

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



ENEMIGOS NATURALES ASOCIADOS AL BARRENADOR DE RAMAS
DEL AGUACATE *Copturus aguacatae* (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)
EN TINGÜINDÍN, MICHOACÁN

TESIS

Que presenta JOSÉ ELEAZAR GÓMEZ PALACIOS
Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

Saltillo, Coahuila

Junio 2017

ENEMIGOS NATURALES ASOCIADOS AL BARRENADOR DE RAMAS
DEL AGUACATE *Copturus aguacatae* (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)
EN TINGÜINDÍN, MICHOACÁN

Tesis


Elaborada por JOSÉ ELEAZAR GÓMEZ PALACIOS como requisito parcial
para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Parasitología Agrícola con
la supervisión y aprobación del Comité de Asesoría



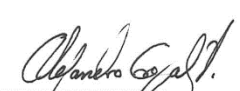
Dr. Gabriel Gallegos Morales
Asesor principal



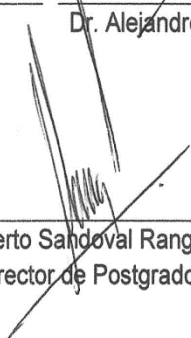
Dr. Oswaldo García Martínez
Asesor



Dr. Claudio Rios Velasco
Asesor



Dr. Alejandro González Hernández
Asesor



Dr. Alberto Sandoval Rangel
Subdirector de Postgrado

Saltillo, Coahuila

Junio 2017

Agradecimientos

A nuestra *ALMA TERRA MATER*, por apoyar y financiar durante el desarrollo y culminación del proyecto de investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante mis estudios de maestría.

A la Junta Local de Sanidad Vegetal de Sanidad Vegetal Gral. Francisco J. Mujica (JLSV) de Tingüindín, Michoacán por su gran el apoyo y colaboración.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo C.I.A.D.A.C) por la asesoría y apoyo para la caracterización molecular de material biológico.

Al Dr. Gabriel Gallegos Morales por su apoyo, asesoría y revisión de este proyecto de investigación, por sus enseñanzas y su gran amistad durante este tiempo.

Al Dr. Oswaldo García Martínez su asesoría, sus enseñanzas, conocimientos compartidos para la culminación de este trabajo y sobre todo por gran amistad.

Al Dr. Claudio Rios Velasco por su amistad y sensoria en la realización, revisión y culminación de este proyecto.

Al Dr. Alejandro González Hernández por su apoyo y disponibilidad en la identificación taxonómica de material Biológico.

Agradecemos profundamente al PhD. Christer Hansson (Department of Zoology, Lund University, Sweden) por su valiosa colaboración en corroborar la identificación de parasitoides.

A mis compañeros y amigos de la universidad por su apoyo en momentos difíciles durante mis estudios.

Dedicatorias

A MIS PADRES: José Gómez Naranjo y Eva Palacios Araiza. Por darme la vida, educación, apoyo moral, sobre todo por compartir sus conocimientos y valores, son mi razón de ser.

A MIS ABUELOS: Andrés Gomez García†, Juliana Naranjo Martínez, Jose Palacios Araujo† e Isabel Araiza†. Por sus enseñanzas, consejos, que fueron y siguen siendo inspiración en mi desarrollo profesional.

A MIS HERMANOS: Salvador, Samuel, Ma. Elena, Rosalina, J. Alfredo J. Guadalupe y Javier; Que han sido mi fortaleza en el logro de mis metas aun en la adversidad de la vida.

A mi prima Ma. Del Carmen Gómez García, que ha sido como mi hermana y que me ha apoyado situaciones difíciles de mi vida.

A MIS SOBRINOS: Ana, Pedro, Fernando, J. Manuel, Andrea, Alejandra, Davidcito y Lalito. Con quien comparto este y muchos logros más de mi vida, los quiero mucho.

A Olga Yaneth Martínez Barrera por tu apoyo, cariño y comprensión durante la elaboración de este documento.

COMPENDIO

ENEMIGOS NATURALES ASOCIADOS AL BARRENADOR DE RAMAS
DEL AGUACATE *Copturus aguacatae* (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)
EN TINGÜINDÍN, MICHOACÁN

POR:

JOSÉ ELEAZAR GÓMEZ PALACIOS

MAESTRIA ENCIENCIAS
EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA. JUNIO DE 2017

Dr. GABRIEL GALLEGOS MORALES -ASESOR-

Palabras clave: Entomopatógenos, Parasitismo, Patogenicidad, *Euderus*, *Brasema*, *Metarhizium anisopliae*, *Metarhizium robertsii*.

El barrenador de troncos y ramas del aguacate *Copturus aguacatae* Kissinger, 1957 (Coleoptera: Curculionidae) es uno de los insectos plaga más importantes que afectan directamente al árbol (*Persea americana* Mill.) cv Hass. Para el control de este insecto se han empleado diferentes métodos que han sido poco efectivos, sin embargo estudios de enemigos naturales de *C. aguacatae* han sido limitados en la zona productora de aguacate del Municipio de Tingüindín, Michoacán. En este estudio se encontraron parasitoides de los géneros *Euderus* Haliday y *Brasema* Cameron pertenecientes a las familias Eulophidae y Eupelmidae, respectivamente, con porcentaje de parasitismo de $\geq 1.0\%$ a 16.0% . Se aislaron morfológicamente 28 aislamientos de ellos molecularmente 13 correspondieron a *M. anisopliae* y ocho a *M. robertsii*, cinco permanecieron como *Metarhizium* spp., y dos de *Beauveria* spp., de acuerdo con sus caracteres morfológicos. En pruebas de patogenicidad con ocho aislados de *M. anisopliae* y dos de *M. robertsii* provocaron una mortalidad $\geq 70\%$, considerados con características patogénicas favorables para ser utilizado en programas de control biológico para el control del barrenador de las ramas del aguacate.

ABSTRAC

NATURAL ENEMIES ASSOCIATED TO THE BORER OF BRANCHES OF
THE AVOCADO TREE, *Copturus aguacatae* (COLEOPTERA:
CURCULIONIDAE) IN TINGÜINDÍN, MICHOACÁN, MÉXICO

BY:

JOSÉ ELEAZAR GÓMEZ PALACIOS

MASTER IN SCIENCE IN AGRICULTURAL PARASITOLOGY
UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, JUNIO DE 2017.

DR. GABRIEL GALLEGOS MORALES –ADVISER–

Palabras clave: Entomopatógenos, Parasitismo, Patogenicidad, *Euderus*, *Brasema*, *Metarhizium anisopliae*, *Metarhizium robertsii*.

The borer of branches of the avocado tree, *Copturus aguacatae* Kissinger, 1957 (Coleoptera: Curculionidae) is one of the most important insect pests that directly affect the (*Persea americana* Mill.) cv. Hass tree. To control this insect, different methods have been used but they have been ineffective, however, studies of natural enemies of *C. aguacatae* have been limited in the avocado producing area of the Municipality of Tingüindín, Michoacán. In this study parasitoids of the genera *Euderus* Haliday and *Brasema* Cameron belonging to the Eulophidae and Eupelmidae families, respectively, with parasitism percentage of $\geq 1.0\%$ to 16.0% were found. Twenty-eight isolates of entomopathogenic fungi were isolated and morphologically and molecularly identified, 26 belonging to *Metarhizium* genus, 13 corresponding to *M. anisopliae* and eight to *M. robertsii*, five remaining as *Metarhizium* spp., and two corresponding to *Beauveria* spp., according to their morphological characters. Pathogenicity tests with eight isolates of *M. anisopliae* and two *M. robertsii* caused a mortality $\geq 70\%$, considered with favorable pathogenic characteristics to be used in biological control programs of borer of avocado tree.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURA	ix
ÍNDICE APÉNDICE	x
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LITERATURA	2
Cultivo del Aguacate	2
Taxonomía del Aguacate	2
Descripción Botánica del Aguacate	2
Razas Botánicas	3
Cultivares	3
Enfermedades	4
Plagas Cuarentenadas	4
Barrenador de Ramas del Aguacate <i>Copturus aguacatae</i> Kissinger	4
Identificación Taxonómica de <i>C. aguacatae</i> Kissinger (Kissinger, 1957).	5
Etología de <i>C. aguacatae</i>	5
Daños	5
Dinámica Poblacional	5
Métodos de Control	6
Hongos Entomopatógenos	6
ARTICULO 1	7
NATURAL ENEMIES ASSOCIATED TO THE BORER OF BRANCHES OF THE AVOCADO TREE, <i>Copturus aguacatae</i> (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) IN TINGÜINDÍN, MICHOACÁN, MÉXICO	7
CONCLUSIONES GENERALES	24
LITERATURA CITADA	25
APÉNDICE	29

ÍNDICE DE TABLAS

Table 1. Percentage of parasitism of <i>Copturus aguacatae</i> in the lower area of Tingüindín Michoacán in 2012 and 2013.	20
Table 2. Family, subfamily and genus of parasitoids associated with <i>Copturus aguacatae</i> larvae in Tinguindin, Michoacan in 2012 and 2013.....	20
Table 3. <i>Metarhizium</i> species isolated from soil in commercial avocado tree orchards of Tingüindín, Michoacán.	21
Table 4. Mortality rate of <i>Copturus aguacatae</i> on the tenth day after being treated with <i>Metarhizium</i> spp., under laboratory conditions.	23

ÍNDICE DE FIGURA

Figure 1. a) ♀ <i>Eudurus</i> sp. Dark brown body with metallic blue green chandeliers b) ♀ <i>Brasema</i> sp. completely shiny blue metallic body and ovipositor of equal length as head, thorax and abdomen together.	21
Figure 2. Macroscopic growth of <i>Metarhizium</i> spp., in PDA culture medium. (a-b) formation of aerial mycelium and growth in concentric rings of <i>Metarhizium anisopliae</i> . (c-d) growth and uniform sporulation of <i>Metarhizium robertsii</i>	22
Figure 3. Phylogenetic analysis with the UPGMA algorithm method of <i>Metarhizium</i> species at 1,000 replicates.	23

ÍNDICE APÉNDICE

Apéndice 1. Hongos entomopatógenos infectando adultos y larvas de <i>C. aguacatae</i> : A) adulto micosado por <i>Beauveria</i> sp. B-D) adulto y larva micosados por <i>M. anisopliae</i> en diferentes etapas de desarrollo fúngico.....	29
Apéndice 2. Parasitoides de <i>C. aguacatae</i> en diferente estadio: A) parasitoide emergiendo de larva del barrenador. B) larva de parasitoide emergiendo de un subimago. C-D) pupa del parasitoide del barrenador de las ramas.	30
Apéndice 3. Parasitismo natural del barrenador de las ramas del aguacate <i>C. aguacatae</i> en Tingüindín, Michoacán en 2012 y 2013.	31
Apéndice 4. Saprofitos asociados a momias de <i>C. aguacatae</i> : A-B) <i>Fusarium</i> sp. C-D) Nematodo saprofito.....	32

INTRODUCCIÓN

México es el principal productor de aguacate del mundo con una producción total de 1.87 millones de ton destacando Michoacán, Jalisco, Estado de México y Nayarit. Michoacán ocupa el primer lugar de producción nacional con 1.45 millones de ton de las cuales el 50% se exporta a los Estados Unidos de América (SIAP-SAGARPA 2016). En la actualidad California (E.U.A), Israel, México y Sudáfrica han desarrollado programas de mejoramiento genético de al menos 500 cultivares (cv) Brooks y Olmo (1972); Lahav y Gazit (1994), destacando por sus características los cv Hass y Fuerte, siendo Hass de mayor importancia en México y el mundo (Barrientos *et al.*, 2007).

Existen factores que limitan la producción y longevidad del árbol de aguacate destacando las plagas y enfermedades; las enfermedades causadas por hongos fitopatógenos *Glomerella cingulata*, roña del fruto *Sphaceloma perseae* y la tristeza del aguacatero *Phytophthora cinamomi* (Rodríguez 1982; Téliz *et al.*, 2007; Dreistadt 2008). La presencia de las plagas cuarentenarias del aguacatero tales como el barrenador de ramas *Copturus aguacatae* (Coleoptera: Curculionidae), son limitante para la producción, movilización, comercialización nacional y exportación del aguacate a los Estados Unidos de América. Para el control de este insecto se han utilizado insecticidas químicos, prácticas culturales y regulación normativa (NOM-066-FITO 2002; USDA-APHIS 2011), que han sido poco efectivas, debido a la etología del barrenador, sin embargo estudios de parasitoides como enemigos naturales Huerta *et al.* (1990); Hernández *et al.* (2009); De Dios-Ávila *et al.* (2016) y la evaluación de nematodos entomopatógenos Huerta *et al.* (1990) y Sánchez *et al.* (2012) para el control biológico de *C. aguacatae* han demostrado buenos resultados a nivel experimental. Dada la importancia que tiene el barrenador de las ramas del aguacate en el país como plaga de importancia cuarentenaria y el potencial del control biológico como estrategia complementaria en los esquemas de manejo integrado de plagas en la región aguacatera del estado de Michoacán, se planteó como objetivo: estudiar e identificar los enemigos naturales de *C. aguacatae* en huertos comerciales del municipio de Tingüindín, Michoacán, con potencial para ser usados como posibles agentes de control biológico.

REVISIÓN DE LITERATURA

Cultivo del Aguacate

El aguacate (*Persea americana* Mill) es una de 85 especies del género *Persea* originaria de regiones tropicales y subtropicales de Centroamérica y México Williams (1977); Rodríguez (1982); Bergh, y Ellstrand (1986); Barrientos *et al* (2007) de importancia económica, caracterizadas en tres razas botánicas: Mexicana, Guatemalteca y Antillana (Bergh y Ellstrand 1986). La domesticación del aguacate ocurrió hace aproximadamente 7,000 a 9,000 años en Mesoamérica y con el intercambio comercial entre diferentes civilizaciones se distribuyó y adaptó a diferentes partes del continente (Smith 1966; Campos y López 2005).

Taxonomía del Aguacate

Clasificación del aguacate mexicano *Persea americana* Mill. var. *drymifolia* (USDA-PLANTS 2017)

Reyno: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Magnoliidae

Orden: Laurales

Familia: Lauraceae

Género: *Perseae*

Especie: *P. americana* Mill.

Descripción Botánica del Aguacate

Es un árbol perene de raíz superficial, tallo aéreo (epigeo), leñoso de crecimiento y desarrollo variado perenefolio, ramas quebradizas y sensibles a quemaduras por la radiación directa del sol, altura de 10 a 12 m dependiendo de la variedad o genotipo, posee flores hermafroditas agrupadas en una panícula. El fruto es una baya de forma variada; periforme, esférica u ovalada de color verde, violáceo a rojizo que posee un pericarpio delgado, grueso o

quebradizo, mesocarpio carnoso de hueso o semilla adherida o separada de este (Rodríguez 1982).

Razas Botánicas

Actualmente el aguacate se clasificado en tres razas botánicas: Mexicana, Guatemalteca y Antillana (Bergh y Ellstrand 1986). Sin embargo existe un genotipo de aguacate endémico de Costa Rica considerada en Ben-Ya'cov *et al.* (1995) citado por Barrientos *et al.* (2007) como raza *Costaricensis* genéticamente equidistante de las tres razas botánicas. Barrientos *et al.* (2007) considera las siguientes características distintivas: raza Mexicana con resistencia a bajas temperaturas, adaptabilidad a alturas superiores a 2,000 msnm y clima semitropical a templado, Guatemalteca posee cascara del fruto gruesa, de clima subtropical, crece entre 1,000 y 2,000 msnm y raza Antillana que se adapta a menos de 1,000 msnm, sin características idénticas entre especies por lo que probablemente se originó de la raza Mexicana (Williams 1977).

Cultivares

En la actualidad dentro de los programas de mejoramiento genético del aguacate se encuentran California (E.U.A), Israel, México y Sudáfrica. Entre 1944 y 1970 se tenían un registro de 157 cultivares (cv) y para 1991 la presencia de 500 cv a nivel mundial (Brooks y Olmo 1972); Lahav y Gazit 1994) citados por Barrientos *et al.* (2007). Existen diversos cv en fase experimental y al menos 13 liberados comercialmente, destacando por sus características peculiares los cv Hass y Fuerte, siendo el Hass de mayor superficie sembrada en México y el mundo (Barrientos *et al.*, 2007).

El cv Hass se originó a partir de semilla en California por Rudolph G. Hass en 1920 y patentado en 1935 de progenitores desconocidos (Shepherd y Bender 2002). Presenta frutos de 170 a 350 g, de pulpa cremosa y sabor excelente, sin fibra, con 23.7% de contenido de aceite; cascara coriácea, rugosa, color purpura oscuro al madurar; semilla pequeña y adherida a la cavidad; de buena producción y puede mantener la fruta en el árbol durante algunos meses después de madurez fisiológica. Flores hermafroditas de tipo "A" de primera apertura como hembra por la mañana y segunda apertura como macho por la tarde del día siguiente y tipo "B" con primera apertura como hembra por la

tarde y segunda apertura como macho por la mañana (Rodríguez 1982; Barrientos *et al.*, 2007).

Enfermedades

Entre los factores que limitan la producción y longevidad del árbol de aguacate se encuentran las enfermedades, que pueden ser Biogénicas: causadas por microorganismos; hongos, bacterias, nematodos y las causadas por los virus y viroides; destacando la antracnosis causada por *Glomerella cingulata*, roña del fruto *Sphaceloma perseae* y la tristeza del aguacatero *Phytophthora cinamomi* (Rodríguez 1982; Téliz *et al.*, 2007; Dreistadt 2008) y Abiogénicas: causadas por condiciones ambientales adversas, como temperatura y deficiencia de nutrientes.

Plagas Cuarentenadas

De acuerdo la regulación normativa (NOM-066-FITO 2002 y USDA-APHIS 2011) la presencia de las plagas cuarentenarias del aguacatero tales como el barrenador pequeño del hueso *Conotrachelus aguacatae* y *C. perseae*; barrenador grande del hueso *Heilipus lauri*; barrenador de ramas *Copturus aguacatae* (Coleoptera: Curculionidae) y la palomilla barrenadora del hueso del aguacate *Stenomoma catenifer* (Lepidoptera: Elachistidae), son una limitante para la producción, movilización, comercialización nacional y exportación del aguacate a los Estados Unidos de América.

Barrenador de Ramas del Aguacate *Copturus aguacatae* Kissinger

Los adultos son de cuerpo robusto, color pardo rojizo; el abdomen densamente cubierto por escamas blancas (Kissinger, 1957). El macho es de una longitud aproximada de 4 mm por 1.8 mm de ancho y la hembra de 5.2 por 2 mm; el Rostrum fuertemente inclinado hacia la región ventral, ojos ovales y puntiagudos ventralmente, élitros alargados con el ápice redondeado (Bautista, 2006). Los huevos inicialmente son hialinos de 0.5 mm y se tornan de color gris claro al eclosionar. Las larvas son de tipo curculioniforme color blanco lechoso, capsula cefálica café claro. Las larvas de primer estadio miden de 1.2 a 4.9 mm de longitud, las de segundo varían de 5.3 a 7 mm, en tercer estadio de 7.4 a 9.4 mm, cuarto estadio 9.5 a 10.8 mm y en el quinto estadio las larvas llegan a medir de 10.9 a 12 mm (Equihua *et al.*, 2007).

Identificación Taxonómica de *C. aguacatae* Kissinger (Kissinger, 1957).

Clase: Insecta

Orden: Coleoptera

Familia: Curculionidae

Género: *Copturus*

Especie: *C. aguacatae* Kissinger

Etología de *C. aguacatae*

Los adultos del barrenador de las ramas son muy activos en días soleados donde se les observa sobre ramas con mayor incidencia de luz solar. Las hembras ovipositan en ramas terciarias del estrato medio del árbol Coria *et al.* (2007) y en infestaciones muy severas, troncos y rara vez frutos. El ciclo de vida de *C. aguacatae* se completa en 215 d con 2,262.39 unidades calor (u.c) y presenta solo una generación por año; los huevos eclosionan a partir de los 10 d, presenta cinco estadios larvales de 128 d, pupa con una duración de 21 d, un estadio de preimago de 24 d y como adulto 32 d (Coria *et al.*, 2007; Equihua *et al.*, 2007). En las zonas aguacateras del estado de Michoacán los adultos aparecen en junio cuando inicia la temporada de lluvias, con una actividad máxima de mediados de julio a mediados de septiembre (Equihua *et al.*, 2007)

Daños

El daño se inicia al momento que la hembra perfora la corteza de la rama para ovipositar. Después de eclosionar la larva al alimentarse hace una galería entre la corteza y tejido de conducción hasta alcanzar la medula media de la rama (Equihua *et al.*, 2007). El indicador más evidente de larvas y adultos sobre ramas infestadas es la presencia de sabia cristalizada de color blanco, y perforaciones en la superficie la corteza, ramas quebradizas por el viento, lluvia y pesos de la fruta.

Dinámica Poblacional

Aunque *C. aguacatae* es una plaga endémica de las zonas de producción de aguacate en México (Talavera y Padilla 2003; Engstrand *et al.*, 2010); se distribuye de forma agregada en altitudes $\geq 2,000$ msnm y de forma aleatoria en huertos de altitud $\leq 2,000$ msnm. Por lo tanto la densidad poblacional es

proporcional a la altitud y temperatura media predominante de la zona agroecológica (Coria *et al.*, 2007).

Métodos de Control

Para el control de este insecto se han utilizado insecticidas químicos, prácticas culturales y la regulación normativa (NOM-066-FITO 2002; USDA-APHIS 2011) que han sido poco efectivas, debido a la etología del barrenador que ocurre dentro de las ramas y troncos del árbol (Aguirre *et al.*, 2011). Se han realizado estudios de parasitoides como enemigos naturales Huerta *et al.* (1990); Hernández *et al.* (2009); De Dios-Ávila *et al.* (2016) y evaluación de nematodos entomopatógenos Huerta *et al.* (1990) y Sánchez *et al.* (2012) para el control biológico de *C. aguacatae* con buenos resultados a nivel experimental.

Hongos Entomopatógenos

Los géneros *Metarhizium* y *Beauveria* son de hongos entomopatógenos llamados comúnmente como muscardina verde y muscardina blanca, aislado frecuentemente de suelo y de un amplio rango de especies de insectos representados en diferentes órdenes. El complejo de *Metarhizium* se distinguen por la morfología de colonias, conidias y fiálides Barnett y Hunter, (1999), sin embargo se dificulta el reconocimiento entre especies por características morfológicas Crous *et al.* (2005); Rehner y Buckley, (2005); Tsui *et al.* (2006), en la actualidad es posible con el uso de marcadores moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) del rADN específica de las regiones de ITS , así como la secuenciación de estas para su comparación con las depositadas en GenBank (Driver *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2005). De esta manera el complejo de especies de *Metarhizium* son reconocidas en cuatro especies tipo como: *M. pingshaense*, *M. anisopliae*, *M. robertsii* y *M. brunneum* de distribución cosmopolita (Bischoff *et al.*, 2009).

ARTICULO 1

NATURAL ENEMIES ASSOCIATED TO THE BORER OF BRANCHES OF THE AVOCADO TREE, *Copturus aguacatae* (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) IN TINGÜINDÍN, MICHOACÁN, MÉXICO

¹José Eleazar Gómez-Palacios, ¹Gabriel Gallegos-Morales, ¹Oswaldo García-Martínez, ²Claudio Rios-Velasco and ³Alejandro González-Hernández.

¹Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, C.P. 25315 E-mail: ggalmor@uaaan.mx

²Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Campus Cuauhtémoc, Chihuahua, Av. Río Conchos S/N, Parque Industrial. C.P. 31570, Cuauhtémoc, Chihuahua, México.

³Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Av. Universidad s/n Ciudad Universitaria. San Nicolás de Los Garza, N. L., México.

Summary

The borer of branches of the avocado tree, *Copturus aguacatae* Kissinger, 1957 (Coleoptera: Curculionidae) is one of the most important insect pests that directly affect the (*Persea americana* Mill.) cv. Hass tree. To control this insect, different methods have been used but they have been ineffective, however, studies of natural enemies of *C. aguacatae* have been limited in the avocado producing area of the Municipality of Tingüindín, Michoacán. In this study parasitoids of the genera *Euderus* Haliday and *Brasema* Cameron belonging to the Eulophidae and Eupelmidae families, respectively, with parasitism percentage of $\geq 1.0\%$ to 16.0% were found. Twenty-eight isolates of entomopathogenic fungi were isolated and morphologically and molecularly identified, 26 belonging to *Metarhizium* genus, 13 corresponding to *M. anisopliae* and eight to *M. robertsii*, five remaining as *Metarhizium* spp., and two corresponding to *Beauveria* spp., according to their morphological characters. Pathogenicity tests with eight isolates of *M. anisopliae* and two *M. robertsii* caused a mortality $\geq 70\%$, considered with favorable pathogenic

characteristics to be used in biological control programs of borer of avocado tree.

Key words: Entomopathogens, Parasitism, Pathogenicity, *Euderus*, *Brasema*, *Metarhizium anisopliae*, *Metarhizium robertsii*.

INTRODUCTION

The trunk and branches borer of avocado tree *Copturus aguacatae* Kissinger, 1957 (Coleoptera: Curculionidae) is one of the most important insect pests that directly affect the (*Persea americana* Mill.) cv. Hass (Laurales: Lauraceae) tree, causing severe damage (Equihua *et al.*, 2007). This borer is endemic to the most important producing areas of Mexico (Talavera and Padilla 2003; Engstrand *et al.*, 2010). In the State of Michoacán has been reported its presence in all municipalities producing this fruit, except in Acuitzio (SAGARPA 2004). This borer destroys the middle medulla of the tissues of branches, which can subsequently be broken by wind, rain and fruit weight (Equihua *et al.*, 2007). For the control of this insect, chemical insecticides, cultural practices and normative regulation (NOM-066-FITO 2002; USDA-APHIS 2011) have been used, which have been ineffective due to the ethology of the borer, since part of its cycle occurs within the branches and trunks of the tree, reducing the efficiency of the insecticides used for its control; Its excessive use has had consequences on the environment, preventing the establishment and increased populations of beneficial organisms that regulate the populations of this borer. There are currently studies on natural enemies and evaluations of biological products; however, the information generated in this regard is limited. In the States of Puebla and Nayarit, México Huerta *et al.*, (1990), Hernández *et al.* (2009), De Dios-Ávila *et al.* (2016) have reported parasitoids that regulate borer populations naturally. Huerta *et al.* (1990), tested the entomopathogenic nematodes *Steinernema bibiones* and *Heterorhabditis heliothidis* and Sánchez *et al.* (2012) to *H. indica*, as control agents of *C. aguacatae* larvae with satisfactory results. Given the importance of the borer of the branches of avocado tree in this country and the potential of biological control as a complementary strategy in integrated pest management schemes in the avocado region of the State of Michoacán, the

aim was to study and identify natural enemies of *C. aguacatae* in commercial orchards of the Municipality of Tingüindín, Michoacán, with potential to be used as possible biological control agents.

MATERIAL AND METHODS

Field Collect and Laboratory Processing

Avocado tree branches were collected from commercial orchards ($\geq 50\%$) with *C. aguacatae* in the months of July, August, September and December 2012, and February-March 2013, in the municipality of Tingüindín, Michoacán, which is located in the geographical coordinates 19°44'19"N 102°28'56"W and at an altitude of 1,683 meters above sea level. Six trees/ha were selected randomly in different localities of the municipality; of each tree five segments of branches 30 cm long, 1.5 to 2.0 cm in diameter with indicators of the presence of the borer (crystallized sage, excreta and visible damage) were taken from the area with the highest incidence of sunlight, mainly in the stratum middle of the tree (NOM-066-FITO 2002).

The samples were transferred to the Department of Agricultural Parasitology (DAP) of the Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), where they were kept in a bioclimatic chamber at 20 ± 2 °C to keep them moist and turgid to allow the development of *C. aguacatae* larvae; the segments of branches were dissected at 20 ± 5 d after being cut and stored (optimal time of conservation of the vegetative material), to observe the presence of parasitoids and entomopathogens fungi of *C. aguacatae* inside the galleries and the number of larvae, pupae and adults. The larvae and pupae of parasitoids found inside the galleries were placed in Petri dishes with previously sterilized wet sawdust until adult emergence, which were individually preserved in 2 mL microtubes with 70% ethanol.

Preparation of Adult Specimens

The parasitoid specimens were sectioned (head, thorax, abdomen, antennae, anterior and posterior wings) and successively submerged in 5% KOH solution for 24 to 48 h, to decolor the chitinized sections except for the wings. After being discolored were washed with distilled water for 10-15 min with a piseta;

subsequently, they were dehydrated in ethanol at different concentrations (50, 70, 90 and 100%) for 10 to 15 min in each step; at the end of this process, were placed in clove oil to soften and finally fixed on slides and with a mixture of clove oil and balsam of Canada according to the techniques described by Noyes (1982) and Castro (1996) for micro-hymenopterans.

Taxonomic Identification of Parasitoids

For the morphological identification of the specimens a stereo microscope and an optical microscope (Leica brand, model DM/LS, Germany) were used; using the taxonomic keys of Yoshimoto (1971); Gibson (1995); Gibson (1997) and Schauff *et al.* (1997) for identification at the family, subfamily and genus levels; then, adults parasitoids were reviewed by Dr. Alejandro González Hernández (Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León) and sent to Dr. Christer Hansson (Department of Zoology, Lund University, Sweden) to confirmation.

The percentage of parasitism was calculated based on the number of parasitized borer larvae, divided between the total number of larvae collected multiplied by 100 (Pair *et al.*, 1986; Paiva and Parra 2012), using the formula: $RP = (Np/Nt) \times 100$. Where Np = number of parasitized individuals and Nt = total number of individuals collected.

Isolation of Entomopathogenic Fungi and Morphological Identification

Eighty soil samples of approximately 500 g c/u taken of the drip area of each tree were collected, as well as the sampling area sharing similar characteristics, 50% of the samples randomly selected were processed to isolate entomopathogenic fungi, according to the insect bait technique (Zimmermanin, 1986). For this purpose, 200 g of wet soil were placed into 250 mL containers, then five larvae of *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae) were deposited. The containers were incubated at 25 ± 2 ° C for 15 d; and were systematically examined every 24 h, until the larvae showed symptoms of fungal infection. The symptomatic larvae were disinfected with 1% sodium hypochlorite for 3 min and washed three times with sterile distilled water, dried on sterile filter paper and subsequently incubated in humid chambers at 25 ° C for 7-15 d to stimulate sporulation of fungi; subsequently,

these larvae were transferred to culture medium Potato Dextrose Agar (PDA) added with 1% soy broth for *Metarhizium* spp., and PDA supplemented with 2% V8 juice (vegetable juice) at pH 6.0 for *Beauveria* spp. The morphological identification of *Metarhizium* spp., and *Beauveria* sp., was performed according to their micro and macroscopic characters mainly by their typical reproduction structures such as colonies, phallids and conidia (Barnett and Hunter, 1999), assembled in slides, stained with lactophenol blue and observed at 400 and 1,000 magnifications in an optical microscope.

DNA extraction and Molecular Characterization of Entomopathogenic Fungi

The rDNA extraction was realized using young mycelium (7 d old) from purified cultures grown in PDA, macerated in a porcelain mortar, adding a buffer for the extraction of rDNA at 70 °C (200 mM Tris-HCl (pH = 8), 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS), according to the protocol described by Raeder and Broda (1985). The rDNA obtained was examined by electrophoresis on a 1% agarose gel, which was then used to amplify the 18S RNA Internal Transcript Spacer (ITS) with the universal primers ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') by PCR technique, the expected fragments for *Metarhizium* spp. were approximately 600 to 710 bp.

The PCR products were separated on a 1% agarose gel, stained with ethidium bromide and visualized under UV light. They were then sent to Company Macrogen (Maryland, USA) for sequencing. The sequences obtained were compared to the National Biotechnology Information Center (NBIC) database, using the BLAST algorithm (Altschul *et al.*, 1990) to determine the genus and species of fungal isolates.

Pathogenicity Tests

Conidial suspensions of ten *M. anisopliae* and two *M. robertsii* isolates were prepared in distilled water added with 0.1% Tween-80 (Mochi *et al.*, 2005). The number of conidia was determined under an inverse optical microscope (Olympus CKX41) with phase contrast at 1,000 magnifications using a Neubauer chamber (Blau Brand, Germany) and subsequently adjusted to a

concentration of 1×10^7 conidia/mL. To determine the pathogenicity of the isolates, a completely randomized design was used with 12 treatments: ten isolates of *M. anisopliae* and two of *M. robertsii*, considering 10 replicates per treatment and an absolute control with distilled water alone added with Tween-80 at 0.1 %. Considering the low availability of third and fourth instar larvae, a larva was considered as an experimental unit. The larvae of *C. aguacatae* were individually immersed into 50 mL of conidia suspensions (maintained under constant stirring) for 60 s and immediately placed on filter paper to remove excess suspension (Butt and Goettel, 2000 and Fhiser *et al.*, 2011) then placed individually into 25 mL plastic containers, previously conditioned with sterile sawdust from avocado wood provided as a substrate and food source, incubated at 25 ± 2 °C for 10 d and checked every 24 h, until complete mycosis or sporulation. Data were processed using an analysis of variance (ANOVA) of the statistical program (SAS Institute, 1999), and the means were separated by the Tukey's test ($P < 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

Percentage of Natural Parasitism

From 917 segments of dissected branches, 1,685 specimens of *C. aguacatae* (1,577 larvae, 20 pupae and 88 adults) were found. From which, 112 immature parasitoids (hymenopterans) were obtained; the percentage of parasitism varied in the different samples, $\geq 1.0\%$ to 16.0% (Table 1). A small number of parasitoid larvae emerged directly from larvae of *C. aguacatae*. In the absence of borer larvae, inside galleries, immature hymenopterans were found along with exuviae, cephalic capsules and mummified subimago of the borer.

Identification of Parasitoids Associated with *Copturus aguacatae*

Sixty seven percent of the specimens corresponded to the Eulophidae family (26♂ and 18♀) (Table 2), identified as *Euderus* sp. Haliday (Hymenoptera: Eulophidae) (Fig. 1a). This genus is easily recognized from other eulophids by the presence of three hairs lines radiating from the base of the stigmal and postmarginal vein of the anterior wing and presence of complete notauli. The

species of *Euderus* are similar to each other, in color patterns, size and general appearance, making it difficult to identify (Yoshimoto, 1971; Schauff *et al.*, 1997).

In addition Gibson *et al.* (2006) and Dossall *et al.* (2009) reported the species *Euderus glaucus* and *Euderus albitarsus* parasitizing *Ceutorhynchus obstrictus* (Marsham) (Coleoptera: Curculionidae) in Canada and USA, respectively. Huerta *et al.* (1990) reported to *Euderus* sp., parasitizing larvae of *C. aguacatae* in the State of Puebla, Mexico, an evidence that species of this genus specialize in parasitizing curculionids. On the other hand, Hernández *et al.* (2009) reported to *Urosigalphus avocadoae* Gibson (Hymenoptera: Braconidae) in the state of Mexico and De Dios-Ávila *et al.* (2016) to *Neocatolaccus tylodermae* Ashmead (Hymenoptera: Pteromalidae) in Nayarit, Mexico as natural enemies of *C. aguacatae*.

Twenty two (1♂ and 21♀) specimens of the parasitoid *Brasema* sp. Cameron (Hymenoptera: Eupelmidae) were found, parasitizing immature individuals of *C. aguacatae* in commercial orchards of avocado tree of Michoacán (Table 2). *Brasema* is a small genus of Eupelmidae family, with about 25 species described in North America and Northern Mexico, some were originally described within the genus *Eupelmus* (Gibson, 1995). However, Gibson, (2011) relocated 15 species of *Eupelmus* to *Brasema*. This genus is distinguished by a combination of the following features: tridentate mandibles, a mesotibial apical groove, mesotibial apical pegs above the tibial spur ventral to groove and absence of a syntergal flange (Gibson, 1995). *Brasema* species parasitize insects that develop inside plants (Hanson and Gauld, 1995), are mainly ectoparasites of lepidopteran and coleopteran larvae (Gibson *et al.*, 2006), also of hemipteran, mantis and orthopteran eggs (Gibson, 1995; Marchiori *et al.*, 2002). This genus is reported for the first time as a natural enemy of *C. aguacatae* larvae in Michoacan, Mexico in this study (Fig. 1. b).

The identification of species of *Metarhizium* based on their morphological characters is difficult due to their similarity (Crous *et al.*, 2005; Rehner and Buckley, 2005; Tsui *et al.*, 2006); However, it has been facilitated with molecular techniques (Driver *et al.*, 2000). Twenty-six isolates of *Metarhizium*

spp., and two of *Beauveria* sp. were identified morphologically, only 21 isolates of *Metarhizium* were molecularly characterized (Entz *et al.*, 2005). According to the comparison of their sequences in the BLAST GenBank database, 13 isolates corresponded to *M. anisopliae* and eight to *M. robertsii*, respectively (Table 3). Most isolates of entomopathogenic fungi isolated from soil in orchards of avocado tree corresponded to the genus *Metarhizium*. In studies of natural occurrence, Keller *et al.* (2003) mention that *M. anisopliae* is common in agricultural soils, similar to that found in this study; in contrast Bidochka *et al.* (1998) and Vänninen (1996) reported that they are less occurrence in forest soils, so that this characteristic gives *Metarhizium* a broad spectrum of development in disturbed ecological environments unlike *Beauveria* species, which is more common in forest soils. According to the dendrogram based on the ITS sequences, the isolates were associated in four phylogenetic groups, with *M. anisopliae* being more frequently present in groups one and four, *M. robertsii* within groups two and three (Fig. 3), although the isolates (TZ1, TG4, TG10, GS2, and XH2) belong to *M. robertsii* but genetically related to *M. anisopliae*, in accordance with Bischoff *et al.* (2009) who mention that *M. robertsii* is morphologically indistinguishable from *M. anisopliae* (Fig. 2), however, is molecularly differentiated by the position of its nucleotides. The 12 *Metarhizium* isolates tested in the study were pathogenic against *C. aguacatae* larvae, with a mortality of $\geq 70\%$, where eight of these reached 100% on the tenth day after inoculation. The TG11 and TG15 isolates being the ones that showed the lowest percentages of mortality, however, there was no significant difference ($P < 0.05$) between the mortality rates of isolates, but there was with respect to the control (Table 4). From the 4th d of inoculation mortality occurred in all treatments except in the control. However, after the sixth day, mycosis and sporulation typical of green muscardine caused by *Metarhizium* were observed. The species of this fungus are considered endophyte with evolutionary adaptations (Vega *et al.*, 2009), especially *M. robertsii* (Sasan and Bidochka, 2012), which are insect pathogens even in different habitats (Fisher *et al.*, 2011), contrasting with this study where *C. aguacatae* and the isolates of *M. anisopliae* and *M. robertsii* do not interact, however, the borer was susceptible to both *Metarhizium* species acting in different absolute media.

CONCLUSIONS

The association of *Brasema* genus as parasitoid of *C. aguacatae* immature is reported for the first time and is the first report for the state of Michoacán of the presence of *Eudurus* and *Brasema*, as natural enemies of *C. aguacatae* and native isolates of entomopathogenic fungi, belonging to *Metarhizium* and *Beauveria* genera. Some isolates of *M. anisopliae* and *M. robertsi* showed pathogenic characteristics desirable to be considered in programs of integrated management of the borer of the branches of the avocado tree.

ACKNOWLEDGMENTS

We are gratefully acknowledge the financial support from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONAYT), the Junta Local de Sanidad Vegetal (JLSV) Gral. Francisco J. Mújica personnel for their valuable help collecting Avocado tree branches, the Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro who financed of the research project and, we are grateful assistance in the molecular test at Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Campus Cuauhtémoc.

LITERATURE CITED

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215(3): 403-410.
- Barnett, H. L., & Hunter, B. B. 1999. *Illustrated genera of imperfect fungi*, 4th ed. The American Phytopathological Society. Pp. 218
- Bidochka, M. J., Kasperski, J. E., & Wild, G. A. 1998. Occurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soils from temperate and near-northern habitats. *Canadian Journal of Botany*. 76(7): 1198-1204.
- Bischoff, J. F., Rehner, S. A., & Humber, R. A. 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*. 101(4): 512-530.
- Butt, T. M., & Goettel, M.S. 2000. Bioassays of entomogenous fungi: 141–195. *In* Navon, A., & Ascher, K. R. S. (eds) *Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes*. CAB International, Wallingford, UK.

- Castro, L. 1996. Notas sobre la recogida y preparación de Himenópteros. Boletín de la SEA. 15: 47-52.
- Crous, P. W., Allegrucci, N., Arambarri, A. M., Cazau, M. C., Groenewald, J. Z., & Wingfield, M. J. 2005. *Dematiocladium celtidis* gen. sp. nov. (Nectriaceae, Hypocreales), a new genus from *Celtis* leaf litter in Argentina. Mycological Research. 109(07): 833-840.
- De Dios-Ávila, N., Cambero, C. J., Coronado, B. J. M., Carvajal, C. C., Rios, V. C. & Peña, S. G. 2016. Primer Registro de *Neocatolaccus tylodermae* Ashmead en México como Parasitoide de *Copturus aguacatae* Kissinger. Southwestern Entomologist. 41(4): 1203-1206.
- Dosdall, L. M., Gibson, G. A., Olfert, O. O., & Mason, P. G. 2009. Responses of Chalcidoidea (Hymenoptera) parasitoids to invasion of the cabbage seedpod weevil (Coleoptera: Curculionidae) in western Canada. Biological Invasions. 11(1): 109-125.
- Driver, F., Milner, R. J., & Trueman, J. W. 2000. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. Mycological Research. 104(02): 134-150.
- Engstrand, R. C., Cibrián Tovar, J., Cibrián-Jaramillo, A., Kolokotronis, S. O. 2010. Genetic variation in avocado stem weevils *Copturus aguacatae* (Coleoptera: Curculionidae) in Mexico. Mitochondrial DNA. 21: 38-43.
- Entz, S. C., Johnson, D. L., & Kawchuk, L. M. 2005. Development of a PCR-based diagnostic assay for the specific detection of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. Mycological Research. 109(11): 1302-1312.
- Equihua, M. A., Estrada, V. E., González, H. H., Gasca, C. L., Salinas, C. A., González, A. J., Mora, A. G., & Téliz, O. D. 2007. Plagas: 135-146. En: Téliz-Ortiz, D., Mora A., A. (Eds.). El aguacate y su manejo integrado. Mundi Prensa. México.
- Fisher, J. J., Rehner, S. A., & Bruck, D. J. 2011. Diversity of rhizosphere associated entomopathogenic fungi of perennial herbs, shrubs and coniferous trees. Journal of Invertebrate Pathology. 106(2): 289-295.
- Gibson, G. A. P. 1995. Parasitic wasps of the subfamily Eupelminae: Classification and revision of world genera (Hymenoptera:

- Chalcidoidea, Eupelmidae). *Memoirs on Entomology. International.* 5: 1-421.
- Gibson, G. A. P. 1997. Eupelmidae: 430- 476. In Gibson, G. A. P., Humber, J. T., & Woolley, J. B. (Eds.). *Annotated Keys to the Genera of Nearctic Chalcidoidea (Hymenoptera)*. National Research Council of Canada Monograph Publishing Program. Monograph Publishing Program, Ontario.
- Gibson, G. A. P. 2011: The species of *Eupelmus* (*Eupelmus*) Dalman and *Eupelmus* (*Episolindelia*) Girault (Hymenoptera: Eupelmidae) in North America north of Mexico. *Zootaxa.* 2951: 1-97.
- Gibson, G. A. P., Gates, M. W. & Buntin, G. D. 2006. Parasitoids (Hymenoptera: Chalcidoidea) of the cabbage seedpod weevil (Coleoptera: Curculionidae) in Georgia, USA. *Journal of Hymenoptera Research.* 15(2): 187–207.
- Hanson, P. E., & Gauld, I. D. 1995. The biology of Hymenoptera. *The Hymenoptera of Costa Rica.* 20-88.
- Hernández, F. L. M., Saavedra, A. M., Urías, L. M. A., y López, A. J. G. 2009. Registro de *Urosigalphus avocadoae* Gibson (Hymenoptera: Braconidae) como parasitoide de *Copturus aguacatae* Kissinger (Coleoptera: Curculionidae) en México. *Acta Zoológica Mexicana.* 25(3): 659-661.
- Huerta, D. P. A., Trujillo, J., Equihua, A., & Carrillo, J. 1990. Enemigos naturales y evaluación preliminar de dos nematodos para biocontrol de *Copturus aguacatae* (Coleoptera: Curculionidae). *Atlixco, Puebla, México. Agrociencia.* 1(3): 47-56.
- Keller, S., Kessler, P., & Schweizer, C. 2003. Distribution of insect pathogenic soil fungi in Switzerland with special reference to *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol.* 48(3): 307-319.
- Marchiori, C. H., Olivera, A. M. S., & Costa, M. C. R. 2002. Primeiro registro de ocorrência do parasitoide *Brasema* sp. (Hymenoptera: Eupelmidae) em ovos de *Leptoglossus zonatus* (Dallas, 1852) (Hemiptera: Coreidae) no Brasil. *Ciência Rural.* 32 (6): 1067-1068.
- Mochi, D. A., Monteiro, A. C., & Barbosa, J. C. 2005. Action of pesticides to *Metarhizium anisopliae* in soil. *Neotropical Entomology.* 34(6): 961-971.

- NOM-066-FITO-2002. 2002. Especificaciones para el manejo fitosanitario y movilización del aguacate. [En línea, diciembre, 2016]. <http://www.senasica.gob.mx/?doc=696>
- Noyes, J. S. 1982. Collecting and preserving chalcid wasps (Hymenoptera: Chalcidoidea). *Journal of Natural History*. 16(3): 315-334.
- Pair, S. D., Raulston. J. R., Sparks. A. N., & Martin P. B. 1986. Fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) parasitoids: differential spring distribution and incidence on corn and sorghum in the Southern United States and Northeastern México. *Environmental Entomology*. 15(2): 342-348.
- Paiva, P. E. B., & Parra, J. R. P. 2012. Natural parasitism of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) nymphs by *Tamarixia radiata* Waterston (Hymenoptera: Eulophidae) in São Paulo orange groves. *Revista Brasileira de Entomologia*. 56(4): 499-503.
- Raeder, U., & Broda, P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*. 1(1): 17-20.
- Rehner, S. A., & Buckley, E. 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia*. 97(1): 84-98.
- SAGARPA. 2004. Acuerdo. Por el que se declara como zona libre del Barrenador grande del hueso del aguacate (*Heilipus lauri*), Barrenador pequeño del hueso del aguacate (*Conotrachelus aguacatae* y *C. perseae*), Palomilla Barrenadora del hueso (*Stenomoma catenifer*) y del barrenador de ramas (*Copturus aguacatae*), al Municipio de Acuitzio, Michoacán. 2.
- Sánchez, S. M. G., Cortez. M. H., & Ochoa E. S. 2012. Parasitismo de larvas de *Copturus aguacatae* (Coleoptera: Curculionidae) por *Heterorhabditis indica* (Rhabditida: Heterorhabditidae) en laboratorio. *Revista Colombiana de Entomología*. 38(2): 200-207.
- SAS Institute. 1999. The SAS Statistical System, Version 8. SAS Institute, Cary, NC.
- Sasan, R. K., & Bidochka, M. J. 2012. The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. *American Journal of Botany*. 99(1): 101-107.

- Schauff, M. E., Lasalle, J., & Coote, L. D. 1997. Eulophidae: 327-429. *In* Gibson, G. A. P., Huber, J. T., & Woolley, J. B. (eds.). Annotated Keys to the Genera of Nearctic Chalcidoidea (Hymenoptera). National Research Council of Canada Monograph Publishing Program, Ontario.
- Talavera, C. M., & Padilla, C. M. 2003. Reconsideraciones técnicas al ciclo biológico del barrenador de ramas del aguacate (*Copturus aguacatae*, Kissinger). Proceedings V World Avocado Congress. 445-448.
- Tsui, C. K., Sivichai, S., & Berbee, M. L. 2006. Molecular systematics of *Helicoma*, *Helicomycetes* and *Helicosporium* and their teleomorphs inferred from rDNA sequences. *Mycologia*. 98(1): 94-104.
- USDA-APHIS. 2011. Plan de Trabajo para la Exportación de Aguacate HASS de México a los Estados Unidos de Norte América. Pp. 32.
- Vänninen, I. 1996. Distribution and occurrence of four entomopathogenic fungi in Finland: effect of geographical location, habitat type and soil type. *Mycological Research*. 100(1): 93-101.
- Vega, F.E., Goettel, M.S., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M.A., Keller, S., Koike, M., Maniania, N.K., Monzon, A., Ownley, B.H., Pell, J.K., Rangel, E.E.N., & Roy, H.E. 2009. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecology*. 2(4): 149–159.
- Yoshimoto, C. M. 1971. Revision of the genus *Euderus* of America north of México (Hymenoptera: Eulophidae). *The Canadian Entomologist*. 103(04): 541-578.
- Zimmerman, G. 1986. The "Galleria bait method" for detection of entomopathogenic fungi in soil. *Journal of Applied Entomology*. 102: 213-215.

Table 1. Percentage of parasitism of *Copturus aguacatae* in the lower area of Tingüindín Michoacán in 2012 and 2013.

Date	MASL	Segments of the branches	C. <i>aguacatae</i>	# Total Parasitoids	Parasitism (%)
July-12	1,743	240	100	16	16.0
Aug.-12	1,747	202	171	15	8.8
Sept.-12	1,657	118	362	37	10.2
Dec.-12	1,751	116	303	13	4.3
Feb.-13	1,724	119	364	27	7.4
Mar.-13	1,731	122	385	4	1.0

MASL: Meters above sea level

Table 2. Family, subfamily and genus of parasitoids associated with *Copturus aguacatae* larvae in Tinguindin, Michoacan in 2012 and 2013.

Family	Subfamily	Genus	Proportion %	Emerged parasitoids	Sexo	
					♂	♀
Eulophidae	Euderinae	<i>Euderus</i> sp.	67	44	26	18
Eupelmidae	Eupelminae	<i>Brasema</i> sp.	33	22	1	21



Figure 1. a) ♀ *Eudurus* sp. Dark brown body with metallic blue green chandeliers b) ♀ *Brasema* sp. completely shiny blue metallic body and ovipositor of equal length as head, thorax and abdomen together.

Table 3. *Metarhizium* species isolated from soil in commercial avocado tree orchards of Tingüindín, Michoacán.

Isolated	Morphological identification	Molecular identification	Coordinates	GenBank		
				Maximum score	% Similarity	ITS Sequence
TG7	<i>Metarhizium</i> sp.	<i>Metarhizium robertsii</i>	19°43'53.8" N 102°30'12.2" W	989	99	KU983799
TG8	<i>Metarhizium</i> sp.	<i>Metarhizium anisopliae</i>	19°43'51.5" N 102°30'04.1" W	595	87	FJ545310
TG1	<i>Metarhizium</i> sp.	<i>Metarhizium anisopliae</i>	19°43'53.7" N 102°30'16.4" W	987	99	FJ545279
TG15	<i>Metarhizium</i> sp.	<i>Metarhizium anisopliae</i>	19°43'50.7" N 102°30'06.1" W	983	99	FJ545279
ES7	<i>Metarhizium</i> sp.	<i>Metarhizium anisopliae</i>	19°42'40.1" N 102°28'28.5" W	972	100	FJ177473
ES1	<i>Metarhizium</i> sp.	<i>Metarhizium anisopliae</i>	19°42'37.4" N 102°28'33.2" W	985	99	FJ545279
TZ1	<i>Metarhizium</i> sp.	<i>Metarhizium robertsii</i>	19°46'15.7" N 102°34'02.0" W	985	99	KU983799
TZ5	<i>Metarhizium</i> sp.	<i>Metarhizium anisopliae</i>	19°45'06.9" N 102°33'43.5" W	972	99	FJ545279
TZ10	<i>Metarhizium</i> sp.	<i>Metarhizium anisopliae</i>	19°45'50.4" N 102°33'22.9" W	977	99	FJ545279
GS2	<i>Metarhizium</i> sp.	<i>Metarhizium robertsii</i>	19°46'56.1" N 102°30'18.2" W	990	99	KU983799
TG10	<i>Metarhizium</i> sp.	<i>Metarhizium robertsii</i>	19°43'54.6" N 102°30'15.5" W	992	99	KU983799
CQ1	<i>Metarhizium</i> sp.	<i>Metarhizium robertsii</i>	19°41'58.4" N 102°27'25.8" W	985	99	KU983799
XH4	<i>Metarhizium</i> sp.	<i>Metarhizium anisopliae</i>	19°41'59.4" N 102°26'46.3" W	990	99	FJ545279
TG3	<i>Metarhizium</i> sp.	<i>Metarhizium anisopliae</i>	19°43'51.8" N 102°30'05.6" W	981	99	FJ545279
TG13	<i>Metarhizium</i> sp.	<i>Metarhizium anisopliae</i>	19°43'50.7" N 102°30'06.1" W	972	99	KM117232
TG16	<i>Metarhizium</i> sp.	<i>Metarhizium robertsii</i>	19°43'50.3" N 102°30'5.9" W	966	99	KU983799
TG11	<i>Metarhizium</i> sp.	<i>Metarhizium anisopliae</i>	19°43'54.5" N 102°30'1.4" W	968	99	FJ177473
XH2	<i>Metarhizium</i> sp.	<i>Metarhizium robertsii</i>	19°41'39.0" N 102°25'57.9" W	981	99	KU983799
XH3	<i>Metarhizium</i> sp.	<i>Metarhizium anisopliae</i>	19°41'55.2" N 102°25'07.9" W	976	99	FJ177473
GS1	<i>Metarhizium</i> sp.	<i>Metarhizium anisopliae</i>	19°46'57.6" N 102°30'21.7" W	972	100	FJ177473

TG4	<i>Metarhizium</i> sp.	<i>Metarhizium robertsii</i>	19°44'55.1" N	102°30'34.9" W	994	99	KU983799
XH7	<i>Metarhizium</i> sp.	-----	19° 41' 57.7" N	102°26'46.9"W	---	--	-----
XH1	<i>Metarhizium</i> sp.	-----	19° 41' 59.0" N	102°26'00.1"W	---	--	-----
ES3	<i>Metarhizium</i> sp.	-----	19° 42' 37.5" N	102°28'30.2"W	---	--	-----
GS3	<i>Metarhizium</i> sp.	-----	19° 46' 55.5" N	102°30'12.0"W	---	--	-----
ZP1	<i>Metarhizium</i> sp.	-----	19° 44' 35.0" N	102°30'51.6"W	---	--	-----
BB1	<i>Beauveria</i> sp.	-----	19° 45' 06.9" N	102°33'43.5"W	---	--	-----
BB2	<i>Beauveria</i> sp.	-----	19° 47' 23.4" N	102°33'50.1"W	---	--	-----

Comparison of sequences in the NCBI database, using the BLAST algorithm with GenBank sequences, according to the maximum percentage of similarity.

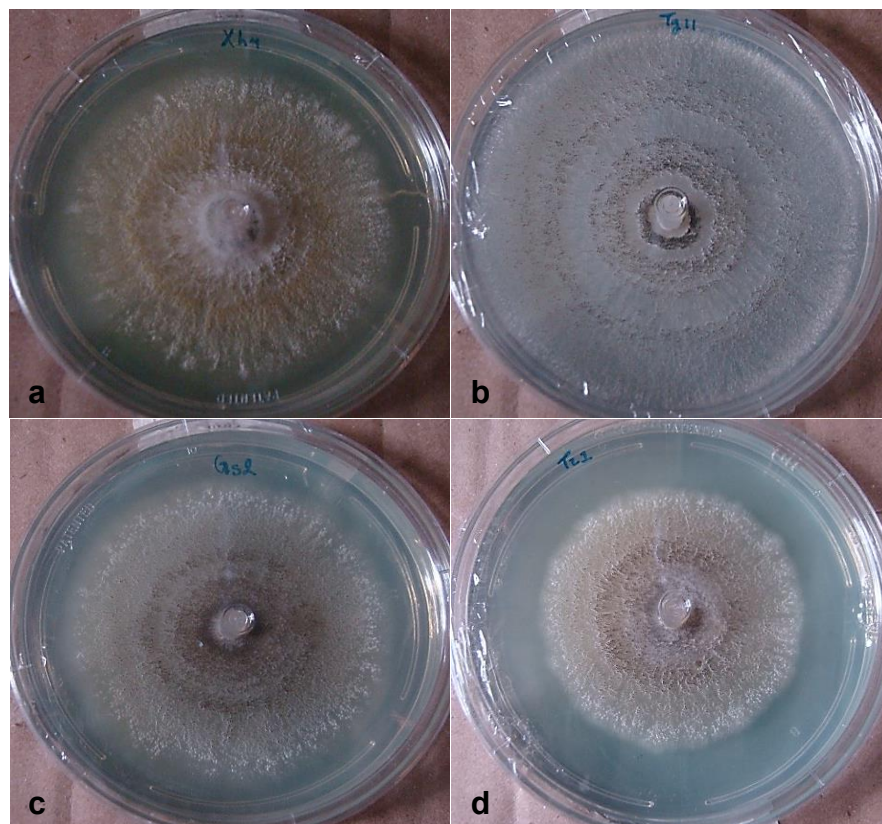


Figure 2. Macroscopic growth of *Metarhizium* spp., in PDA culture medium. (a-b) formation of aerial mycelium and growth in concentric rings of *Metarhizium anisopliae*. (c-d) growth and uniform sporulation of *Metarhizium robertsii*.

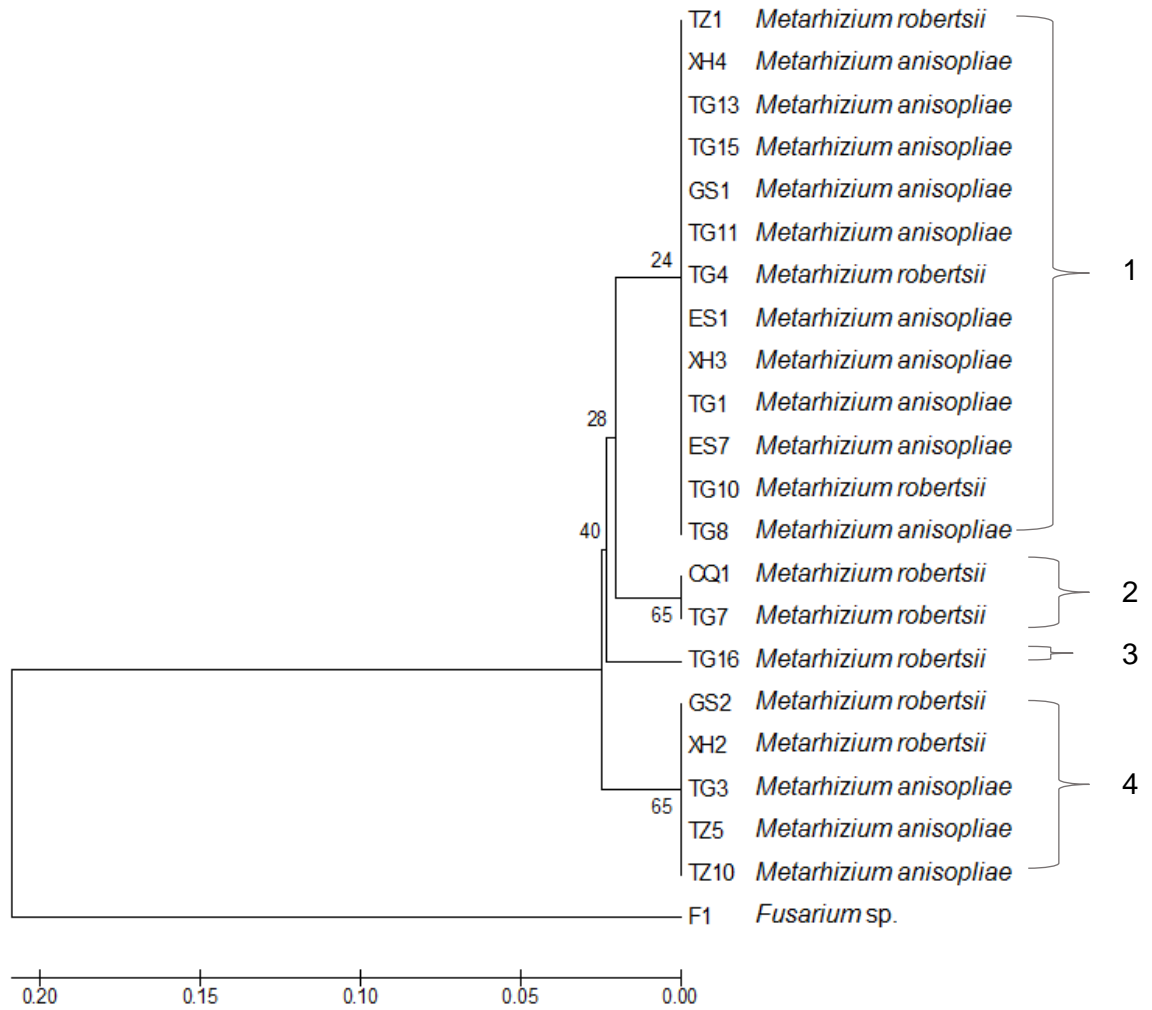


Figure 3. Phylogenetic analysis with the UPGMA algorithm method of *Metarhizium* species at 1,000 replicates.

Table 4. Mortality rate of *Copturus aguacatae* on the tenth day after being treated with *Metarhizium* spp., under laboratory conditions.

Entomopathogenic		
fungi	Code of the isolated	Mortality (%)
<i>M. robertsii</i>	TG7	100 a
<i>M. anisopliae</i>	GS1	100 a
<i>M. anisopliae</i>	TZ5	100 a
<i>M. anisopliae</i>	TG1	100 a
<i>M. anisopliae</i>	XH4	100 a
<i>M. anisopliae</i>	TG8	100 a
<i>M. anisopliae</i>	TG3	100 a

<i>M. robertsii</i>	TG4	100 a
<i>M. anisopliae</i>	ES1	90 a
<i>M. anisopliae</i>	XH3	80 a
<i>M. anisopliae</i>	TG11	70 a
<i>M. anisopliae</i>	TG15	70 a
Testigo		10 b

Bioassay performed at a concentration of 1×10^7 conidia/mL. Percentages with the same letter are statistically similar according to Tukey's test ($P < 0.05$).

CONCLUSIONES GENERALES

En la zona aguacatera del estado de Michoacán los parasitoides más frecuentes son los pertenecientes al género *Euderus*, presentes durante los tres primeros estadios larvales de *C. aguacatae*, etapa de mayor susceptibilidad de las larvas, encontrándose entre la corteza y el tejido leñosos de las ramas. Por lo tanto puede ser factible estudios de ecología y colonización en laboratorio de este parasitoide para implementar en estrategias de control biológico por conservación.

Los aislados de hongos entomopatógenos *M. anisopliae* y *M. robertsii* más patogénicos, se pueden aplicar en etapa de adulto cuando el insecto tiene mayor actividad fuera de las galerías y puede estar en contacto directo con las conidias del hongo.

LITERATURA CITADA

- Aguirre, P. S., Cuiris, P. H., Ruíz, F. R., Serna, M. E., Negrete, N. R., Gomez, C. J., & Lara, C. M. 2011. Control biológico del barrenador de ramas del aguacate *Copturus aguacatae* Kissinger. In Proceedings VII World Avocado Congress Cairns, Australia.
- Barnett, H. L., & Hunter, B. B. 1999. Illustrated genera of imperfect fungi, 4th ed. The American Phytopathological Society. Pp. 218
- Barrientos, P. A. F., Muñoz, P. R. B., Reyes, A. J. C., Borys, M. W., & Martínez, D. M. T. 2007. Taxonomía, cultivares y portainjertos 31-62. En: Téliz-Ortiz, D., Mora A., A. (Eds.). El aguacate y su manejo integrado. Mundi Prensa. México.
- Bautista, M. N. 2006. Insectos plaga, una guía ilustrada para su identificación. Colegio de Postgraduados. ISBN, 968-839.
- Ben-Ya'acov, A., Solís M, A., & Peri, E. 1995. Progress of the study of avocado genetic resources. II. The avocado genetic resources in Costa Rica. Program and book of abstracts of the world avocado Congress III.
- Bergh, B., & Ellstrand, N. 1986. Taxonomy of the avocado. California Avocado Society Yearbook, 70, 135-145.
- Bischoff, J. F., Rehner, S. A., & Humber, R. A. 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. Mycologia. 101(4): 512-530.
- Brooks, R. M., & Olmo, H. P. 1972. Register of new fruit and nut varieties. Univ. Calif. Press, Berkeley. 708(2).
- Campos, E., & López, L. 2005. Diversidad del género *Persea* y sus usos. In Memorias del II Congreso Mexicano y Latinoamericano del Aguacate: Resúmenes. 3-4.
- Coria, V. M. A., Pescador, E., López, R., Lezama, R., Salgado, M., López-Vidales, A., & Muñoz, J. 2007. Autoecología del barrenador de ramas *Copturus aguacate* Kissinger (Coleoptera: Curculionidae) del aguacate en Michoacán, México. In Proceedings VI World Avocado Congress (Actas VI Congreso Mundial del Aguacate). Viña del Mar, Chile.

- Crous, P. W., Allegrucci, N., Arambarri, A. M., Cazau, M. C., Groenewald, J. Z., & Wingfield, M. J. 2005. *Dematiocladium celtidis* gen. sp. nov. (Nectriaceae, Hypocreales), a new genus from *Celtis* leaf litter in Argentina. *Mycological Research*. 109(07): 833-840.
- De Dios-Ávila, N., Cambero, C. J., Coronado, B. J. M., Carvajal, C. C., Rios, V. C & Peña, S. G. 2016. Primer Registro de *Neocatolaccus tylodermae* Ashmead en México como Parasitoide de *Copturus aguacatae* Kissinger. *Southwestern Entomologist*. 41(4): 1203-1206.
- Dreistadt, S. H. 2008. Integrated pest management for avocados. UCANR. Publications. 222(3503).
- Driver, F., Milner, R. J., & Trueman, J. W. 2000. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Research*. 104(02): 134-150.
- Engstrand, R. C., Cibrián Tovar, J., Cibrián-Jaramillo, A., Kolokotronis, S. O. 2010. Genetic variation in avocado stem weevils *Copturus aguacatae* (Coleoptera: Curculionidae) in Mexico. *Mitochondrial DNA*. 21: 38-43.
- Equihua, M. A., Estrada, V. E., González, H. H., Gasca, C. L., Salinas, C. A., González, A. J., Mora, A. G., & Téliz, O. D. 2007. Plagas: 133-169. En: Téliz-Ortiz, D., Mora A., A. (Eds.). *El aguacate y su manejo integrado*. Mundi Prensa. México.
- Hernández, F. L. M., Saavedra, A. M., Urías, L. M. A., y López, A. J. G. 2009. Registro de *Urosigalphus avocadoae* Gibson (Hymenoptera: Braconidae) como parasitoide de *Copturus aguacatae* kissinger (Coleoptera: Curculionidae) en México. *Acta Zoológica Mexicana*. 25(3): 659-661.
- Huang, B., Humber, R. A., Li, S., Li, Z., & Hodge, K. T. 2005. Further notes on the molecular taxonomy of *Metarhizium*. *Mycotaxon*, (94): 181-188.
- Huerta, D. P. A., Trujillo, J., Equihua, A., & Carrillo, J. 1990. Enemigos naturales y evaluación preliminar de dos nematodos para biocontrol de *Copturus aguacatae* (Coleoptera: Curculionidae). Atlixco, Puebla, México. *Agrociencia*. 1(3): 47-56.

- Kissinger, D. G. 1957. Description of a new *Copturus* pest of avocado from Mexico (Coleoptera: Curculionidae: Zygopinae). *Acta Zoológica Mexicana*. 2(3): 1-8.
- Lahav, E., & Gazit, S. 1994. World listing of avocado cultivars according to flowering type. *Fruits*. 49(4): 299-313.
- NOM-066-FITO-2002. 2002. Especificaciones para el manejo fitosanitario y movilización del aguacate. [En línea]. Diciembre de 2016. <http://www.senasica.gob.mx/?doc=696>
- Rehner, S. A., & Buckley, E. 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia*. 97(1): 84-98.
- Rodríguez, S. F. 1982. El Aguacate. México. AGT. 167p.
- Sánchez, S. M. G., Cortez. M. H., & Ochoa E. S. 2012. Parasitismo de larvas de *Copturus aguacatae* (Coleoptera: Curculionidae) por *Heterorhabditis indica* (Rhabditida: Heterorhabditidae) en laboratorio. *Revista Colombiana de Entomología*. 38(2): 200-207.
- Shepherd, J., & Bender, G. 2002. A history of the avocado industry in California. *Calif Avocado Soc Yearb.* (85): 29-50.
- Smith, C. E. 1966. Archeological evidence for selection in avocado. *Economic Botany*. 20(2): 169-175.
- Talavera, C. M., & Padilla, C. M. 2003. Reconsideraciones técnicas al ciclo biológico del barrenador de ramas del aguacate (*Copturus aguacatae*, Kissinger). *Proceedings V World Avocado Congress*. 445-448.
- Téliz, O. D., Mora, A. A., Marroquín, P. F. J., Ávila, Q. G. D., Valencia, A. M., 2007. Enfermedades: 171-208. En: Téliz, O. D., Mora A., A. (Eds.). *El aguacate y su manejo integrado*. Mundi Prensa. México.
- Tsui, C. K., Sivichai, S., & Berbee, M. L. 2006. Molecular systematics of *Helicoma*, *Helicomyces* and *Helicosporium* and their teleomorphs inferred from rDNA sequences. *Mycologia*. 98(1): 94-104.

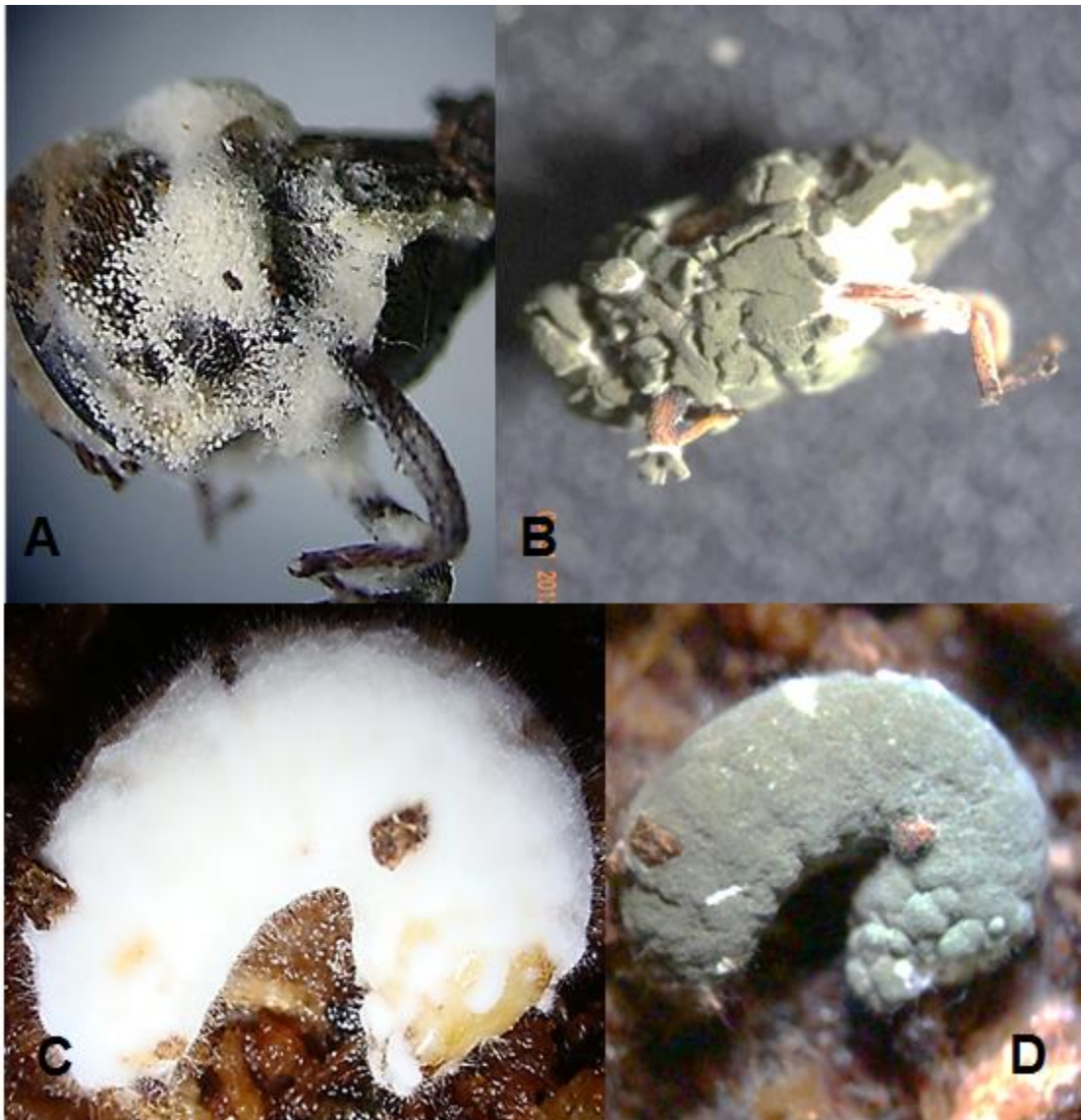
SIAP-SAGARPA. 2016. [En línea]. Marzo 2017.
http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalCultivo.do

USDA-APHIS. 2011. Plan de Trabajo para la Exportación de Aguacate HASS de México a los Estados Unidos de Norte América. Pp. 32.

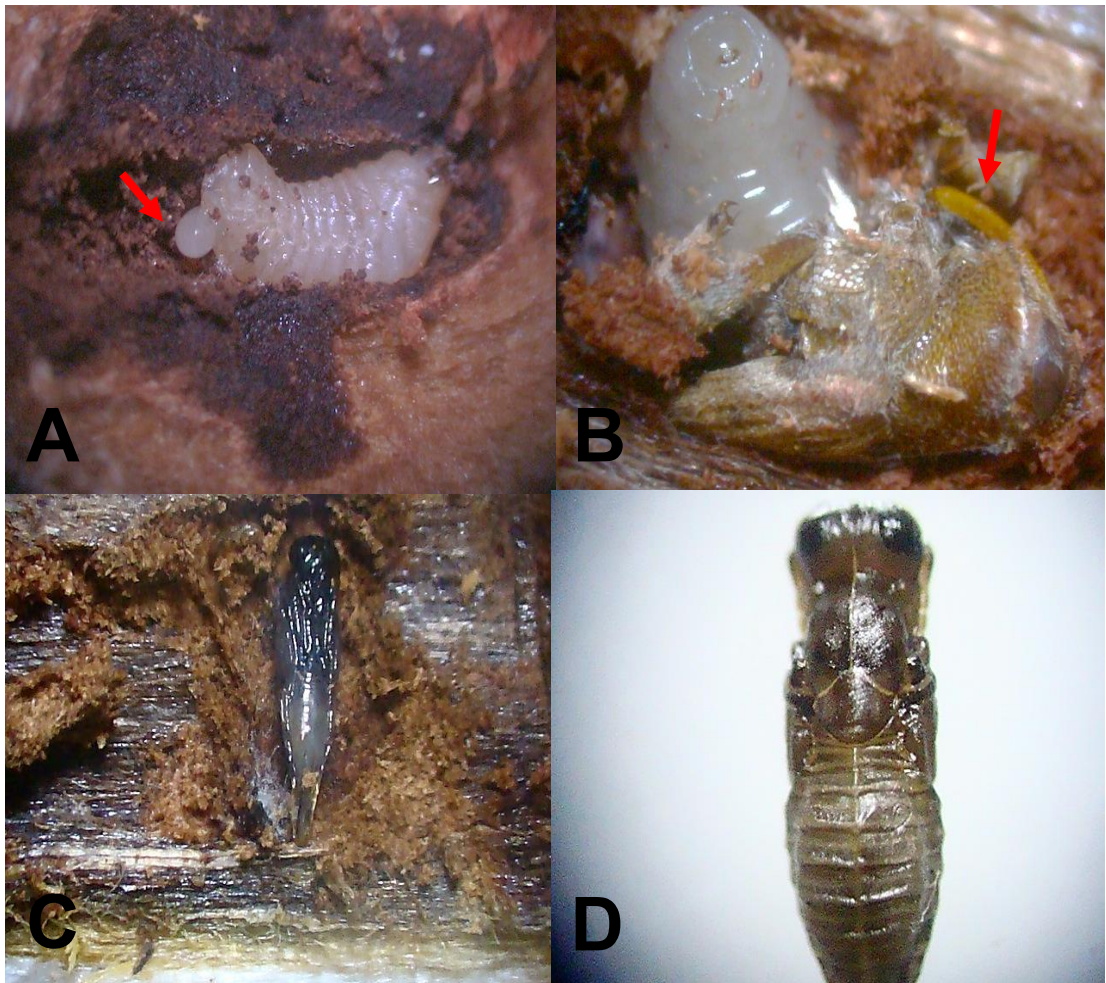
UADA-PLANTS. 2017. [En línea]. Marzo 2017.
<https://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=PEAMD>

Williams, L. O. 1977. The avocados, a synopsis of the genus *Persea*, subg. *Persea*. *Economic Botany*, 31(3): 315-320.

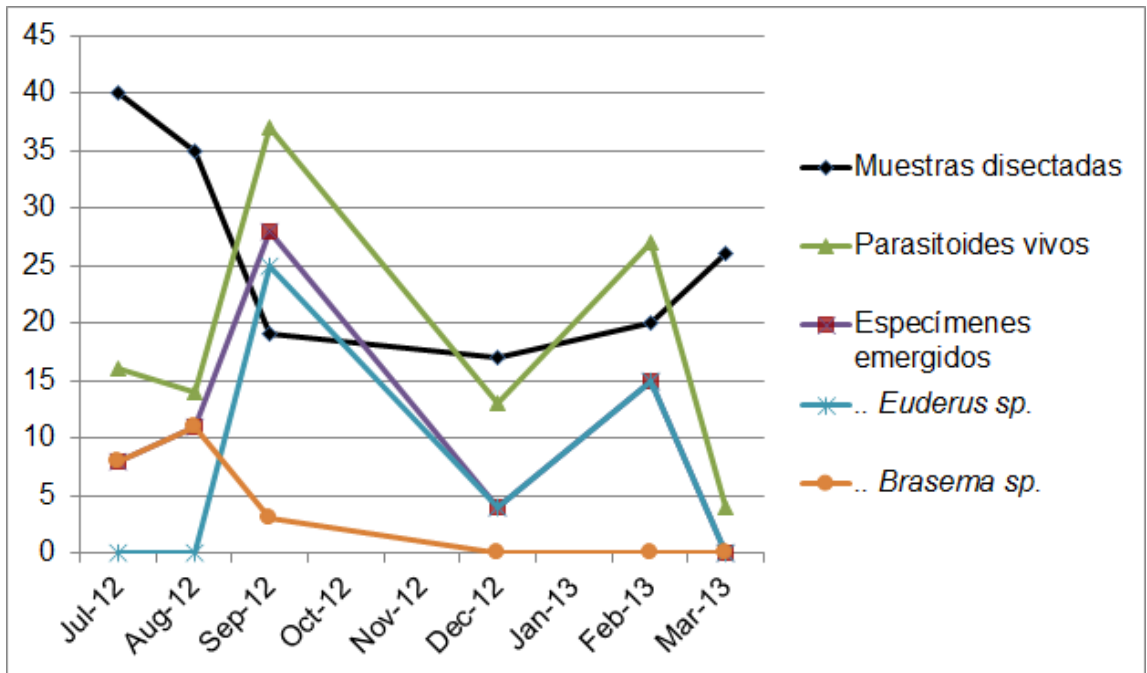
APÉNDICE



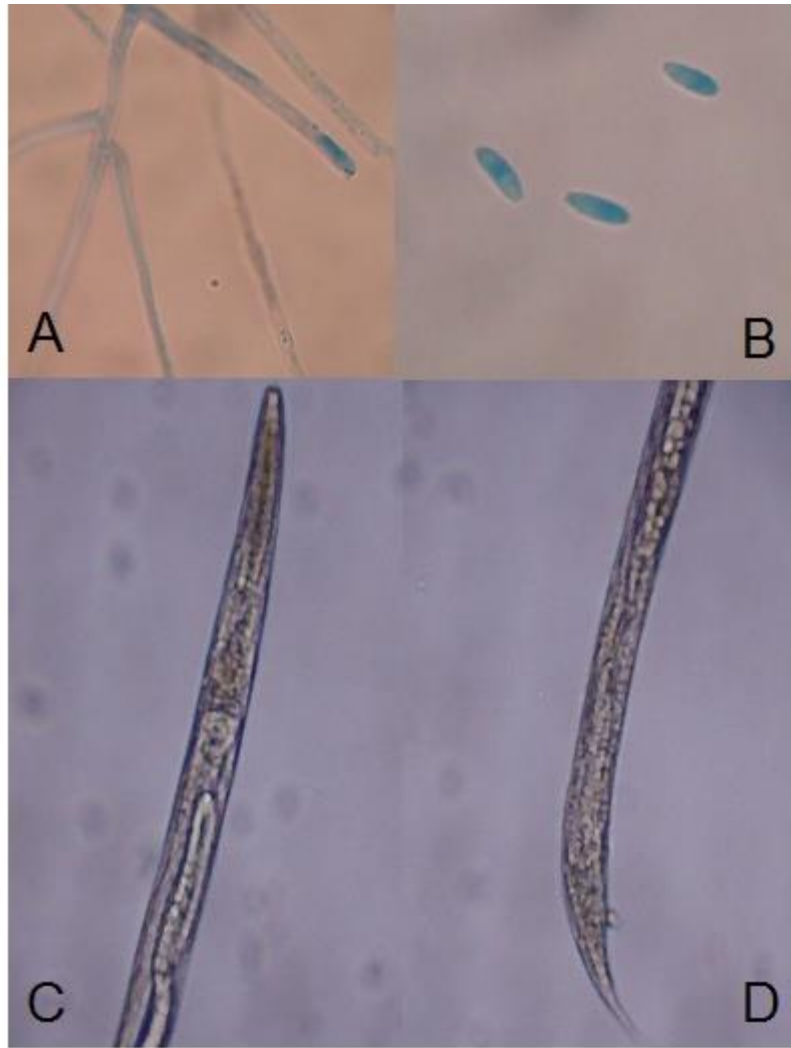
Apéndice 1. Hongos entomopatógenos infectando adultos y larvas de *C. aguacatae*: A) adulto micosado por *Beauveria* sp. B-D) adulto y larva micosados por *M. anosopliae* en diferentes etapas de desarrollo fúngico.



Apéndice 2. Parasitoides de *C. aguacatae* en diferente estadio: A) parasitoides emergiendo de larva del barrenador. B) larva de parasitoides emergiendo de un subimago. C-D) pupa del parasitoides del barrenador de las ramas.



Apéndice 3. Parasitismo natural del barrenador de las ramas del aguacate *C. aguacatae* en Tingüindín, Michoacán en 2012 y 2013.



Apéndice 4. Saprofitos asociados a momias de *C. aguacatae*: A-B) *Fusarium* sp. C-D) Nematodo saprofito.