) (Hymenoptera: Eulophidae) em *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em Sao Paulo, Brasil. Rev. Agric. (Piracicaba) 81:112-117.
- González, C.; Hernández, D.; Cabrera, R. I. y Tapia, J. R. 2005. *Diaphorina citri* Kuwayama, inventario y comportamiento de los enemigos naturales en la citricultura cubana. In: resúmenes de las sesiones orales. Taller sobre plagas emergentes de los cítricos. Instituto de Investigaciones de Cítricos y otros Frutales. La Habana. Cuba. 10 p.
- González-Hernández, A.; Arredondo-Bernal, H. C.; Robles-González, M.; Martínez-Carrillo, J. L.; Pérez, J. y López-Arroyo, J. I. 2009. Determinación de especies de parasitoides del psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) en México. Entomol. Mex. 8:373-377.
- González-Hernández, A.; Canales-Castillo, R.; López-Arroyo, J. I.; Villanueva-Segura, O. K.; Arredondo-Bernal, H. C. y Jasso-Argumedo, J. 2010a. Variabilidad morfológica y genética de *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae), parasitoide del psílido asiático de los cítricos en México. Sánchez-Martínez, R.; Miranda-Salcedo, M. A.; Muñoz-Flores, H. J.; Lara-Chávez, M. B. L. y Coria-Avalos, V. M. (Eds.) 2010. In: Memorias del XXXIII Congreso Nacional de Control Biológico. Uruapan, Michoacán, México. 259-267 pp.
- González-Hernández, A.; Jasso-Argumedo, J.; Cruz-García, R.; Lozano-Contreras, M.; López-Arroyo, J. I. y Villanueva-Segura, O. K. 2010b. Determinación de parasitoides y caracterización de haplotipos de *Tamarixia radiata* (Waterston) (Hymenoptera: Eulophidae), en *Diaphorina citri* en la Península de Yucatán, México. López-Arroyo, J. I.; González-Lauck, V. W. (Comp.). In: Memorias del 1^{er} Simposio Nacional sobre Investigación para el Manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México. Monterrey, Nuevo León, México. 259-267 pp.
- Halbert, S. E. and Manjunath, K. L. 2004. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. Florida Entomologist 87(3):330-353.
- Hoy, M. A.; Nguyen, R. and Jeyaprakash, A. 1999. Classical biological control of Asian citrus psylla. Release of *Tamarixia radiata*. Citrus Industry 80 (9): 20-22.
- Hoy, M. A. and Nguyen, R. 2000. Classical biological control of Asian citrus psylla. Citrus Industry 81(12):48-50.
- Kondo, T.; Quintero, Q. E. M.; Campuzano, M.; Wyckhuys, K. A. G. and Heraty, J. 2012. First report of *Tamarixia radiata* (Waterston) (Hymenoptera: Eulophidae), a parasitoid of the Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) in the department of Valle del Cauca, Colombia. Boletín del Museo de Entomología de la Universidad del Valle. 13(1):48-51.
- Lizondo, M. J.; Gastaminza, G.; Costa, V. A.; Augier, L.; Gómez-Torres, M. L.; Willink, E.; Parra J. R. P. 2007. Records of *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) in Northeastern Argentina. Revista Industrial y Agrícola de Tucumán. 84:21-22.
- McGaughan, A.; Convey, P.; Stevens, M. I.; Chown, S. L. 2010. Metabolic rate, genetic and microclimate variation among springtail populations from Sub-Antarctic Marion Island. Polar Biol. 33:909-918.
- Michalak, P.; Minkov, I.; Helin, A.; Lerman, D. N.; Bettencourt, B. R.; Feder, M. E.; Korol, A. B. and Nevo, E. 2001. Genetic evidence for adaptation-driven incipient speciation of *Drosophila melanogaster* along a microclimatic contrast in "Evolution Canyon", Israel. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 98(23):13195-13200.
- Peña-Carrillo, K. I. 2012. Variación morfológica y genética de *Tamarixia radiata* (Waterston) (Hymenoptera: Eulophidae) en los estados de Colima, Nuevo León, Tamaulipas y Michoacán, México. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. 75 p.
- Pluke, R. W. H.; Quereshi, J. A. and Stansly, P. A. 2008. Citrus flushing patterns, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) populations and parasitism by *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) in Puerto Rico. Florida Entomologist. 91:36-42.
- Quilici, S. 1986. Rapport de visite a Maurice du 2 au 7 juin 1986. In: IRAT-Réunion, Institut de Recherches Agronomiques Tropicales, Réunion, France. 27 pp.
- Rodriguez-Trelles F. and Rodriguez, M. A. 1998. Rapid micro-evolution and loss of chromosomal diversity in *Drosophila* in response to climate warming. Evol. Ecol. 12:829-838.

- Roslin, T.; Avomaa, T.; Leonard, T.; Luoto, M. and Ovaskainen, O. 2009. Some like it hot: microclimatic variation affects the abundance and movements of a critically endangered dung beetle. *Insect Conservation and Diversity*. 2:232-241.
- Simon, C.; Frati, F.; Bechenbach, A.; Crespi, B.; Liu, H. and Flook, P. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87:651-701.
- Skelley, L. H. and Hoy, M. A. 2004. A synchronous rearing method for the Asian citrus psyllid and its parasitoids in quarantine. *Biological Control*. 26:14-23.
- Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M. and Kumar, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28(10):2731-2739.