



NAPPO

North American Plant Protection Organization
Organización Norteamericana de Protección a las Plantas

Documento de Ciencia y Tecnología de la NAPPO

CT 03: La aplicación del control biológico del barrenador esmeralda del fresno (BEF) en Norteamérica

Preparado por los miembros del
Grupo Asesor Técnico sobre BEF de la NAPPO

Jonathan Lelito¹, Robert Lavallée², José Refugio Lomeli³, Barry Lyons⁴ y Mireille Marcotte⁵.

Octubre de 2013

¹ Presidente del GAT; Gerente de operaciones, USDA APHIS PPQ, Barrenador esmeralda del fresno – Control biológico

² Investigador científico, Ministerio de Recursos Naturales de Canadá

³ Dr. J. Refugio Lomeli Flores, Profesor Investigador Titular, Laboratorio de Control Biológico, Posgrado en Fitosanidad en Entomología y Acarología, jrlomelif@hotmail.com, jrlomelif@colpos.mx

⁴ Investigador científico, Ministerio de Recursos Naturales de Canadá

⁵ Subgerente, ACIA – Recursos forestales

Índice

	página
1. Biología y manejo general	3
2. Opciones de control biológico para el barrenador esmeralda del fresno	6
2.1 Control biológico clásico	6
2.1.1 Especies de Hymenoptera aprobadas para la liberación en Estados Unidos y situación actual del programa	7
2.1.2 Información biológica.....	8
2.1.3 Datos de liberación en EE. UU.	9
2.1.4 Datos de recuperación en EE. UU.....	13
2.1.5 Instalación de Cría Masiva – métodos desarrollados y mejoras en el proceso	14
2.2 Parasitoides y depredadores nativos del BEF	15
2.3 Control biológico con microorganismos entomopatógenos.....	18
2.3.1 Control biológico con hongos entomopatógenos.....	18
2.3.2 Modo de acción de los hongos entomopatógenos	19
2.3.3 Resultados más importantes de la investigación sobre entomopatógeno del BEF.....	19
3. Proceso normativo relacionado con la importación, cría, liberación y movilización nacional de agentes de control biológico de insectos plagas.....	23
3.1 Procesos normativos en Estados Unidos	24
3.2 Procesos normativos en Canadá.....	25
3.3 Procesos normativos en México	27
4. Situación actual, uso y perspectivas del género <i>Fraxinus</i> en México.....	28
5. Cómo estimular la investigación para la aplicación del control biológico.....	29
6. Manejo del BEF a través de la armonización de los esfuerzos del control biológico...30	
6.1 Intercambio de experiencias en control biológico	30
6.2 Ajustes operacionales.....	30
6.3 Depósito centralizado de conocimiento estratégico.....	31
7. Conclusiones y recomendaciones	31
8. Referencias	31

1. **Biología y manejo general**

El barrenador esmeralda del fresno (BEF) (*Agilus planipennis* Fairmaire) (Coleoptera: Buprestidae) es un insecto que barrena la madera y el cual ha invadido y se ha establecido en Norteamérica (Haack et al. 2002). El BEF es nativo de áreas grandes del noreste de Asia entre ellas el Lejano Oriente de Rusia, Corea, China, Japón y Mongolia (Bray et al. 2011). Sin embargo, en esos países, el BEF no se ha notificado como plaga de importancia económica (Cappaert et al. 2005). En una encuesta de campo realizada en algunas áreas donde el BEF es nativo, fue poco común y difícil de encontrar (Schaefer 2004). El BEF probablemente se transportó a Norteamérica en embalaje de madera sólida (Cappaert et al. 2005).

El BEF se detectó en el 2002 en Detroit, Michigan y en Windsor, Ontario (Haack et al. 2002). Se desconoce cómo y cuándo se introdujo este insecto a Norteamérica, pero las pruebas sugieren que el BEF estuvo presente en Michigan por lo menos durante 10 años antes de su descubrimiento (Cappaert et al. 2005). Este insecto ahora se encuentra en 18 estados de EE. UU. Y dos provincias canadienses (www.emeraldashborer.info). Los estados que están reglamentados en EE. UU. son: Connecticut, Illinois, Indiana, Iowa, Kansas, Kentucky, Maryland, Massachusetts, Michigan, Minnesota, Missouri, Nueva York, Ohio, Pensilvania, Tennessee, Virginia, Wisconsin y Virginia Occidental. En Canadá, este insecto se encuentra en Ontario y Quebec. Millones de fresnos en entornos urbanos, rurales y forestales han muerto y los impactos ecológicos y económicos están aumentado en cuanto se dispersa el insecto (Poland 2007, Kovacs et al. 2010). Considerando que esta plaga ya se encuentra establecida en una buena parte de Norteamérica, la erradicación ya no resulta práctica (Johny et al. 2012a; Poland y McCullough 2010).

Para Norteamérica, se supone que las 20 especies nativas de fresnos (Wallander 2008) son altamente vulnerables al BEF, aunque el fresno azul (*Fraxinus quadrangulata*) es menos susceptible (Tanis y McCullough 2012). En grupos de árboles de distintas especies, el BEF usualmente ataca primero al fresno verde (*F. pennsylvanica*), el cual generalmente es más susceptible que el fresno blanco (*F. americanum*) (Cappaert et al. 2005), aunque, en última instancia, ambos sucumben al BEF. Este insecto se considera el mayor devastador de árboles que se ha introducido a Norteamérica (McCullough y Mercader 2012). Al noreste de China, se ha registrado al BEF atacando de forma preferencial a las especies de fresnos introducidas a Norteamérica (*F. pennsylvanica* y *F. velutina*) y pocas veces atacando a las especies de Asia tales como *F. mandshurica* y *F. chinensis* (Duan et al. 2012b) salvo que se encuentren fuera de su entorno forestal natural (Liu et al. 2003).

Los árboles de todos los tamaños pueden ser atacados por el BEF. Por lo general, consideramos que el ataque inicia en la parte alta de la copa de los árboles grandes seguido de la colonización del tronco principal después del deterioro del árbol (Cappaert 2005). Cuando las larvas están presentes en densidades mayores debajo de la corteza, la larva mata al árbol consumiendo el floema y el xilema externo, y de esa manera estrangula al árbol, afectando el transporte del agua y fotosintatos, privando las raíces de nutrientes y deshidratando las copas (Dean et al. 2012). La muerte de los árboles se observa después de 1 a 3 años del daño (Poland y McCullough 2006; Cappaert et al. 2005).

Los síntomas aparentes de una infestación del BEF en un árbol son la muerte regresiva de la copa, deformaciones en la corteza, ataques de pájaros carpinteros y producción de brotes epicórmicos; estos síntomas se hacen más visibles en el árbol en cuanto avanza la infestación (Cappaert et al. 2005). Los orificios de salida típicos en forma de "D" y las galerías serpenteantes debajo de la corteza por lo general son indicativos del ataque por el BEF.

En el área de los Grandes Lagos, los BEF adultos emergen desde finales de mayo hasta finales de julio. Después de la emergencia, los adultos se alimentan del follaje durante 5 a 7 días antes de aparearse y luego las hembras se alimentan otros 5 a 7 días antes de ovipositar (Cappaert et al.

2005). Los BEF se alimentan durante todo su período de vida adulta (Bauer et al. 2004a) y las hembras pueden aparearse en múltiples ocasiones (Lyons et al. 2004). Cada hembra oviposita un promedio de 71 huevecillos (Wei et al. 2007) en la corteza o debajo de las escamas de la corteza de las ramas o troncos del árbol hospedante. Sin embargo, una hembra que se mantuvo en cautiverio pudo ovipositar 258 huevecillos durante un período de 6 semanas (Lyons et al. 2004).

De acuerdo a los métodos actuales de cría, cada BEF usualmente produce entre 200 y 300 huevecillos, con una minoría de especímenes que ovipositan entre 600 y 700 huevecillos durante el lapso de vida como adulto de 10 a 12 semanas (Lelito, datos inéditos). Después de 10 a 14 días (según las condiciones del clima), los huevecillos eclosionan y las larvas barrenan hacia el floema, se alimentan y desarrollan a través de cuatro estadios (Cappaert et al. 2005) antes de llegar a la etapa de prepupa. Las larvas se alimentan durante varios meses del floema y la savia exterior y eventualmente rodean (cinchan) y matan a los árboles si las galerías son lo suficientemente largas (Duan et al. 2010). Si el desarrollo larvario no alcanza la etapa de prepupa en el otoño, necesitará otro invierno para alcanzar la etapa de adulto. Una parte de las larvas pasarán un par de inviernos antes de alcanzar la metamorfosis final y llegar a la etapa de adulto. El desarrollo larvario toma más tiempo en árboles saludables que han sido atacados recientemente que en árboles no saludables (Cappaert et al. 2005). Durante los meses de invierno, los primeros estadios generalmente son más frecuentes en árboles ligeramente infestados, mientras que las larvas del BEF en árboles muy infestados son encontrados principalmente en la etapa de prepupa (Cappaert et al. 2005).

El BEF puede dispersarse de dos formas: a través del transporte de madera de fresno infestada y el vuelo del adulto. Las primeras observaciones en Michigan sugirieron que la dispersión a bajas densidades en sitios alejados fue menor que 1 km/año (Cappaert et al. 2005). Sin embargo, en estudios de laboratorio, 20% de las hembras apareadas del BEF volaron más de 10 km en 24 h en vuelos monitoreados en computadora y 1% volaron más de 20 km en las mismas 24 h (Taylor et al. 2010).

Se ha observado en su lugar de origen, así como en Norteamérica, que diferentes factores bióticos disminuyen la supervivencia del BEF. En una encuesta de enemigos naturales que realizaron Liu y Bauer (2006) en Michigan, se observó que alrededor del 2% de las larvas fueron infectadas por un hongo entomopatógeno. Estas se sometieron a prueba los aislados comerciales y nativos contra las larvas y adultos del BEF, lo cual se discutirá en el Capítulo 4.

El BEF en su lugar de origen es atacado por un complejo de parasitoides, y en las encuestas de campo realizadas en Michigan, Pensilvania, Ohio y Ontario han demostrado que los himenópteros nativos también atacan a las larvas del BEF (Bauer et al. 2004b; Lyons 2010; Cappaert y McCullough 2009; Duan et al. 2009; Kula et al. 2010; véase el Capítulo 3).

Se evaluaron tres especies de parasitoides que atacan al BEF en China para su inclusión en un programa de control biológico clásico y se aprobaron para liberación en EE. UU. Dos son parasitoides de larva, *Spathius agrili* Yang (Hymenoptera: Braconidae) y *Tetrastichus planipennisi* Yang (Hymenoptera: Eulophidae), y uno es un parasitoide de huevecillos, *Oobius agrili* Zhang y Huang (Hymenoptera: Encyrtidae) (Liu et al. 2003; Dean et al. 2012). Se abordan más detalles sobre este tema en el Capítulo 2. Los resultados de estos estudios apoyan la idea de que la supresión por enemigos naturales es la estrategia de manejo de plagas a largo plazo más adecuada para las plagas introducidas (Hajek et al. 2007; Johny et al. 2012a) como lo es el BEF.

Los estudios en campo en las áreas invadidas recientemente de EE. UU. han demostrado que los pájaros carpinteros son depredadores importantes, consumiendo entre 32 y 90% de los estadios más avanzados del BEF, prepupa y pupae (Cappaert et al. 2005; Lindell et al. 2008, Duan et al. 2012a). Sin embargo, en su lugar de origen, los pájaros carpinteros no parecen ser un factor

biótico importante que regule las poblaciones del BEF. En una encuesta realizada en el Lejano Oriente de Rusia, la depredación causada por los pájaros carpinteros sobre el BEF fue de 3% en el fresno oriental (*F. mandschurica*) y de 0 a 41% en el fresno verde norteamericano (*F. pennsylvanica*) (Duan et al. 2012b).

Varios autores han demostrado que la resistencia del árbol hospedante influye en la supervivencia del BEF (Rebek et al. 2008; Duan et al. 2010; Duan et al. 2012b). En la región del Lejano Oriente de Rusia, Duan et al. (2012b) observaron en una encuesta de campo que el BEF estaba relacionado principalmente con el fresno verde norteamericano introducido (*F. pennsylvanica*). Además, las densidades del BEF se multiplicaron mucho más en fresnos verdes que en fresno Manchurian u oriental estresado de manera artificial. Estos autores observaron cadáveres del BEF cubiertos con tejidos de callos de plantas y consideraron esta respuesta de la planta como una expresión de la resistencia del árbol, la cual fue mayor en fresno Manchurian que en el fresno norteamericano introducido. De esta manera, Duan et al. (2012b) concluyeron que la resistencia del árbol hospedante puede jugar un papel importante en la supresión del BEF en su lugar de origen. Sin embargo, aunque inicialmente se consideraba como un rasgo fisiológico de las especies de Asia, esta resistencia también se observó en árboles norteamericanos, ya que en una arboleda natural de fresnos en Michigan, la defensa del árbol hospedante fue la fuente principal de mortalidad de las larvas del BEF (Duan et al. 2010).

La mortalidad debido a las bajas temperaturas del invierno podría limitar la dispersión de la población del BEF. Los estudios realizados en el BEF en el sur de Ontario demostraron que la prepupa no sobrevive por debajo de una temperatura promedio de -30°C y se consideran intolerantes al congelamiento (Crosthwaite et al. 2011). Además, la temperatura de congelamiento más baja (punto de supercongelamiento) registrada en Ontario para la prepupa fue de -35.3°C , lo cual es más baja (-29.6°C) de lo reportado en China (Crosthwaite et al. 2011). Se requieren estudios para determinar si los primeros estadios tienen la misma resistencia al frío.

El manejo del BEF en Norteamérica se basa en diferentes estrategias, concretamente la detección, intentos de disminución de la población y reglamentación legislativa. Las organizaciones federales (USDA-APHIS y ACIA) realizan inspección y búsqueda en áreas de alto riesgo. Los árboles infestados o sospechosos se identifican de acuerdo con las señales y síntomas típicos, los cuales incluyen rajaduras en la corteza, agujeros de emergencia, galerías de alimentación de larvas en forma serpenteante, apariencia de la copa y ramas adventicias. Además de estas encuestas visuales para delinear las áreas infestadas por el BEF, las trampas de insectos se utilizan para detectar a los BEF adultos (Crook et al. 2008). En Canadá, las trampas verdes en forma de prisma con cubierta adhesiva se instalan en la copa del árbol y se ceba con una cairomona a base de (Z)-3-hexenol. En EE. UU., se han realizado encuestas similares utilizando trampas de prisma púrpura cebadas con aceite de Manuka y (Z)-3-hexenol (USDA-APHIS 2012). Recientemente se sintetizó y sometió a prueba una feromona producida por el BEF (Silk et al. 2011). Los métodos nuevos bajo desarrollo utilizan la feromona para actuar en sinergia con el atrayente de cairomona para mejorar las capturas en la trampa (Ryall et al. 2012).

Cuando se descubren árboles infestados, los hábitos crípticos de las larvas limitan el control a las siguientes estrategias: control mecánico removiendo y eliminando los árboles, o la inyección sistémica de insecticidas si el árbol no está muy infestado. Los árboles pueden cortarse y procesarse para matar a la siguiente generación emergente. El corte de la madera o su procesamiento son formas de reciclar los árboles en productos valiosos (Wisconsin 2009).

Se han registrado algunos insecticidas para utilizarse contra el BEF con el fin de proteger árboles no infestados o ligeramente infestados. Estos pueden clasificarse en cuatro categorías: insecticidas sistémicos aplicados como inyección o empapado del suelo; insecticidas sistémicos aplicados como inyecciones en el tronco; insecticidas sistémicos aplicados a la parte inferior del

tronco; y aplicaciones de cubierta protectora aplicadas al tronco, ramas y follaje. Los insecticidas sistémicos se desplazan entre el tronco y las ramas por el sistema vascular, disminuyendo de esta forma los peligros ambientales (Hahn et al. 2011). En EE. UU., diferentes ingredientes activos están disponibles en diferentes formulaciones. Según el producto, algunos de los ingredientes activos son imidacloprid, dinotefuran o benzoato de emamectina (Herms et al. 2009). Sin embargo, no todos los productos son igualmente eficaces contra el BEF (Herms et al. 2009). En Canadá, solamente se han registrado tres productos y todos son insecticidas sistémicos: TreeAzin® (azadirachtin), Acecap 97® (Acefato- acetil tiofosforamidato de O,S-dimetilo) y Confidor® (Imidacloprid).

En relación a los bioplaguicidas, algunos aislados de hongos entomopatógenos, han demostrado ser muy virulentos contra el BEF y pueden aplicarse en los troncos de los árboles como una aspersión del tronco previo a la emergencia (Liu y Bauer 2008a, b) o aspersiones posterior a la emergencia en la corteza o el follaje (Castrillo et al. 2010a). Las formulaciones comerciales de los entomopatógenos de hongos se describirán en el Capítulo 4.

En relación al control legal, los objetivos de las entidades normativas federales en EE. UU. (USDA-APHIS) y Canadá (ACIA) son encontrar y definir áreas nuevas infestadas, prohibir legislativamente la movilización de materiales específicos incluyendo cualquier material de madera y leña de fresno de todas las especies de las áreas infestadas a las no infestas, y organizar campañas informativas para disminuir la dispersión de este insecto invasor.

Utilizando todas las herramientas disponibles para tratar al BEF, ahora la meta es avanzar hacia el manejo integrado de las poblaciones del BEF a largo plazo. Un enfoque interesante e integrado es el estudio piloto conocido como mortalidad lenta del fresno (Slow Ash Mortality – SLAM, por su sigla en inglés) el cual se está realizando en Michigan (Poland y McCullough 2010). El objetivo del SLAM es disminuir las poblaciones del BEF y por consiguiente reducir el avance de su dispersión. Para disminuir la dispersión, debería haber esfuerzos normativos firmes, contar con la cooperación de los residentes en las áreas afectadas, mejorar los métodos de detección y supresión y tener un mejor conocimiento de las dinámicas de la población y resistencia del hospedante. El mejoramiento de la eficacia de cada estrategia podría hacer una diferencia en la batalla contra el BEF.

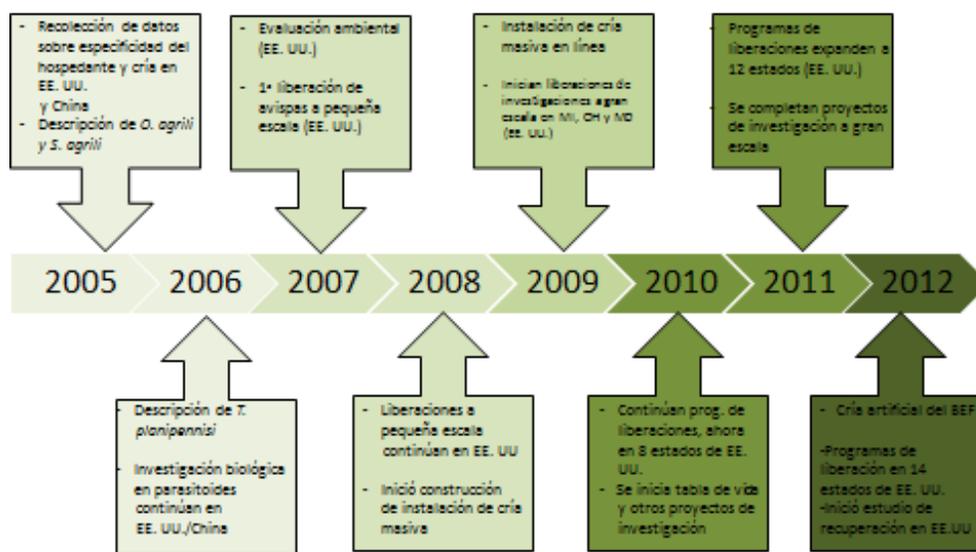
2. Opciones de control biológico para el barrenador esmeralda del fresno

Los siguientes apartados esbozan el control biológico clásico (2.1), parasitoides nativos y depredadores del BEF (2.2) y entomófagos del BEF (2.3).

2.1 Control biológico clásico

La figura 2.1 presenta una cronología visual de los esfuerzos de EE. UU. para identificar, evaluar y criar agentes de control biológico clásicos para el BEF. Este proceso, que inició en 2005 ha empezado a dar frutos, puesto que se está recuperando un número mayor de agentes. Los apartados 2.1.2-2.1.6 brindan detalles adicionales sobre los agentes mismos, su biología y comportamiento, números de insectos liberados, liberaciones en EE. UU. y sitios de recuperación, y un resumen de la dirección futura que se prevé del programa de control biológico para el BEF en EE. UU.

Figura 2.1 Cronología del programa de control biológico del BEF en EE. UU.



2.1.1 Especies de Hymenoptera aprobadas para la liberación en Estados Unidos y situación actual del programa

Tras la detección inicial del BEF en 2002, se determinó que el APHIS continuaría con la exploración de agentes de control biológico, y este trabajo se emprendió en colaboración con el Servicio Forestal y el USDA (Registro Federal 2007). Se recolectaron de China tres especies de parasitoides, que resultaron ser nuevas para la ciencia y se estudiaron en el laboratorio, siguiendo el enfoque de trabajos preliminares sobre comportamiento, especificidad del hospedante y la fenología (Yang et al. 2005, 2006; Zhang et al. 2005).

Posterior al hallazgo de las especies nuevas en China, se enviaron muestras a Estados Unidos y los estudios de especificidad del hospedante iniciaron en laboratorios operados por el Servicio Forestal y el Centro de Ciencia y Tecnología de Sanidad Vegetal para la Protección Fitosanitaria y Cuarentena de ese país. Se inició un proyecto de evaluación ambiental para determinar aspectos primordiales de interés en cuanto a la importación y liberación de los parasitoides que incluyeron: concordancia del clima, estudios de especificidad del hospedante para determinar si los parasitoides tendrían posibilidad de ser una amenaza para las especies nativas, si se liberaran, y el posible resultado por defecto de la estrategia “sin acción” (por ejemplo, no se utilizan agentes de control biológico) (USDA–APHIS/FS 2007). Aunque *O. agrili* y *S. agrili* se encontraron atacando a un número pequeño de especies nativas de Norteamérica en los géneros *Agrilus*, la tasa de ataque fue baja y la preferencia fue por el BEF en cualquier parte en donde los dos hospedantes se ofrecían en forma simultánea. La conclusión general del estudio fue un “hallazgo sin impacto considerable”, y los parasitoides se aprobaron posteriormente para la liberación en EE. UU. (USDA–APHIS/FS 2007).

Más recientemente, se ha descrito una especie nueva de *Spathius* (*Spathius galinae*; Belokobylskij et al. 2012) recolectada en Rusia. *S. galinae* se encuentra actualmente en la etapa de evaluación ambiental, sometiéndose a una prueba de especificidad de hospedante. Se espera que cumpla con los requisitos de especificidad del hospedante, ya que se sospecha (basándose en su

distribución más norteña) que tiene un nivel de tolerancia mayor que *S. agrili*, y puede ser más adecuado en la parte norte de EE. UU. y Canadá, en donde abunda el fresno, especialmente *F. nigra*.

Como perspectiva general, la situación actual del programa de control biológico clásico de EE. UU. es la siguiente: *Spathius agrili*, *Tetrastichus planipennisi* y *Oobius agrili* están aprobados para su liberación y se han liberado y recuperado en toda el área de infestación del BEF en Estados Unidos (véase 2.1.2, 2.1.3); se ha propuesto a *S. galinae* para liberación y se ha sometido a prueba de especificidad del hospedante; los programas de recuperación y establecimiento para los tres parasitoides aprobados se están realizando en varios estados de EE. UU. (véase 2.1.4), y la Instalación de Control Biológico del BEF está establecida en línea y produciendo parasitoides de manera exitosa para su distribución a las entidades federales y estatales para liberarlos en campo (y, en menor grado, para apoyar investigaciones pertinentes al programa).

2.1.2 Información biológica

Las tres especies de parasitoides aprobadas para la liberación en EE. UU. son *Oobius agrili* Zhang y Huang (un endoparásitoide solitario, partenogenético, de la familia Encyrtidae), *Spathius agrili* Yang (un ectoparásitoide gregario idiobionte de la familia Braconidae) y *Tetrastichus planipennisi* Yang (un endoparásitoide gregario koinobionte de la familia Eulophidae).

Las tres especies de parasitoides comparten al BEF como su hospedante principal. Sin embargo, los estadios de vidas atacados y el tiempo de dicho ataque varían entre las tres especies. Dos especies, *O. agrili* y *S. agrili*, tienen una diapausa obligatoria (Liu et al. 2007; Belill y Lelito 2011) y parecen estar estrechamente sincronizados con la emergencia del BEF. En contraste, *T. planipennisi* no muestra comportamiento de diapausa (Coggins y Lelito 2011; Duan et al. 2011a), y ataca al BEF de manera continua durante los meses cálidos del año. Debido a estas diferencias, se consideran aspectos biológicos y ecológicos de cada especie para determinar el tiempo de liberación de cada parasitoide en cada área geográfica. Además, el proceso de distribución del material del insecto en toda el área infestada requiere monitoreo constante de las condiciones locales del clima y la acumulación de grados-días de crecimiento.

Oobius agrili ataca al BEF solamente en el estadio de huevecillo, y es probable que complete dos generaciones al año en la mayor parte del área de distribución del BEF en EE. UU. (Liu et al. 2007). Desde el punto de vista de cría, *O. agrili* puede almacenarse, en diapausa, hasta por 12 meses sin incurrir en mortalidad considerable. Los adultos emergen de manera sincronizada en un espacio de 2 a 3 semanas luego de calentarse en el laboratorio y empiezan a reproducirse inmediatamente. Por ende, esta especie es tal vez la más "fácil" de criar masivamente para la liberación, considerando el suministro constante de huevecillosos del BEF como material hospedante (véase 2.1.5). Además, la Instalación de Cría ha desarrollado un método bastante eficaz de distribución del parasitoide como pupa sin hospedantes en papel filtro, en vez de movilizar adultos vivos, los cuales son extremadamente pequeños y por ende, muy frágiles para su envío (véase 2.1.5).

Spathius y *Tetrastichus* atacan preferentemente larvas de cuarto (último) instar del BEF, pero también aceptar hospedantes del tercer instar así como de pre-pupa (Liu et al. 2007; Wang et al. 2008; Ulyshen et al. 2010; Duan et al. 2011a). Diversos estudios han explorado la preferencia de los parasitoides por los diferentes estadios del BEF bajo condiciones naturales (campo) y artificiales (de laboratorio), mientras que estudios recientes determinaron que para *S. agrili*, los estímulos olfativos guían al parasitoide al árbol hospedante; después de un tiempo los estímulos acústicos, vibraciones causadas por la alimentación de larvas del BEF, le ayudan a la ubicación del hospedante (Wang et al. 2010). *Spathius agrili* parece tener especificidad sobre BEF de moderada a alta, y aunque es capaz de desarrollarse en otras especies de *Agrilus* nativo de EE.

UU., tiene una gran preferencia por hospedantes del BEF (Yang et al. 2008). Además, *S. agrili* solamente se ve atraído a componentes volátiles del fresno, y en menor grado al sauce (Yang et al. 2008). Junto con los resultados de Wang y sus colegas (2010) que se indicaron arriba sobre la atracción hacia el fresno como un primer paso importante en la ubicación del hospedante, esto sugiere que las tasas de encuentro con hospedantes no nativos serán muy bajas.

La exclusión competitiva tiene posibilidad de ocurrir entre las dos especies de parasitoides larvarios, y se ha debatido desde hace tiempo sobre la mejor estrategia a seguir cuando se liberan varios agentes de control biológico (por ejemplo, Turnbull y Chant 1961). En el caso de los parasitoides del BEF, Ulyshen et al. (2010) indican que *Spathius* es el mejor competidor, pero las diferencias en la capacidad de búsqueda del hospedante debido a la habilidad de dispersión de cada especie han demostrado que puede haber coexistencia de dos especies de parasitoides mientras comparten un hospedante como recurso (“competencia de contrapeso”; Zwölfer 1971; Schröder 1974). Además, los estudios de laboratorio han demostrado que *T. planipennis* puede diferenciar entre un BEF parasitado anteriormente de un hospedante no parasitado, y por ende puede ser capaz de evitar algún tipo de competencia de esta forma (Yang et al. 2012).

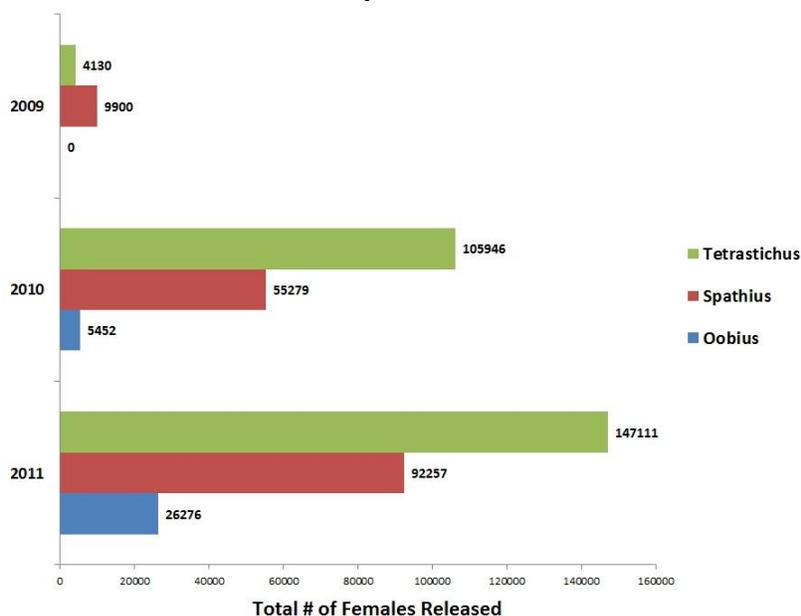
Se recomiendan estudios de campo para confirmar la viabilidad de la estrategia estadounidense de liberar ambos parasitoides larvarios simultáneamente en el mismo sitio. A la fecha, los estudios de campo se han centrado en los resultados de tablas de vida y de la recuperación de parasitoides posterior a la liberación (Duan et al. 2012a). En este momento, debido a los datos limitados sobre recuperación o sobre cualquier variación regional posible en el éxito de los parasitoides larvarios según los factores climáticos, el Programa del BEF de EE. UU. ha determinado que resulta lógico liberar ambos parasitoides larvarios simultáneamente hasta que se tengan suficientes evidencias de que esto disminuye el éxito del control sobre BEF.

2.1.3 Datos de liberación en EE. UU.

Las liberaciones de los tres parasitoides aprobados iniciaron en parcelas a pequeña escala en el 2007 y continuaron en el 2008. En el 2009, la Instalación de Cría Masiva del BEF inició en Brighton, Michigan, y comenzó el proceso de distribución de estos en varios estados con infestaciones de los EE. UU. Recientemente, se proporcionaron miles de hembras del parasitoide *Tetrastichus* para ser liberadas en Ontario, Canadá, por la ACIA con el fin de apoyar un proyecto piloto de control biológico en ese lugar.

En el 2010-2012, la red de sitios de liberación en EE. UU. se expandió considerablemente. La figura 2.2 muestra la evolución del número total de avispa liberadas por Instalación de Cría Masiva (se han liberado más de 76,000 *Oobius* en el 2012; y aún no están completos los datos de los dos parasitoides larvarios); las tablas 2.1-3 presentan un desglose de estas liberaciones desde el 2009 al 2011 por estado y condado de EE. UU. Así mismo, durante este tiempo, el descubrimiento de nuevas infestaciones del BEF, algunas por lo menos unos años más jóvenes que la edad promedio de las infestaciones del BEF en el sitio original de la liberación del parasitoide, dio la oportunidad de liberar parasitoides en condiciones de densidades poblacionales del BEF, por los menos en teoría, un poco menos abrumadoras que cuando se compararon con el número de agentes de control biológico liberados en el medio ambiente.

Figura 2.2. Totales anuales, 2009-2011, de parasitoides hembra liberados en EE. UU.



La estrategia general de liberación que se ha seguido hasta ahora es la liberación de cantidades pequeñas (200 hembras) de cada especie, cada segunda semana por cinco semanas, durante dos periodos cada año (1200 hembras de cada especie) según el clima local (USDA-APHIS/ARS/FS 2012). Debido a la variación en la producción del parasitoide en la Instalación de Cría Masiva y la disponibilidad estacional del personal colaborador para realizar las liberaciones, el número de avispas liberadas en un sitio determinado con frecuencia se desvía considerablemente de este escenario ideal; afortunadamente, con frecuencia esta desviación implica que un sitio recibe más parasitoides que el número mínimo sugerido.

Tabla 2.1. Liberaciones de parasitoides hembra, por estados y condado de EE. UU., 2009

Estado	Condado	<i>Spathius</i>	<i>Tetrastichus</i>	<i>Oobius</i>
IN	Orange/Orleans	0	750	0
MD	Prince George's	3000	2330	0
MI	Ingham	3150	500	0
OH	Franklin	3450	550	0
Total		9600	4130	0

Tabla 2.2. Liberaciones de parasitoides hembra, por estado y condado de EE. UU., 2010

Estados	Condado	<i>Spathius</i>	<i>Tetrastichus</i>	<i>Oobius</i>
IL	Cook	6614	14790	489
IN	Orange/Orleans	4264	10374	676
KY	Jefferson	3649	6893	0
KY	Shelby	534	1323	0
MD	Prince George's	11612	21645	678
MI	Delta	0	4470	1117
MI	Ingham	4796	13103	2087
MI	Ionia	3171	3263	0
MI	Tuscola	3171	3263	0
MN	Houston	910	1653	0
OH	Franklin	3863	4912	405
WV	Fayette	5229	8938	0
WV	Morgan	4138	6943	0
WV	Roane	2286	4140	0
Total		54237	105710	5452

Tabla 2.3. Liberaciones de parasitoides hembra, por estado y condado de EE. UU., 2011

Estado	Condado	<i>Spathius</i>	<i>Tetrastichus</i>	<i>Oobius</i>
IL	Cook	4230	8354	2101
IL	Lake	2100	2510	0
IN	Floyd	300	826	40
KY	Frankfort	2300	3398	0
KY	Fayette	6000	6857	0
KY	Jefferson	400	1026	782
KY	Kenton	1160	2644	639
KY	Shelby	1746	2727	394
MD	Alleghany	3400	4765	220
MD	Anne Arundel	1239	1382	175
MD	Howard	1666	3307	185
MD	Prince George's	12705	23247	2878
MI	Bay	400	400	200
MI	Delta	3285	6643	1231
MI	Houghton	8205	14574	1749
MI	Ingham	6204	13865	3612
MI	Ionia	6000	6039	1500
MI	Leelanau	800	1325	0
MI	Tuscola	6000	6000	1500
MN	Hennepin	5630	12316	3448
MN	Houston	400	723	200
NY	Cattaraugus	2400	2400	0
NY	Ulster	2800	2800	0
OH	Montgomery	1200	1300	200
PA	Allegheny	2800	4034	1733
PA	Union	1200	2081	700
VA	Loudoun	229	654	401
WI	Ozaukee	1800	2701	1389
WV	Berkley	2258	4437	999
WV	Calhoun	400	490	0
WV	Gilmer	3000	3286	0
Total		92257	147111	26276

En los primeros meses del 2013 se realizó una modificación a la estrategia de liberación, ya no se libera *S. agrili* en las áreas al norte de 40° latitud N en Norteamérica, mientras que continuarán las liberaciones al sur de esta línea (USDA-APHIS 2013). Esta decisión se fundamentó ante la escasez de datos de recuperación en aquellas áreas a pesar del éxito de recuperación de los otros parasitoides (Duan et al. 2013), así como una información de comparación del clima más reciente.

Los proyectos de investigación a pequeña escala continuarán en algunas áreas para entender más a fondo las mejores prácticas para la liberación de *S. agrili*.

En los próximos años se prevé un enfoque dirigido y se considerarán dos aspectos: primero, se identificarán sitios nuevos y se aprobarán para la liberación según la disponibilidad (densidad de fresnos, tamaño de la población del BEF), dispersión del BEF en áreas nuevas y disponibilidad del parasitoide en la Instalación de Cría; y el segundo, a los sitios en los que se han realizado liberaciones con anterioridad ya no se les brindará material de parasitoides adicional y cambiarán a recuperación, establecimiento e impacto.

2.1.4 Datos de recuperación en EE. UU.

El programa federal del BEF en Estados Unidos está interesado en documentar el período de hibernación y el proceso de establecimiento de los parasitoides como primer paso para determinar la eficacia de estos agentes de control biológico. Ambos procesos se documentan con la búsqueda de los estados de desarrollo de los parasitoides en los sitios de liberación y alrededor de estos: la hibernación se documenta con la búsqueda de estados de desarrollo del parasitoide vivos a principios de la primavera posterior a la liberación del verano u otoño anterior, mientras que el establecimiento por la recuperación de los estados de desarrollo del parasitoide a finales del verano o principios del otoño un año completo después de las liberaciones (por ejemplo, los parasitoides vivos que se han encontrado no pueden ser la cría inmediata de aquellos insectos liberados y esto demuestra la reproducción independiente en el campo).

La recuperación de los tres parasitoides ha sucedido en sitios en todo EE.UU. (véase la Tabla 2.4) pero ahora está alcanzando la etapa operativa. Los últimos dos años se han invertido en el desarrollo de las técnicas para la recuperación de los parasitoides. Las mejores prácticas existentes incluyen una combinación de trampas de bandeja amarilla (reellenas con glicol de propileno), “troncos centinela” creados en el laboratorio exponiendo los BEF adultos a pedazos de fresnos y recolectando los huevecillos depositados (estos luego se aseguran a los fresnos en el campo para que ocurra el parasitismo, y por ende la recuperación del *Oobius*), y el descortezado de todos los árboles cosechados de las áreas de liberación para encontrar larvas parasitadas. De estos métodos, podría decirse que las trampas de bandeja amarilla comprenden la menor mano de obra, pero son las que más han fallado en la recuperación de *Oobius*, necesitando la estrategia del tronco centinela, la cual depende de contar por lo menos con un espacio mínimo de laboratorio para criar los adultos y permitir que ellos ovipositen. El descortezado de árboles, aunque resulte muy laborioso, brinda los datos más completos sobre tasa de parasitismo y tamaño poblacional en campo. En algunos casos, las recuperaciones de ambas especies de parasitoides larvarios han sucedido en el mismo sitio, lo cual sugiere (véase el apartado 2.1.3) que ellas pueden coexistir, por lo menos en su densidad actual de baja población.

Finalmente, una mezcla de feromona producida por el macho de *S. agrili* ha sido identificada en laboratorio, y se ha ensayado exitosamente en jaulas de campo (Cossé et al. 2012). El uso de esta técnica para coleccionar *S. agrili* en campo, para realizar estudios de recuperación y establecimiento, se está estudiando más a fondo y se están realizando pruebas en campo y podría estar disponible en el futuro. Los estudios de impactos, los cuales investigan los cambios actuales en la salud de los fresnos después de la liberación del parasitoide y comprende sitios de control en donde la salud de los fresnos se monitorea ante la ausencia de liberaciones de parasitoides, se están llevando a cabo de manera continua en EE. UU. pero tomarán por lo menos dos años para completarse.

Tabla 2.4. Sitio de recuperación de parasitoides en EE. UU., por estado y especies

Estados	<i>Spathius</i>	<i>Tetrastichus</i>	<i>Oobius</i>
MI	X	X	X
MD	X	X	X
IL	X	X	
IN		X	
NY	X	X	
OH	X	X	X
PA	X		X

Recientemente, sucedió un acontecimiento importante durante el monitoreo de las poblaciones de parasitoides en los sitios originales de liberación en todo Michigan, Estados Unidos. En una serie de sitios se demostró que *Tetrastichus planipennis* es capaz de establecer una población, aumentar la tasa de parasitismo sobre el BEF con el tiempo, y también dispersarse considerablemente a áreas vecinas (Duan et al. 2013). Esto ha llevado a la implementación de proyectos semejantes en otros estados de EE. UU. para examinar la dinámica poblacional de los parasitoides en cada zona.

2.1.5 Instalación de Cría Masiva – métodos desarrollados y mejoras en el proceso

El proceso para la cría del BEF es el factor limitante y crítico en la producción del parasitoide, y requiere la mayor inversión de tiempo y de recursos financieros e –. Los árboles infestados deben cosecharse del campo, seccionarse y mantenerse en tubos de cría para producir adultos; debe mantenerse un invernadero y conservarse sin plagas para suministrar la cantidad adecuada de follaje de fresnos de alta calidad por más de medio año, para asegurar material cuando las fuentes externas no estén disponibles. La cría implica el descortezado de hasta mil árboles al año para recolectar larvas para utilizarlas como hospedantes para los parasitoides larvarios. Por ende, una de las tareas principales en la Instalación de Cría de EE. UU. ha sido investigar las interrogantes acerca de los parasitoides y hospedantes del BEF, con la meta de facilitar una mayor producción de material de insecto de calidad para la liberación en el ambiente. También se continúa con estudios de los parasitoides, con la finalidad de entender sus respuestas al clima, en cuanto se liberan en un área geográfica amplia, y se carece de un entendimiento pleno del mejor momento para liberarlos en cada localidad específica.

La calidad del hospedante con frecuencia es un factor importante en el proceso de toma de decisión de los parasitoides hembra (Charnov 1982; Godfray 1994; King 1987) y por ende, mejorar la calidad del hospedante es de gran importancia para la operación de la cría masiva. Se han iniciado dos líneas de investigación con miras a mejorar la calidad del hospedante: proporcionando follaje de alta calidad a los BEF adultos y ajustando la tasa de sexo y el tamaño del grupo para maximizar la fecundidad de la hembra con el fin de proporcionar huevecillos para la cría de *Oobius*, y creando técnicas para criar larvas abundantes y de alta calidad del BEF para los parasitoides larvarios.

La primera línea, que implica proporcionar a los BEF adultos condiciones óptimas, se ha enfocado en métodos de cría de grupos para aumentar la eficacia en la producción de huevecillos a la vez que se disminuyen los costos de mano de obra que conlleva. También se han seguido estrategias nuevas para adquirir el material hospedante, tales como contratar con estados sureños de EE. UU.

la compra de follaje de fresno y que se envíe a la Instalación de Cría para utilizarlo en el invierno. El follaje de fresno cultivado en invernaderos no se madura plenamente y brinda un nutriente con un perfil no tan óptimo para el BEF adulto, reduciendo la fecundidad y disminuyendo la calidad de huevecillos producidos, que a su vez disminuye el éxito del parasitoide de huevecillo.

La segunda línea consiste en la producción de larvas del BEF abundantes y de alta calidad para utilizarlas como hospedantes de los parasitoides de larva, y ha generado aumentos significativos en la eficacia de la producción. Una serie de colaboraciones importantes entre la Instalación y ARS ha resultado en la creación de un método basado en criar larvas y adultos del BEF en laboratorio; la única aportación necesaria del campo son los pedazos de fresnos y el follaje, y es poco probable que esto cambie en el futuro, ya que la producción de una dieta artificial práctica y económica para las larvas o adultos del BEF continúa siendo difícil de alcanzar. Tal vez el fruto más importante de la investigación ha sido el desarrollo de un sistema en donde los pedazos pequeños de fresnos con números específicos de huevecillos del BEF implantados en ellos puedan utilizarse para producir cantidades específicas de parasitoides. Se han iniciado pruebas de un sistema para enviar estos pedazos al campo, para colgarlos en fresnos infestados, antes de la emergencia de los parasitoides adultos. Esto ha ayudado en ahorro de la mano de obra para contar y enviar avispas adultas, ha disminuido la mortalidad de insectos durante el envío y permite a los insectos emerger en forma natural en el campo, lo cual hipotéticamente aumenta el éxito de la sincronización.

Sin embargo, aún quedan preguntas por contestar. Las pruebas extensas de campo del método innovador de liberación se realizarán en el 2013 y el monitoreo requerirá por lo menos 1-2 años después que empiezan las liberaciones. Los resultados de las simulaciones de clima, en conjunto con las colaboraciones de investigaciones en los laboratorios en todo EE. UU. es probable que tomen por lo menos el próximo año para completarse, y las operaciones de campo podrán necesitar futuras modificaciones para actualizar las mejores prácticas. También se carece del conocimiento pleno sobre la función de los parasitoides nativos en el ciclo ecológico de la infestación del BEF a largo plazo y la respuesta del enemigo natural.

2.2 Parasitoides y depredadores nativos del BEF

Las encuestas realizadas en el sudeste de Michigan indicaron que el parasitismo causado por parasitoides nativos de poblaciones del BEF fueron menores del 1% (Liu et al. 2003). Se criaron cinco especies de parasitoides himenópteros de los diferentes estados de desarrollo del BEF recolectados en Pensilvania, con una tasa total de parasitismo del 3.6% (Duan et al. 2009). A pesar de haberse examinado cantidades grandes de huevecillos del BEF, no se han encontrado huevecillos de parasitoides de este estado de desarrollo en las poblaciones de Michigan o Pensilvania (Liu et al. 2003, Bauer et al. 2007, Duan et al. 2009). Se están buscando enemigos naturales de *Agrilus* spp. relacionados con la plaga o parasitoides que ataquen a las poblaciones del BEF en Norteamérica para una estrategia de biocontrol aumentativa/inundativa (Cappaert y McCullough 2009, Duan et al. 2009, Lyons 2010, Kula et al. 2010). Estos enemigos naturales pueden entonces criarse/cultivarse en forma masiva e introducirse en sitios con poblaciones del BEF.

Las encuestas preliminares para los parasitoides nativos del BEF en Michigan encontraron niveles sumamente bajos de *Atanycolus hicoriae* Shenefelt y *A. simplex* (Cresson) (Hymenoptera: Braconidae) que estaban relacionados con larvas del BEF (Liu et al. 2003). Una especie nueva del mismo género, *A. cappaerti* Marsh y Strazanac, se describió posteriormente del BEF en Michigan (Marsh et al. 2009). Dos especies adicionales, *A. tranquebaricae* Shenefelt y *A. nigropyga* Shenefelt, también se notificaron de trozos de fresnos infestados por el BEF en Michigan (Cappaert y McCullough 2009). Tres especies, *A. cappaerti*, *A. hicoriae* y *A. longicauda* Shenefelt (identificadas por P. Marsh, Museo Nacional de Estados Unidos, jubilado), se criaron de troncos

infestados por el BEF del sudoeste de Ontario (Lyons 2010). Dos de estas especies, *A. cappaerti* y *A. hicoriae*, además de otra especie, *A. disputabilis* (Cresson), también se recolectaron de troncos de abedules blancos infestados con *Agrilus anxius* en las inmediaciones de Sudbury, Ontario. En sitios de estudios cerca de Lansing MI, el parasitismo del BEF por *Atanycolus* spp. aumentó de nueve especímenes a 774 en un año (Duan et al. 2012a). Alrededor del 93% de estos parasitoides fueron *A. cappaerti* y el resto fueron *A. hicoriae* (5%), *A. tranquebaricae* (1%) y *A. disputabilis* (<1%). Cappaert y McCullough (2009) empezaron las investigaciones sobre la biología y el potencial de biocontrol de *A. cappaerti*. Las tasas de parasitismo observadas fluctuaron entre el 9 y 71% en dos sitios durante dos años, lo cual sugiere que estas especies pueden ser un agente eficaz de control biológico para el BEF. Esos autores observaron un ciclo de vida bivoltino para este ectoparasitoide idiobionte con un tiempo de generación menor de 30 días. La proporción macho: hembra de parasitoides fue de 1:6 con fechas promedios similares de emergencia de adultos para los sexos a finales de mayo. Duan et al. (2012a) indicaron una proporción macho:hembra muy distinta para *A. cappaerti* de 1:0.6. Los machos y hembras de *Atanycolus* spp. criados de los trozos de troncos recolectados en Ontario fueron extremadamente longevos con hembras y machos viviendo un promedio de más de 100 días a 21°C (Lyons 2010). Los estudios recientes indican que *Atanycolus* spp. pueden atacar al BEF bajo una corteza mucho más gruesa de lo que puede introducirse a *T. planipennis* (Abell et al. en prensa).

Leluthia astigma (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae), el cual se relacionó en forma positiva con los cadáveres del BEF, se notificó como el parasitoide más abundante que atacó al BEF en Delaware CO., Ohio, con una tasa de parasitismo de 2.1% (Kula et al. 2010). La especie es un ectoparasitoide idiobionte solitario que está distribuido ampliamente en Norteamérica desde California y Guadalajara, México hasta Carolina del Norte y Quebec (Kula et al. 2010). Los adultos que emergieron de los capullos produjeron exitosamente una generación nueva en las larvas del BEF insertadas en las ramitas de fresno (Kula et al. 2010). Se recolectados dos especímenes de esta especie en Ontario (Lyons 2010). Un espécimen se recolectó de fresnos verdes infestados con el BEF cerca de Windsor y el otro espécimen se recolectó de un roble rojo infestado con *Agrilus bilineatus* cerca de Midland. Aunque se notificó de su presencia en Quebec (Smith et al. 1979) estos son los primeros especímenes recolectados de otras partes de Canadá.

Spathius floridanus Ashmead (Hymenoptera: Braconidae) (= *S. simillimus* Ashmead; sinónimo establecido por Marsh y Strazanac 2009) fue una de las especies que encontraron Liu et al. (2003) y Duan et al. (2012b) durante las encuestas realizadas de parasitoides nativos del BEF en Michigan. Los hospedantes conocidos para *S. floridanus* incluyen a *Agrilus anxius* Gory, *A. bilineatus* (Weber), *Chrysobothris femorata* (Oliv.) (Coleoptera: Buprestidae); *Magdalis olya* (Herbst) (Coleoptera: Curculionidae); *Phymates aereum* (Newman) y *Xylotrechus colonus* (F.) (Coleoptera: Cerambycidae). Anteriormente se ha notificado la presencia de esta especie desde Nueva Brunswick hasta Ontario en Canadá y desde Wisconsin hasta Texas (Marsh y Strazanac 2009) en EE. UU. Marsh y Strazanac (2009) consideraron a esta especie como el *Spathius* nativo más prometedor como candidato para el control biológico del BEF. Se criaron quince especímenes de este parasitoide de roble rojo infestado con *A. bilineatus* cerca de Midland, Ontario, pero las especies no se han criado del BEF en Ontario (Lyons 2010). *Spathius* spp. son gregarios (Marsh y Strazanac 2009) y por ende este registro puede representar un número pequeño de eventos de oviposición. Otra especie, *Spathius*, la cual aún no se ha descrito se ha notificado recientemente del BEF en Michigan (Marsh y Strazanac 2009).

Balcha indica (Mani y Kaul) (Hymenoptera: Eupelmidae) fue uno de los parasitoides que se encontró durante las encuestas para los parasitoides nativos del BEF en Michigan (Liu et al. 2003, Duan et al. 2012a) y Pensilvania (Duan et al. 2009). *Balcha indica* es en sí una especie exótica que es nativa del sudeste de Asia (registros de recolección de Birmania, India, Tailandia y Vietnam) y probablemente llegó a Norteamérica en algunos hospedantes que distintos al BEF, puesto que su descubrimiento en Virginia en 1994 precede la fecha de la posible llegada del BEF en dicha área (Gibson 2005). En Norteamérica solo se conocen a las hembras de *B. indica*, aunque se sabe de

la presencia de los machos en Asia (Gibson 2005). Este parasitoide fue la especie más abundante que se crió del BEF en Pensilvania y se reprodujo exitosamente de manera partenogenética en el BEF en el laboratorio (Duan et al. 2009). El historial de vida y los estadios de este ectoparasitoides solitario fue descrita por Duan et al. (2011a). Las avispas parasitan a las larvas, prepupas y pupas del hospedante. Las hembras empiezan a ovipositar durante la primera semana después de la emergencia con los niveles máximos de la emergencia sucediendo varias semanas después. Los huevecillos se adjuntan al hospedante mediante una hebra pegajosa. La fecundidad promedio fue de 35.8 huevecillos. Las larvas del primer estadio presentan cápsula cefálica esclerotizada y mandíbulas mientas que en los estadios posteriores no lo tienen. Toma alrededor de tres meses para completar una generación a 25°C. El tiempo prolongado de la generación univoltina para *B. indica* podrá dificultar los métodos eficaces de cría y por eso limita su utilidad como un agente de control biológico aumentativo contra el BEF (Duan et al. 2011b). Se han recolectado poblaciones bajas de *B. indica* de forma rutinaria de los troncos infestados con el BEF en Ontario (Lyons 2010).

Un solo espécimen de *Metapelma spectabile* Westwood (Hymenoptera: Eupelmidae) se crió de un trozo de fresno infestado con el BEF que se recolectó cerca de Windsor, Ontario. Esta especie se ha notificado de *Agrilus angelicus* Horn pero no existen registros anteriores de Canadá (Burks 1979).

Los trozos de troncos de fresno verde recolectados de un sitio en el sudeste de Ontario en las etapas posteriores del brote del BEF produjeron números sin precedentes de *Phasgonophora sulcata* Westwood (Hymenoptera: Chalcididae) (Lyons 2010). De los 215 insectos que se criaron de estos trozos, 146 fueron *A. planipennis* y 54 *P. sulcata*. En una localidad cercana solo ocho ejemplares de *P. sulcata* emergieron de los trozos, lo cual es una densidad muy baja comparada con 648 adultos del BEF que emergieron, lo que representa solamente una tasa de parasitismo alrededor del 1.2%. Aparentemente, las tasas de parasitismo varían de manera espacial y probablemente también de manera temporal. En el 2007, trampas de tiras pegajosas se colocaron en un lote de madera en Essex Co. del cual se obtuvo un número elevado de *P. sulcata*. Seiscientos BEF adultos y 407 adultos de *P. sulcata* se recolectaron de las trampas lo cual sugiere una tasa de parasitismo de 40.7% (Lyons 2010). En el laboratorio, la emergencia promedio de *P. sulcata* fue posterior a la emergencia promedio del BEF lo cual corresponde con el período de vuelo tardío que se observó del parasitoide, en relación al del hospedante observado en campo en Ontario (Lyons 2010). El período de vuelo del parasitoide parece estar sincronizado con el período de oviposición del BEF y apoya la observación realizada por Haack et al. (1981) de que el parasitoide podrá poner huevecillos cerca de los huevecillos hospedantes. La longevidad promedio para los adultos macho y hembra de *P. sulcata* fueron de aproximadamente 25 y 39 días, respectivamente (Lyons 2010). Esta es una de las especies de parasitoides criadas del BEF en Michigan (Liu et al. 2003) y se ha notificado de *Agrilus bilineatus* (Weber) (Haack et al. 1981), *A. anxius* Gory (Akers y Nielsen 1990) y *A. granulatus liragus* Barter y Brown (Barter 1965).

Otras especies de parasitoides himenópteros que se han criado del BEF pero que no se han encontrado en Ontario incluyen: *Eupelmus pini* Taylor (Eupelmidae); tres icneumónidos, *Dolichomitus vitticrus* Townes, *Orthizema* sp., y *Cubocephalus* sp. (Duan et al. 2009); y especies no determinadas de *Dolichomitus* (icneumónido) y *Eurytoma* (Eurytomidae) (Duan et al. 2012a). Duan et al. (2009) criaron exitosamente la especie partenogenica y telitoca *E. pini* en larvas, prepupa y pupa del BEF insertados en ramitas de fresno en laboratorio.

A excepción de los parasitoides nativos, otros organismos norteamericanos han realizado una transición limitada alimentándose de las poblaciones del BEF. Algunos coleópteros depredadores (por ejemplo, *Enoclerus* sp. (Cleridae), *Catogenus rufus* (F.) (Passandridae) y *Tenebriodes* sp. (Trogossidae) se han recolectado alimentándose de los estadios de vida del BEF debajo de la corteza de los árboles hospedantes (Liu et al. 2003). Según Cappaert et al. (2005), la depredación causada por el pájaro carpintero es probablemente la fuente más importante de mortalidad en las

poblaciones del BEF en Michigan y representa del 9 al 95% de la mortalidad. Después de las defensas de los árboles hospedantes, la depredación causada por el pájaro carpintero fue la segunda fuente más alta de mortalidad para las poblaciones experimentales del BEF (Duan et al. 2010). Lindell et al. (2008) han observado pájaros carpinteros peludos, aterciopelados y de barriga roja alimentándose del BEF y recomendó que se mantuvieran las condiciones (por ejemplo, sitios de nidos) que atraen a los pájaros carpinteros. Irónicamente, los pájaros carpinteros tienen poco impacto en las poblaciones del BEF en Asia (Duan et al. 2012a). La avispa depredadora, *Cerceris fumipennis* Say (Hymenoptera: Crabronidae), se ha visto recolectando BEF adultos para abastecer a su nido. Aunque el impacto de la avispa en las poblaciones del BEF no es considerable, esta especie podría ser una herramienta de biovigilancia útil para detectar las poblaciones del BEF a bajas densidades (Marshall et al. 2005; Careless et al. 2009).

2.3 Control biológico con microorganismos entomopatógenos

La falta de depredadores, la aparente resistencia baja del árbol hospedante, la disponibilidad de alimento y condiciones climáticas favorables, contribuyen en su conjunto a la dispersión de insectos exóticos invasores (Hajek 2009, Tanis y McCullough 2012). El barrenador esmeralda del fresno (*Agrilus planipennis*) (BEF), el cual se descubrió en Norteamérica en el 2002, aún resulta difícil de detectar a nivel endémico (Crook y Mastro 2010). La erradicación dejó de ser una opción y la estrategia actual es disminuir la dispersión del BEF utilizando varias herramientas (Marchant 2007). Sin embargo, se necesitan medidas eficaces para disminuir la dispersión del BEF, contener las infestaciones aisladas y mantener sus poblaciones en un umbral de tolerancia o inferior a éste para la supervivencia de los fresnos (Liu y Bauer 2008a). Independientemente de los reglamentos y las actividades de tala de árboles, se están aplicando algunos insecticidas contra el BEF en EE. UU. y Canadá pero su uso es limitado, costoso y difícil de aplicar a gran escala. Como parte de un enfoque de manejo integrado de plagas, se está aumentando el interés en el control biológico con entomopatógenos ya que los fresnos se han plantado en su mayoría en ciudades y en estas áreas, desde el punto de vista ambiental, el uso de agentes de control microbial es más convincente (Hajek y Bauer 2007). Los microorganismos entomopatógenos son naturales y podrían ofrecer una solución parcial, no de erradicar al BEF sino de disminuir el impacto de esta plaga en Norteamérica.

Se han considerado diferentes microorganismos entomopatógenos para utilizarse contra el BEF, pero el uso del hongo ha recibido mucha más atención que otros organismos tales como nematodos, microsporidios o bacteria (Hajek y Bauer 2007). La investigación científica detrás del desarrollo del control biológico del BEF con entomopatógenos resulta relativamente limitada. Los siguientes párrafos presentarán los principales estudios realizados por diferentes equipos de investigación para mejorar el conocimiento acerca del uso de entomopatógenos contra el BEF.

2.3.1 Control biológico con hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos tales como *Beauveria*, *Metarhizium*, *Isaria* y *Paecilomyces* son solo algunos géneros de hongos que se sabe que son patogénicos contra un gran número de insectos (Humber 2012). Igualmente, se han utilizado en el manejo de varios insectos defoliadores en la agricultura como el escarabajo de la papa, el barrenador del maíz, mosquitas blancas, saltamontes, langostas, barrenadores, áfidos, picudos (Inglis et al. 2001, Vandenberg 2007a).

Entre los insectos barrenadores de la madera, se han obtenido resultados prometedores para el aserrador japonés del pino (*Monochamus alternatus* Hope), el escarabajo asiático de cuernos largos (*Anoplophora glabripennis* (Motschulsky)) utilizando bandas de hongos, el barrenador esmeralda del fresno (*A. planipennis*), el escarabajo de la corteza de la picea (*Ips typographus*(L.)) en donde se demostró la transmisión horizontal de *B. bassiana* entre los adultos (Hajek and Bauer 2007, Kreutz et al. 2004).

Algunos productos comerciales a base de microorganismos ya están disponibles en Canadá y EE. UU., entre ellos, BotaniGard®, Met52®, Naturalis L® y Mycotrol EL® (Kabaluk et al. 2010).

2.3.2 Modo de acción de los hongos entomopatógenos

En comparación con otros entomopatógenos, los hongos pueden invadir a los insectos vivos a través de la cutícula y proliferar en la cavidad del cuerpo (Liu y Bauer 2006). El conidio de un aislado apropiado germinará en contacto con la cutícula del insecto, producirá enzimas, invadirá el cuerpo del insecto, producirá toxinas y eventualmente matará al insecto (Inglis et al. 2001). Si las condiciones ambientales son apropiadas, el hongo emergerá del cuerpo del insecto y producirá conidios, los cuales también pueden dispersarse horizontalmente a otros insectos susceptibles con el viento o por contacto directo. Los hongos entomopatógenos pueden causar infecciones en todos los estadios de vida pero no todos los estadios en el ciclo de vida del insecto son igualmente susceptibles a la infección (Inglis et al. 2001; Hajek y St. Leger, 1994). Todos los estadios de vida del BEF, excepto los huevecillos, fueron susceptibles a la infección causada por el hongo bajo condiciones de campo (Bauer et al. 2004c). Debido a que los adultos del BEF se encuentran activos en el follaje de la copa del árbol o se movilizan en el tronco, representan un objetivo más fácil que las larvas. Los adultos también pueden entrar en contacto con conidios rociados en los troncos del fresno en cuanto ellos emerjan, mientras caminan u ovipositan, y en el follaje mientras se alimentan (Liu y Bauer 2006, 2008a,b). Sin embargo, las larvas también son susceptibles debido a que el alto nivel de humedad bajo la corteza proporciona condiciones ideales para la germinación de las esporas de los hongos en la cutícula del insecto (Liu y Bauer 2006).

2.3.3 Resultados más importantes de la investigación sobre entomopatógeno del BEF

Cuando se descubrió al BEF en Norteamérica en el 2002, las opciones de control disponibles eran limitadas. Según Bauer et al. (2004c), la única forma de controlar al BEF en ese momento era la identificación y destrucción de árboles infestados.

En el 2003 y 2004, Bauer et al. (2004b) realizaron una encuesta sobre hongos entomopatógenos que se encontraron en más de 6000 larvas que se recolectaron en un lote de madera en Michigan. Por sorpresa, el 2% de los BEF inmaduros estaban infectados con cinco especies de hongos: *Beauveria bassiana* (24 aislados), *Isaria* (= *Paecilomyces*) *farinosus* (30 aislados), *I.* (= *Paecilomyces*) *fumosoroseus* (7 aislados), *Verticillium lecanii* (36 aislados) y *Metarhizium anisopliae* (2 aislados).

Bauer y colegas (2006) fueron los primeros en realizar experimentos para documentar si *Bacillus thuringiensis* (Bt) y *Beauveria bassiana* podían utilizarse contra el BEF basándose en los registros de seguridad de estos microorganismos y su compatibilidad con el biocontrol. Se realizaron pruebas a cuatro cepas registradas de Bt contra el BEF y algunas cepas se encontraron tóxicas en concentraciones altas. Se necesitaron tasas de 4 a 12 veces mayores del nivel máximo que el especificado en la etiqueta para lograr un 66 al 98% de mortalidad 6 días después de los tratamientos (Bauer et al. 2006). Se llegó a la conclusión de que se necesitaba investigación adicional para identificar la toxina activa y eventualmente desarrollar una herramienta eficaz para la aspersión aérea. Bauer y Londono (2010) preseleccionaron 25 cepas de Bt que se sabía que tenían toxicidad a coleópteros incluyendo a SDS-502 y Bt-Fc. El Bt SDS-502 fue el más tóxico. Este Bt expresa la toxina proteína Cry8Da la cual ha demostrado actividad en algunos coleópteros. La mortalidad de los adultos del BEF expuestos a Bt SDS-502 ocurrió 96 horas después de alimentarse de las hojas asperjadas y la mortalidad total fue similar para ambas cepas de Bt.

En 1995, el hongo entomopatógeno *B. bassiana* var. GHA se registró bajo la marca BotaniGard® contra plagas forestales y de árboles de sombra. Bauer et al. (2004b) fueron los primeros en probar BotaniGard® contra el BEF con el objetivo de identificar un producto para posibles usos en

un programa de aspersión aérea.

Bajo condiciones de laboratorio (caja Petri y follaje cortado), Liu y Bauer (2006) expusieron a los adultos del BEF a diferentes aislados de *B. bassiana* y *M. anisopliae* para documentar su virulencia (aislados de *B. bassiana*: ARSEF 6393, 7152 y GHA y dos aislados de *M. anisopliae*: ARSEF 7180 y 7234). Los BEF se sumergieron en una de las dos dosis ensayadas: 10^6 o 10^7 conidios/ml. Los resultados demostraron que los adultos del BEF eran susceptibles a *B. bassiana* y *M. anisopliae* cuando recibieron tratamiento con sumergimiento directo así como con exposición foliar. La mortalidad acumulada a 6 d después del tratamiento fluctuó entre el 80% al 97% y el 97% al 100% para las concentraciones 10^6 y 10^7 conidios/ml respectivamente. Los valores promedio de tiempo de muerte fueron más bajos para *B. bassiana* GHA con 4.6 y 4.2 d a 10^6 y 10^7 conidios/ml respectivamente.

Posteriormente, en el 2003, bajo condiciones de invernadero y campo se estudió la virulencia, los efectos letales y subletales de *B. bassiana* cepa GHA (BotaniGard ES) en adultos y larvas del BEF por Liu y Bauer (2008a) con aspersión tópica y tratamientos de bandas de hongos. Los resultados de los estudios en invernadero y campo demostraron que *B. bassiana* cepa GHA tenía un buen potencial como herramienta de manejo para suprimir las densidades de población del BEF. Las aspersiones a troncos preemergentes de principios del verano con *B. bassiana* infectaron y mataron a los adultos del BEF, los cuales se infectaron debajo de la corteza antes de salir, posiblemente a través de la entrada de los conidios de los hongos en las grietas de la corteza, durante la emergencia cuando masticaron a través de la corteza tratada con el hongo o después de la emergencia mientras caminaban o ponían huevecillos. Los resultados también sugieren un efecto subletal incluyendo longevidad acortada del adulto y un período de desarrollo larvario prolongado. Finalmente, en julio del 2003, una banda de hongo impregnada con cultivo de esporulación de hongo *B. bassiana* cepa GHA se aplicó a los troncos de fresno no infestados en el campo, cuyo objetivo eran los adultos del BEF en jaula. La ventaja de utilizar una banda de hongo fue la persistencia de los conidios virulentos por un mes. A diferencia de los resultados que se obtuvieron con *A. glabripennis*, Liu y Bauer (2008a) indicaron que esta técnica puede no ser eficaz contra el BEF debido a que los adultos vuelan más de lo que caminan.

En el 2004-2005, Liu y Bauer (2008b) evaluaron el efecto de la cepa GHA de *B. bassiana* aplicada con un aspersor de CO₂ de mochila en el follaje del fresno o el tronco del árbol con poblaciones recientemente colonizadas y bien establecidas del BEF. Los árboles que recibieron tratamiento con *B. bassiana* GHA contenían 41% menos larvas más jóvenes que los árboles de control y 20% de las larvas en los árboles de las áreas sometidas a tratamiento estaban infectadas después de 14 días de incubación en laboratorio. Los árboles sometidos a tratamiento con *B. bassiana* sufrieron menos muerte regresiva en la copa que los controles, con un aumento en muerte regresiva del 34% para los que recibieron tratamiento en comparación a un aumento del 57% para los árboles de control. Los tratamientos con hongos disminuyen considerablemente la muerte regresiva en la copa. Para los árboles que recibieron tratamiento con la cepa GHA, la densidad de larvas fue casi la mitad que la de los controles, con una densidad promedio de 55 y 103 larvas/m², respectivamente. La densidad promedio del adulto que emergió fue de 57 adultos/m² para los árboles control mientras que solamente 21 adultos emergieron de los árboles sometidos a tratamiento con hongos. Además, Liu y Bauer (2008b) encontraron una buena persistencia del conidio en el campo. Después del período de exposición de dos días al follaje que había recibido tratamiento, la mortalidad del adulto fluctuó del 78% para aquellos expuestos al follaje recolectado 24 h después de la aplicación del hongo hasta un 100% en follaje recolectado 2 h después de la aspersión. Los adultos expuestos al follaje que había sido sometido a tratamiento tenían una vida corta en comparación con aquellos expuestos al follaje control. Así mismo, el tiempo más bajo para la muerte se observó en los adultos expuestos al follaje recolectado 2 h después de la aplicación. La mortalidad del adulto sucedió principalmente entre 4 y 7 días después de la exposición al follaje que había recibido tratamiento con *B. bassiana* (Liu y Bauer 2008b). Liu y Bauer (2008b) han

demostrado una mayor eficacia de GHA en campo cuando se asperja en troncos antes de la emergencia del adulto. Estos autores, encontraron tasas de infección entre el 58.5 al 83% en BEF adultos en el campo. También observaron que la tasa de infección en larvas establecía una correlación entre la densidad de la larva en el campo. Por consiguiente, ellos llegaron a la conclusión de que había transmisión horizontal de la enfermedad.

Se han realizado pocos ensayos que combinaron hongos entomopatógenos y plaguicidas químicos. Vandenberg et al. (2007b, 2008) evaluaron el impacto de *B. bassiana* utilizado solo o en combinación con imidacloprid en árboles infestados en un vivero. La mortalidad de los adultos del BEF expuestos a hojas que recibieron tratamiento con imidacloprid y el hongo fue igual o mayor que la de los BEF expuestos a las hojas que recibieron solamente tratamiento con hongo.

Para ser una herramienta de control eficaz contra el BEF invasor, el hongo *B. bassiana* GHA necesita aplicarse durante un período apropiado del tratamiento. El objetivo son los adultos que emergen a principios del verano, durante el período de alimentación en la maduración y antes que las hembras ovipositen para maximizar el impacto en las poblaciones de BEF. Castrillo et al. (2010a) realizaron un estudio sobre deposición y persistencia de *B. bassiana* en condiciones de campo en un árbol de vivero. *B. bassiana* GHA se asperjó en trozos de fresno y en la copa del árbol con un aspersor de mochila y aplicador hidráulico. Los cálculos de la unidad de formación de colonias (CFU, por su sigla en inglés) para *B. bassiana* obtenidos después de presionar las superficies de los folíolos presentaron conteos mayores después de 7 días, frente a 14 días en dos pruebas de tres que se realizaron. Las muestras tomadas 28 días después de la tercera aplicación aún mostraban CFU viables. Catorce días después de la aplicación en la copa, el número de CFU en la parte superior e inferior del follaje fue finalmente similar. La disminución del follaje superior puede explicarse con la exposición a luz ultravioleta con la reducción consecuente en viabilidad (Inglis et al. 1993, Moore et al. 1993) y el lavado con la precipitación (James et al. 1995). La copa densa y montada en los fresnos podría proporcionar sombra para minimizar el daño de los rayos UV al conidio en la parte superior de la hoja. Incluso cuando se redujo el nivel de inóculo a 2 a 5 pliegues menos en las hojas, aún se observó mortalidad entre los BEF expuestos a estas hojas. Por sorpresa, aún se obtuvieron CFU de las hojas de fresnos aproximadamente 28 días después de la última aspersión en el 2006. Para seguir la persistencia de los aislados de *B. bassiana* GHA en ambientes naturales después de la liberación masiva, se crearon cebadores y sondas de PCR en tiempo real (Castrillo et al. 2008).

Castrillo et al. (2010a) han demostrado que incluso en la corteza, 14 días después de la aspersión, la mortalidad del BEF expuesto a la corteza asperjada durante 24 h fue de 40%. La persistencia del conidio en la corteza mostró una tendencia similar al igual que con el follaje. A diferencia de los folíolos, los cálculos de la corteza indican que la mortalidad continúa comparable entre 7 y 14 días después de cada aspersión. Una mejor persistencia en la corteza puede deberse a la presencia de rajaduras y grietas en la corteza del fresno en la cual el conidio se aloja durante la aspersión a alta presión. Los datos obtenidos por Castrillo et al. (2009 a,b) sugieren que los BEF adultos transportan al hongo de un árbol al otro.

En los años posteriores al descubrimiento del BEF en Michigan, se realizó un muestreo de campo de supuestos aislados de hongos nativos patógenos al BEF. Entre el 2002 y 2006, *B. bassiana* se aisló de las larvas y prepupas de los fresnos infestados que se talaron en Michigan. Recientemente, ellos compararon la virulencia de los aislados representativos contra el BEF (Castrillo et al. 2010b), pero no encontraron ninguna diferencia considerable en la mortalidad entre las cepas nativas y GHA. Después de 6 días posterior al tratamiento, la mortalidad promedio entre los BEF control fue de $18.3 \pm 3\%$. La mortalidad calculada de GHA a 3.6×10^6 conidio/ml, la misma dosis utilizada para las cepas derivadas del BEF fueron $90 \pm 12\%$. Derivado de su análisis, Castrillo et al. (2010b) concluyeron que el suelo sirve como la fuente principal de inóculo del hongo que puede dispersarse a los troncos de los árboles mediante la lluvia salpicada o por las corrientes

de aire. Así mismo, la dispersión natural puede suceder a través de los pájaros, como los pájaros carpinteros, cuando ellos buscan forraje en fresnos infestados por el BEF (Lindell et al. 2008). Según Castrillo et al. (2010b), la dispersión de propágulos de *B. bassiana* nativos, posiblemente mediante corrientes de aire, salpicado de lluvia o insectos infectados, en los troncos de fresnos limitan la dispersión amplia y la acumulación intensa de inóculos que podría provocar epizootia en los hongos. Las hembras y el macho del BEF se alimentan del follaje del fresno durante su estado adulto, pero las hembras también pasan mucho tiempo en contacto con la corteza de los fresnos durante la emergencia, cuando muerden y se introducen a la corteza del árbol y cuando se aparean y buscan sitios para ovipositar durante la deposición de huevecillos (Liu y Bauer 2006; 2008 a,b).

La forma de respuesta del inóculo y el nivel de inóculo presente en troncos de fresnos constriñe la prevalencia de la infección en poblaciones del BEF (Castrillo et al. (2010b). La corteza es una fuente más accesible de infección del BEF y Castrillo et al. (2010b) sugieren la aplicación de GHA antes de la emergencia del adulto puesto que la corteza es un reservorio y GHA es virulento.

Los patógenos nativos tienen una ventaja importante sobre los enemigos naturales exóticos puesto que ellos ya se han adaptado al hábitat de la plaga y presentan menos riesgo de perturbación de la comunidad (Johny et al.2012a). Johny et al. (2012a) buscaron entomopatógenos nativos en el sur de Ontario y la mayoría de los aislados se recuperaron de las pupas y larvas del BEF, en menor proporción de BEF adultos. Los aislados se concentraron en dos grupos principales, *Beauveria bassiana* y *Beauveria pseudobassiana*. Todos los aislados de *Beauveria* spp. que se recuperaron de los BEF y a los cuales se les hicieron bioensayos se encontraron patógenos con variabilidad en su virulencia a los BEF adultos. Se observaron diferencias considerables en la mortalidad acumulada del insecto entre 4 y 14 días después de los tratamientos con cuatro concentraciones distintas de conidios entre 8 aislados derivados del BEF y el aislado GHA comercial. El aislado L49-1AA fue casi cinco veces más virulento que GHA mientras que LD20A y LB25C fueron los únicos aislados que fueron considerablemente menores (alrededor de 3 veces) que el aislado comercial. El aislado L49-1AA mató a los adultos del BEF más rápido que todos los otros aislados con un tiempo promedio de supervivencia de 6.16 días. Sin embargo, no difiere considerablemente de GHA (6.93 días) y B4B (7.4 días). El aislado L49-1AA tiene el LC50 más bajo, seguido de GHA. Un aspecto importante que se destacó está relacionado con la producción de conidio, en donde la formación más alta de conidio se observó para L49-1AA (1.38×10^8 conidios/insecto). Tal como indicó Johny et al. (2012a), para desarrollar una estrategia de autocontaminación, la producción elevada de conidios en los cadáveres podría compensar parcialmente la supervivencia baja debido a la temperatura, humedad y radiación UV.

En una encuesta, Johny et al. (2012b) encontraron seis cepas de hongos que pertenecían a *Isaria farinosa* (Holmsk) (anteriormente *Paecilomyces farinosus*) y un *P. lilacinum* nuevo colonizando al BEF en el sur de Ontario. Estos aislados de patógenos pueden haberse adaptado al BEF en Ontario y ahora forman parte de los agentes de control natural en Canadá, luego de haberse recuperado por dos años.

Las estrategias existentes de control de campo de aplicar micoinsecticidas basados en GHA a la corteza antes de la emergencia del barrenador podrían demostrar ser viables puesto que esta cepa (GHA) es virulenta al BEF (Liu y Bauer 2006, 2008a,b) y también puede persistir por varias semanas en cortezas de fresnos (Castrillo et al. 2010a). Sin embargo, al principio del ciclo de infestación, puede ser menos probable que los BEF adultos encuentren inóculos de hongos en la corteza (Castrillo et al. 2010b). Cuando los adultos llegan por primera vez durante el ciclo de infestación, por lo general atacan a árboles saludables a lo largo de la parte superior del tronco (datos inéditos en Castrillo et al. 2010b). El BEF se alimenta del follaje del fresno durante toda su vida. Por consiguiente, la aspersion de la corteza puede complementarse con trampas disponibles en la copa del árbol para entregar al hongo a través de una estrategia de autocontaminación. En el

2010 y 2011, Lyons et al. (en prensa) modificaron una trampa existente de insecto para permitir la autocontaminación de insectos con hongos entomopatógenos. Los resultados de campo fueron prometedores y demostraron una persistencia durante toda la temporada del inóculo y la recaptura de los adultos del BEF en trampas pegajosas que contenían esporas.

Beauveria es un entomopatógeno de amplio espectro y su uso puede limitarse por el efecto negativo secundario en los insectos útiles. Dean et al. (2012) realizaron un estudio para determinar la susceptibilidad de *Spathius agrili* y *Tetrastichus planipennisi* a *B. bassiana* en el laboratorio. De manera interesante, *T. planipennisi* tiene una susceptibilidad muy baja o ninguna a *B. bassiana* cepa GHA en condiciones de laboratorio. Todos los 88 BEF expuestos a las ramitas de fresnos inoculadas con el hongo murieron a los 6 días. *S. agrili* fue ligeramente más susceptible a *B. bassiana* con una diferencia promedio de 13% de mortalidad entre los grupos sometidos a tratamiento y los de control. Esto podrá no ser una consecuencia biológica considerable puesto que murieron solo 13 *S. agrili* de los 84 que se expusieron.

Kyei-Poku et al. (2008, 2011) aislaron a un microsporidio nuevo del barrenador bronce del abedul y los estudios continúan para determinar si el patógeno puede infectar al BEF. Kyei-Poku et al. (2009) recuperaron las especies nuevas de nematodos estrechamente relacionadas con las especies *Rhabditis* de los cadáveres del BEF en Ontario. El aislado mató a las larvas del BEF, *Tenebrio molitor* y *Zophobas morio* en un período de 2 a 4 días. Este nematodo se está investigando aún más para el posible control biológico del BEF.

En conclusión, los hongos entomopatógenos pueden representar un complemento a otras medidas de control biológico, mecánica y legislativa para disminuir la dispersión del BEF. La aplicación directa de las cepas eficaces puede disminuir las poblaciones del BEF. Además, la diseminación del hongo por autocontaminación podrá ayudar a llegar a otros adultos mientras se aparean en la copa. El hongo entomopatógeno representa un costo bajo y un producto ambientalmente aceptable. Además de la mortalidad directa del BEF, debe demostrarse el impacto del hongo entomopatógeno en poblaciones del BEF y la reducción en la mortalidad de árboles.

4.

5. Proceso normativo relacionado con la importación, cría, liberación y movilización nacional de agentes de control biológico de insectos plagas

En Norteamérica, la importación y liberación de agentes entomófagos de control biológico requieren que el interesado presente una solicitud de permiso de importación y una petición. La petición debería incluir todos los elementos que se esbozan en las Norma Regional sobre Medidas Fitosanitarias (NRMF) 12: 2008. Para la primera liberación de agentes fitófagos no nativos para el control biológico, se deberían utilizar las directrices indicadas en la NRMF 7: 2008.

Las directrices en la NRMF 7: 2008 y la NRMF: 12 2008 tienen la finalidad de ayudar con la redacción de las peticiones para la liberación de agentes de control biológico. Las peticiones brindan a los revisores y funcionarios normativos la información necesaria para evaluar el riesgo de introducciones de agentes no nativos previstos para el control biológico de insectos plagas. Puesto que el proceso de revisión de petición en Canadá, EE. UU. y México incluye la consulta con los otros dos países de la NAPPO, estas directrices permiten estandarizar el formato de la petición. Las directrices también podrían utilizarse para los agentes de control biológico de otras plagas objetivo (por ejemplo, ácaros, nematodos y moluscos) a criterio de la Organización Nacional de Protección Fitosanitaria.

Las normas de la NAPPO representan una herramienta importante para armonizar los datos necesarios para la liberación de agentes de control biológico en Norteamérica. Todas las peticiones presentadas a la ACIA, al APHIS y Sanidad Vegetal deben cumplir con las normas establecidas en las directrices de la NAPPO.

Los siguientes apartados describen los procesos normativos específicos relacionados con la importación, cría y liberación de agentes de control biológico en cada país de la NAPPO.

3.1 Procesos normativos en Estados Unidos

En EE. UU., los agentes de control biológico de las plagas de plantas y malezas nocivas están reglamentados por la *Plant Protection Act* (2000). La *Plant Protection Act* brinda una definición de agentes de control biológico y reconocimiento de su potencial para controlar plagas de plantas. La Oficina de Sanidad Vegetal y Cuarentena (PPQ, por su sigla en inglés) del Servicio de Inspección de Sanidad Agropecuaria (APHIS, por su sigla en inglés) del Departamento de Agricultura de EE. UU. (USDA) administra la *Plant Protection Act*. Esto les brinda la autoridad de reglamentar la importación, movilización interestatal y liberación ambiental de los agentes de control biológico.

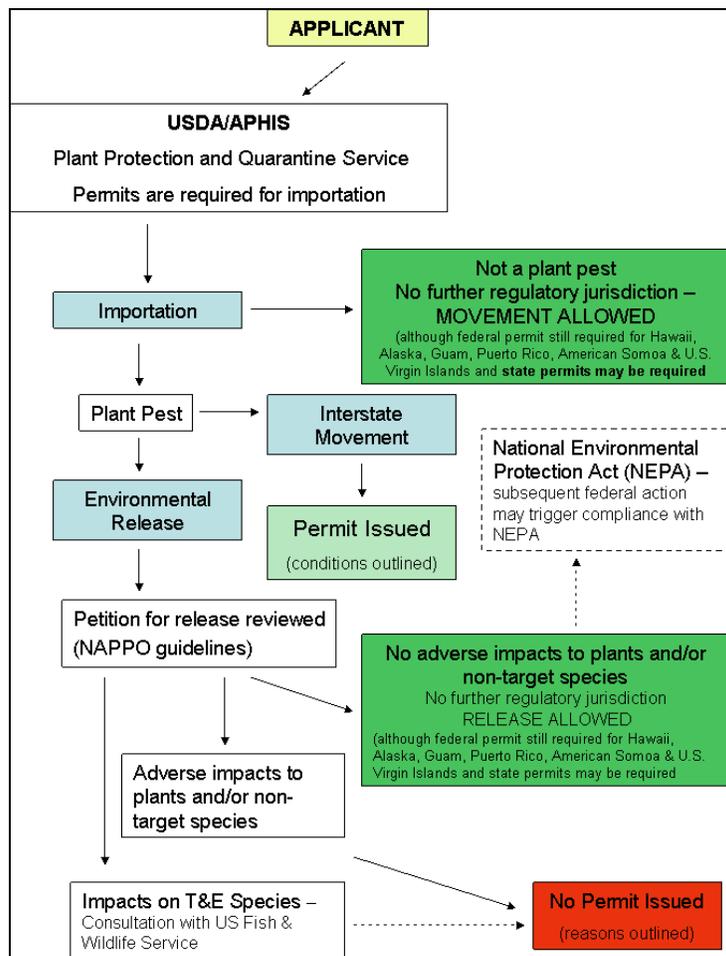
Los permisos separados, expedidos por el USDA-APHIS-PPQ, son necesarios para la importación, movilización interestatal, posesión y/o liberación de agentes de control biológico al medio ambiente (APHIS 2012; Universidad de Florida 2012). Debe completarse el formulario 526 de PPQ (APHIS 2012). El formulario está disponible en línea utilizando el sistema ePermit del APHIS (véase http://www.aphis.usda.gov/permits/learn_epermits.shtml). El sistema ePermit permite al solicitante presentar y rastrear las solicitudes de permiso, recibir permisos y hacer solicitudes de renovaciones y enmiendas en línea. El proceso de emisión de permisos puede tomar cuatro a seis meses para completarse. También podrá ser necesaria la aprobación posterior de un permiso por parte de cada estado. Para los agentes de control biológico que se sabe que son plagas de plantas, se requiere un permiso de importación para su entrada a EE. UU. La oficina de PPQ inspeccionará los agentes biológicos en una estación de inspección en el punto de entrada y no se aplicarán requisitos adicionales para la movilización nacional de los agentes (excepto para Hawái, Alaska, Guam, Puerto Rico, Samoa Americana y las Islas Vírgenes de EE. UU. en donde se requieren permisos federales). También podrán requerirse permisos estatales.

Para los agentes de control biológico que pueden ser plagas de plantas, se requiere un permiso para la importación así como para la movilización interestatal, cuando corresponda (las condiciones para la movilización se esbozarán en el permiso). Los permisos para importar agentes de control biológico de lugares fuera del continente se expiden a instalaciones de contención aprobadas con el fin de verificar la identidad y pureza del agente de control biológico y/o para recopilar información científica que sería necesaria para preparar una petición para la liberación del agente de control biológico al ambiente (Mason et al. 2005).

En los casos cuando se considera la liberación en el ambiente, se debe preparar una petición para liberación de acuerdo a las directrices de la NAPPO para su revisión. Si se identifican posibles impactos adversos a las plantas y/o a las especies no objetivo, no se concederá el permiso. En ese caso, las razones de dicha decisión se presentarán al solicitante. Si no se identifican efectos adversos a las plantas y/o especies no objetivo, se permitirá la liberación en el medio ambiente. Para obtener la información detallada sobre liberación en campo de agentes de control biológicos aprobados para el BEF, sírvase consultar las Directrices para la liberación de control biológico para el BEF en el siguiente enlace:

http://www.aphis.usda.gov/plant_health/plant_pest_info/emerald_ash_b/downloads/EAB-FieldRelease-Guidelines.pdf

Figura 3.1. Proceso normativo relacionado con la importación y liberación de agentes de control biológico de insectos plagas en Estados Unidos (de Mason et al. 2005) USDA= Departamento de Agricultura de Estados Unidos; APHIS= Servicio de Inspección de Sanidad Agropecuaria; T&E= Amenazada y en peligro de extinción



3.2 Procesos normativos en Canadá

En Canadá, los agentes de control biológico están reglamentados a través de la *Plant Protection Act* (PPA), la cual es administrada por la Agencia Canadiense de Inspección Alimentaria (ACIA) (Mason et al. 2005; De Clerck-Floate et al. 2006). La PPA fue aprobada para prevenir la introducción y dispersión de plagas de plantas exóticas. Los organismos que son directamente perjudiciales para las plantas y depredadores y parásitos/parasitoides de organismos fitófagos se consideran plagas de plantas. Por ende la importación y liberación de artrópodos entomófagos para el control biológico se reglamentan según la PPA (De Clerck-Floate et al. 2006).

Para que se permita la importación de un agente de control biológico a Canadá, los importadores deben presentar una solicitud para un Permiso de Importación de Protección Fitosanitaria (http://www.inspection.gc.ca/DAM/DAM-plants-vegetaux/STAGING/text-texte/c5256_1331652913719_eng.pdf) con un paquete informativo para la petición a la Oficina de Permisos de la ACIA. Se solicita la información sobre la acción que se propone, sobre la plaga objetivo, sobre el agente de control biológico, sobre los impactos ambientales y económicos de la liberación que se propone y sobre el monitoreo posterior a la liberación. La Oficina de Permiso informará al solicitante si la documentación proporcionada es insuficiente. El proceso es el mismo sin importar si la finalidad de la importación es para el control biológico clásico (introducción de una especie que se espera que sea autónoma) y para los agentes comerciales que se introducen de forma inundativa a intervalos regulares para controlar las plagas en ambientes generalmente protegidos (por ejemplo, invernaderos).

Según De Clerck-Floate et al. (2006), 'la petición se aplica cuando existe una introducción planificada de una especie, subespecie o incluso una población de una especie candidata, especialmente si se introduce de un área geográfica/población de la que pudo haberse introducido o sometido a prueba anteriormente para la introducción'.

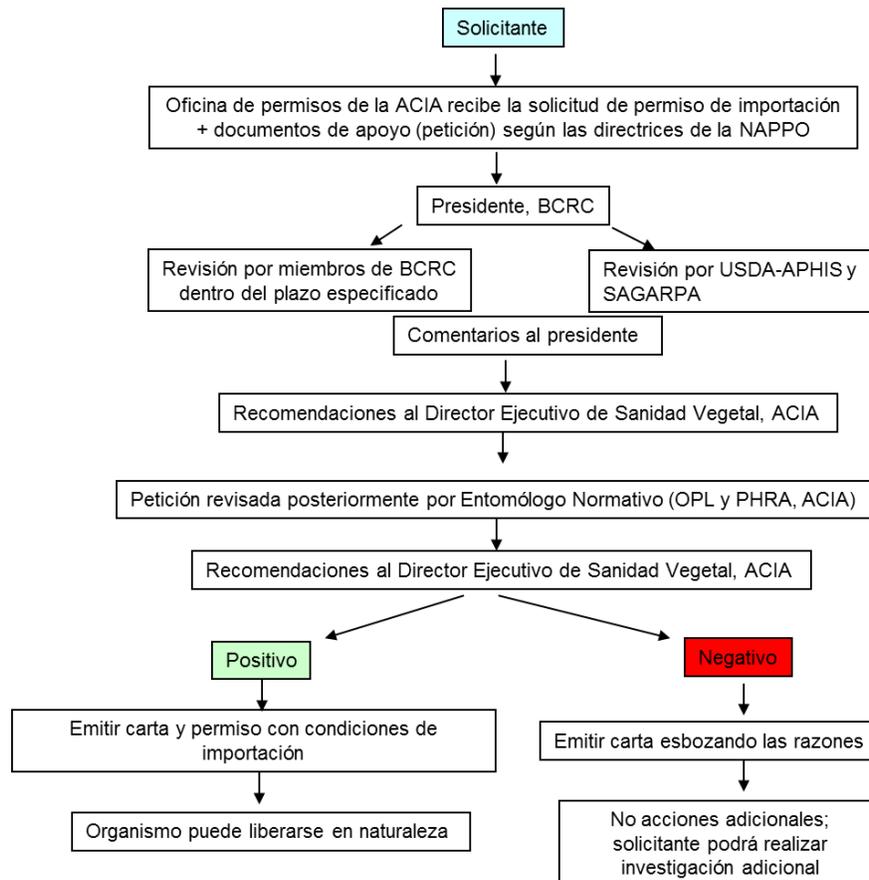
Se requiere un permiso de importación para todas las importaciones de agentes comerciales de control biológico pero no siempre se requiere una petición (De Clerck-Floate et al. 2006). En los casos en los que se requiera una petición y se proporcione con la solicitud de permiso de importación, se enviará al Presidente del Comité de Revisión de Control Biológico (BCRC, por su sigla en inglés) del Ministerio de Agricultura y Agroalimentos de Canadá (AAFC, por su sigla en inglés) para su revisión. El BCRC puede estar constituido por taxónomos, ecólogos, científicos, especialistas en gobierno federal y provincial y universidades canadienses, consultores y representantes de la Agencia Normativa de Manejo de Plagas (PMRA, por su sigla en inglés) del Ministerio de Salud de Canadá. Los representantes del USDA-APHIS y de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación de México (SAGARPA) también revisarán la petición y se tomarán en cuenta sus comentarios antes de tomar una decisión final (Mason et al. 2005; De Clerck-Floate 2006).

Una vez que se revise la petición, el BCRC brinda su recomendación al funcionario principal de Sanidad Vegetal, el Director de la División de Bioseguridad Vegetal y Forestal de la ACIA. El funcionario principal de sanidad vegetal toma la decisión final y se envía una carta al solicitante notificándole la decisión (Aprobado o no aprobado para la liberación en Canadá). Si se aprueba la liberación, se expedirá un permiso de importación. El Sistema Automatizado de Referencia de Importaciones (AIRS, por su sigla en inglés) también se actualizará para reflejar la decisión tomada.

Una vez aprobado para la liberación, el agente de control biológico puede liberarse en cualquier parte de Canadá. Los representantes provinciales son parte del comité de revisión y se informa a los funcionarios provinciales antes de la liberación, especialmente la provincia en donde se llevará a cabo la liberación.

Se puede permitir la importación de los organismos a una instalación de contención canadiense que haya sido aprobada para la recepción y contención de los organismos. Esto generalmente se realiza para permitir la investigación de agentes de control biológico candidatos antes de la petición para su liberación en el país. Si la liberación eventualmente se aprueba, el permiso de importación entonces se enmienda para reflejar dicha decisión.

Figura 3.2. Proceso canadiense de revisión para la importación y liberación de organismos entomófagos nuevos para el control biológico. BCRC= Comité de Revisión de Control Biológico; ACIA= Agencia Canadiense de Inspección Alimentaria; NAPPO= Organización Norteamericana de Protección a las Plantas; OPL= Laboratorios de Plantas de Ottawa, CFIA; PHRA=Unidad de Evaluación del Riesgo de la Sanidad Vegetal, CFIA; SAGARPA= Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación de México (modificado de Mason et al. 2005)



3.3 Procesos normativos en México

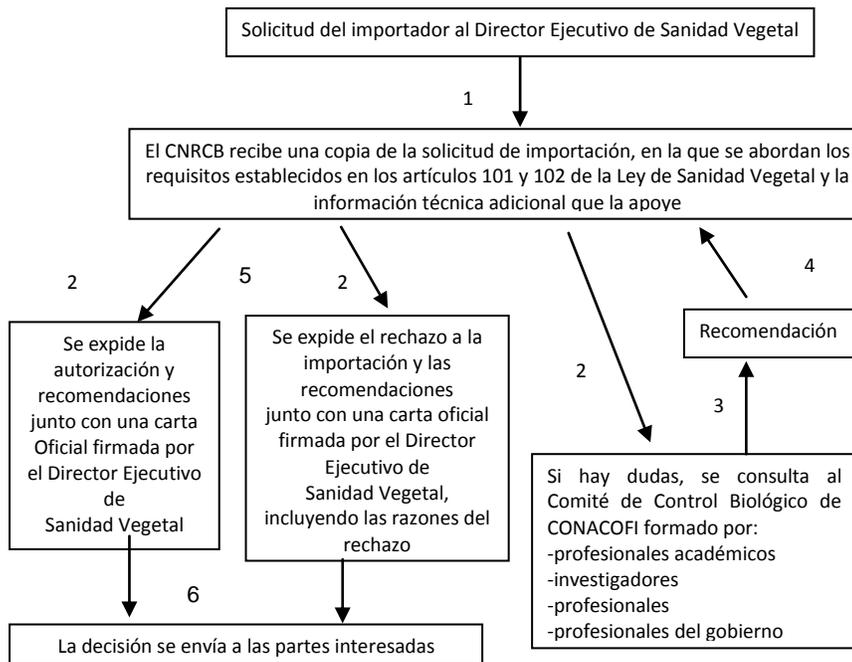
En México, Sanidad Vegetal (Ministerio de Agricultura) es responsable de la administración y aplicación de la Ley Federal de Sanidad Vegetal de los Estados Unidos Mexicanos, la cual reglamenta la importación de agentes de control biológico en México (SARH 1980 en Mason et al. 2005).

Para la importación de agentes de control biológico, los importadores deben presentar una solicitud de importación al Director General de Sanidad Vegetal dentro de SAGARPA. Se enviará una copia de la solicitud al Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB) para su revisión. Con la solicitud de importación debe presentarse una petición que cumpla con los requisitos establecidos en la NRMF 12: 2008.

Si el CNRCB desconoce al agente de control biológico, la solicitud de importación y la petición serán revisadas por el Comité de Control Biológico del Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario (CONACOFI), el cual incluye académicos, investigadores y profesionales del gobierno. Una vez que se complete la revisión, el comité proporcionará una recomendación al CONACOFI (Mason et al. 2005).

Si el CNRCB conoce al agente de control biológico o una vez que reciba una recomendación del CONACOFI para un agente de control biológico nuevo, el CNRCB expedirá ya sea una autorización oficial o una carta de rechazo al importador, firmada por el Director General de Sanidad Vegetal. También se presentarán las recomendaciones y, cuando corresponda, las razones del rechazo. Se expedirá un permiso de importación de un año. Entre los requisitos de importación que se indicarán en el permiso de importación, el agente de control biológico deberá ir acompañado de un certificado de pureza biológica y un certificado de origen proporcionado por la Organización Nacional de Protección Fitosanitaria del país exportador (Mason et al. 2005).

Figura 3.3. Proceso mexicano de revisión para la importación y liberación de organismos de control biológico. CNRCB= Centro Nacional de Referencia de Control Biológico; CONACOFI = Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario (de Mason et al. 2005).



4. Situación actual, uso y perspectivas del género *Fraxinus* en México⁶

El género *Fraxinus* se encuentra en las principales áreas montañosas de México y, como cualquier otro género holártico, alcanza su límite sureño en Centroamérica. La Comisión Nacional para el Estudio de la Biodiversidad notifica sobre 21 especies de *Fraxinus*, pero aún es necesario realizar una evaluación detallada de su situación. Si se eliminaran los sinónimos, posiblemente existan 13 especies y una variedad de *Fraxinus* en México: *F. anomalla*, *F. berlandieriana*, *F. cuspidata*, *F. dipetala*, *F. dubia*, *F. gooddingii*, *F. gregii*, *F. papillosa*, *F. pringlei*, *F. purpusii* (var. *purpusii* y var. *vellerea*), *F. rufescens*, *F. udhei* y *F. velutina*. Aún necesita confirmarse la presencia de dos de ellas (*F. anomalla* y *F. dipetala*) en México, y la situación de *F. pringlei* es dudosa y necesita revisarse.

⁶ Resumen tomado con permiso del autor de: Bonfil, C. 2010. Present state, use, and perspectives of the genus *Fraxinus* in Mexico. En: 2010 Proceedings Symposium on Ash in North America.

Muchas de las especies que se han encontrado en el norte de México se comparten con las del sur de Estados Unidos (*F. anomalla*, *F. berlanderiana*, *F. dipetala*, *F. gooddingii*, *F. gregii*, *F. papillosa* y *F. velutina*). Tres otras especies del centro/sur de México también se encuentran en Guatemala o incluso en Honduras (*F. dubia*, *F. purpusii* y *F. uhdei*). Solamente *F. rufescens* (y tal vez *F. pringlei*) son endémicas de México, en donde crece en los estados del centro del país.

La mayoría de las especies de *Fraxinus* se encuentran en bosques (*Quercus-Pinus*) de clima templado húmedo y protegido y como parte de una vegetación riparia, pero las especies tales como *F. uhdei* también son elementos de bosques húmedos. Aún otras (tal como *F. rufescens*) se encuentran en la transición entre bosques caducifolios de clima templado y tropical e incluso en lugares con arbustos xéricos. *F. uhdei* es la única especie que tiene una distribución amplia en México y por ende es la única que se ha estudiado bastante bien. Es un árbol urbano común, muy abundante en la ciudad de México y Guadalajara, en donde se comporta como maleza. Debido a su rápido crecimiento y alto nivel de supervivencia, es una especie que se cultiva comúnmente para programas de reforestación. Aún necesitan realizarse estudios ecológicos y forestales de otras especies que están presentes en México.

La plaga principal de *Fraxinus* en México es *Hylesinus aztecus* Wood (Coleoptera, Curculionidae), un escarabajo de la corteza, el cual ha causado muerte considerable a los fresnos urbanos. No se ha informado de la presencia del barrenador esmeralda del fresno (*Agrilus planipennis*) en México, pero su rápida dispersión en todo Estados Unidos aumenta la probabilidad de que llegue a México en un futuro cercano.

5. Cómo estimular la investigación para la aplicación del control biológico

Según los capítulos anteriores, parecería que las brechas principales en el conocimiento de la investigación se encuentran en:

1. El entendimiento sobre el establecimiento, la dispersión y el impacto en el BEF que tienen los agentes de control biológico asiáticos que se utilizan en EE. UU. (nota: este proyecto se está realizando en algunas ciudades de EE. UU.).
2. Un mejor entendimiento del papel de los parasitoides, patógenos y depredadores nativos.
3. La orientación específica sobre el tiempo y la magnitud de las liberaciones estacionales para aumentar la eficacia de las acciones de control.
4. El entendimiento de los hongos entomopatógenos, su importancia y función ecológica, dosis subletal y mortalidad durante el invierno.
5. La creación de usos múltiples para los hongos entomopatógenos (aspersión, autocontaminación y autodiseminación).
6. La determinación de si la abundancia natural de los entomopatógenos (alrededor del 2% de mortalidad) puede aumentarse en sitios naturales.
7. La documentación de si los aislados de los hongos identificados comparten las mismas zonas ecológicas que el BEF.
8. El tipo (positivo, negativo o neutral) y la magnitud del impacto del hongo entomopatógeno en parasitoides nativos e introducidos.
9. Los insectos trojanos: uso de artrópodos (hormigas, parasitoides, ácaros) como vectores de entomopatógenos para las larvas del BEF.

Además, podría justificarse la investigación sobre la compatibilidad de varias estrategias, incluyendo los controles biológicos, como parte de un programa de MIP. EE. UU. ha emprendido un programa de mortalidad lenta del fresno (SLAM, según su sigla en inglés) y los resultados de este trabajo podrán duplicarse en otros países y reunir los datos para brindar orientación a largo plazo en cuanto a la mitigación del BEF.

Finalmente, se podría buscar otras herramientas de manejo para complementar al programa de SLAM. Estas podrán incluir:

1. Servicios voluntarios en los programas escolares, por ej.: proyecto escolar para la cría de insectos parasitoides en las clases de biología – para liberarlo en el verano. El objetivo es la educación de los jóvenes.
2. Aumentar la depredación causada por los pájaros (principalmente pájaros carpinteros) con una promoción de construcción de nidos en las ciudades.
3. Evaluar la factibilidad de la técnica del insecto estéril y la cría masiva de machos del BEF.
4. Mejorar los atractivos y las trampas de feromonas, estudio de la interrupción del apareo del BEF;
5. Evaluar las feromonas para utilizarlas en el monitoreo, el establecimiento y la eficacia de agentes de control biológico (parasitoides) nativos e introducidos.

6. Manejo del BEF a través de la armonización de los esfuerzos del control biológico

6.1 Intercambio de experiencias en control biológico

Los agentes de control biológico del BEF (incluyendo a los entomopatógenos) deberían compartirse entre los países miembros siempre que sea posible – vástagos de pequeñas colonias (o aislados) pueden transferirse de la Instalación de Cría Masiva de EE. UU., con la aprobación de US-PPQ + CFIA + PMRA, una vez que se cuente con el proceso apropiado de permiso y el país receptor tenga una instalación disponible para la cría. La NAPPO podría ayudar con este esfuerzo fomentando a los oficiales del programa en cada país miembro a que faciliten la transferencia de material de insectos (y entomopatógenos), y apoyar el uso de agentes de control biológico contra las infestaciones del BEF.

El intercambio también podría aplicarse para:

- Influir en las colaboraciones internacionales para implementar el SLAM en diferentes sitios (áreas) bajo el protocolo común y compartir los datos y resultados. Esto incluye la colaboración entre EE. UU., Canadá y México a través de la ACIA, APHIS, CFS, USDA, las provincias y los estados.
- Compartir el material entomopatógeno (cultivos, información sobre la raza) entre EE. UU., Canadá y México
- Compartir la información a través del sitio web de la NAPPO.
- Armonizar las reglas de la PMRA con las reglas del APHIS. Se pueden crear acuerdos alrededor de los productos utilizados en EE. UU. y Canadá y México.
- Iniciar las discusiones con las entidades específicas que participan en protección fitosanitaria para compartir las herramientas de control biológico.

6.2 Ajustes operacionales

Como una alternativa parcial a la sección 1, la Instalación de Cría de EE. UU., con la aprobación del US-PPQ, podría suministrar cantidades limitadas de parasitoides para introducirlos en otros países miembros, siempre que existan todos los permisos. La NAPPO podría jugar un papel importante fomentando a sus países miembros a que realicen los cambios operativos necesarios con el fin de facilitar este intercambio.

6.3 Depósito centralizado de conocimiento estratégico

La NAPPO podría servir de depósito centralizado de conocimiento estratégico (por ejemplo, éxitos/fracasos de los programas de control biológico) de los cuales los funcionarios de los países miembros puedan extraer, con el fin de optimizar las estrategias cuándo y dónde el BEF se ha de manejar mediante controles biológicos. Este sitio podría llegar al público en general (así como a las ciudades y silvicultores o asociaciones conservacionistas). Por ej.: cómo realizar encuestas para el BEF (mejores prácticas), cómo proceder cuando se descubre una infestación, y soluciones para eliminación del material (incluyendo valorización).

7. Conclusiones y recomendaciones

Según la biología del BEF y su actual distribución, la erradicación no es una opción y nuestra única alternativa es utilizar herramientas de manejo integrado de plagas para disminuir la dispersión de este insecto.

En este contexto:

1. El control biológico para el BEF es una estrategia prometedora que tiene pocos costos ambientales en comparación con las estrategias de manejo químico tradicionales, y puede utilizarse en áreas naturales grandes en donde otras estrategias de manejo sean menos factibles o económicamente imposibles de implementar.
2. Los agentes de control biológico del BEF (incluyendo los entomopatógenos) han demostrado capacidad para pasar el invierno y establecerse en muchas áreas de EE. UU. en donde el BEF está presente. Esto es una buena señal para las áreas de Canadá, por ejemplo, que son muy similares en clima a las del norte de EE. UU.
3. Los países miembros deberían adoptar el control biológico del BEF, siempre que sea factible desde el punto de vista monetario y operativo, cuando y donde se detecte al BEF.
4. El control biológico debe considerarse como una estrategia a largo plazo y esperamos que se pueda alcanzar un equilibrio natural en varios años, similar al que ya se observó en otros sistemas entomológicos en donde los insectos invasores exóticos ahora se "mantienen a raya" con enfermedades y parasitoides (por ejemplo: el virus de la polihedrosis nuclear (VPN) y la palomilla gitana en el este de Canadá, virus y *Gilpinia hercyniae*, parasitoide y *Pristiphora geniculata*.)

8. Referencias

- Abell K.J., J.J. Duan, L. Bauer, J.P. Lelito y R.G. Van Driesche (en prensa). The effect of bark thickness on host partitioning between *Tetrastichus planipennisi* (Hymen: Eulophidae) and *Atanycolus* spp. (Hymen: Braconidae), two parasitoids of emerald ash borer (Coleop: Buprestidae). Biological Control.
- Akers, R.C. y D.G. Nielsen. 1990. Spatial emergence pattern of bronze birch borer, (Coleoptera: Buprestidae) from European white birch. Journal of Entomological Science 25: 150-157.
- APHIS. 2012. Permits. Disponible en: http://www.aphis.usda.gov/plant_health/permits/organism/index.shtml (consultado el 17 de agosto de 2012)
- Barter, G.W. 1965. Survival and development of the bronze poplar borer *Agilus liragus* Barter & Brown (Coleoptera: Buprestidae). The Canadian Entomologist 97: 1063-1068.

- Bauer, L.S., D. Dean y J. Handelsman. 2006. *Bacillus thuringiensis*: potential for management of emerald ash borer. En: Mastro, V., R. Reardon, y G. Parra, comps. Emerald ash borer research and technology development meeting; 2005 September 26-27; Pittsburg, PA. FHTET 2005-16. Morgantown, WV: U.S. Forest Service, Forest Health Technology Enterprise Team. P. 38-39.
- Bauer, L.S., R.A. Haack, D.L. Miller, T.R. Petrice y H. Liu. 2004a. Emerald ash borer life cycle. En: Mastro, V. and R. Reardon, comp. Proceedings of Emerald Ash Borer Research and Technology Development Meeting, 2003, September 30-October 1, 2003; Port Huron, Michigan. FHTET-2004-02.p. 8.
- Bauer, L.S., H. Liu, J.R. Gould y R.C. Reardon. 2007. Progress on biological control of the emerald ash borer in North America. *Biocontrol News and Information* 28: 51N-54N.
- Bauer, L.S., H-P.Liu, R.A. Haack, T.R. Petrice and D.L. Miller. 2004b. Natural enemies of emerald ash borer in southeastern Michigan. En: Mastro, V. and R. Reardon, comp. Proceedings of the 2003 Emerald Ash Borer Research and Technology Development Meeting. USDA Forest Service FHTET 2004-02. p. 33.
- Bauer, L.S., H. Liu y D.L. Miller. 2004c. Microbial control of the emerald ash borer. In: Mastro, Victor; Reardon, Richard, comps. Proceedings of the emerald ash borer research and technology development meeting; 2003 September 30 - October 1; Port Huron, MI. FHTET 2004-02. Morgantown, WV: U.S. Forest Service, Forest Health Technology Enterprise Team. P. 31-32.
- Bauer, L.S. y D. K. Londoño, 2011. Effects of *Bacillus thuringiensis* SDS-502 on adult emerald ash borer. En: McManus, K.A. and K.W. Gottschalk, eds. Proceedings 21st U.S. Department of Agriculture interagency research forum on invasive species 2010; 2010 January 12-15; Annapolis, MD. Gen. Tech. Rep. NRS-P-75. Newtown Square, PA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Northern Research Station. P. 74-75.
- Belill, V.M. y J.P. Lelito. 2011. Understanding diapause in *Spathius agrili* – the roles of photoperiod and temperature. En: Mastro V.C., Lance, D. (eds.) Proceedings of the 2011 Emerald Ash Borer research and technology development meeting; October 12-13, Wooster, OH. FHTET 2011-06. Morgantown, WV: U.S. Forest Service, Forest Health Technology Enterprise Team. P. 103-104.
- Belokobylskij, S.A., G.I. Yurchenko, J.S. Strazanac, A. Zaldivar-Riveron y V. Mastro. 2012. A New Emerald Ash Borer (Coleoptera: Buprestidae) Parasitoid Species of *Spathius* Nees (Hymenoptera: Braconidae: Doryctinae) From the Russian Far East and South Korea. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 105: 165-178.
- Bray, A. M., L.S. Bauer, T.M. Poland, R.A. Haack, A.I. Cognato y J.J. Smith. 2011. Genetic analysis of emerald ash borer (*Agrilus planipennis* Fairmaire) populations in Asia and North America. *Biological Invasions* 13(12):2869-2887.
- Burks, B.D. 1979. Family Eupelmidae. En: Krombein, K.V., Hurd Jr., P.D., Smith, D.R. y B.D. Burks (eds.). *Catalog of Hymenoptera in America north of Mexico, Volume 1, Symphyta and Apocrita (Parasitica)*. Smithsonian Institution Press, Washington, DC. p. 878-889.
- Cappaert, D. y D. G. McCullough. 2009. Occurrence and seasonal abundance of *Atanycolus cappaerti* (Hymenoptera: Braconidae) a native parasitoid of emerald ash borer, *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae). *The Great Lakes Entomologist* 42: 16-29.

- Cappaert, D., D.G. McCullough, T.M. Poland y N.W. Siegert. 2005. Emerald ash borer in North America: a research and regulatory challenge. *American Entomologist*. 51(3): 152-165.
- Careless, P.D., S.A. Marshall, B.D. Gill, E. Appleton, R. Favrin y T. Kimoto. 2009. *Cerceris fumipennis* – a biosurveillance tool for emerald ash borer. Canadian Food Inspection Agency, Ottawa, ON.
- Castrillo, L.A., L.S. Bauer, H. Liu, M.H. Griggs y J.D. Vandenberg. 2009a. Natural infections of *Beauveria bassiana* in *Agrilus planipennis* populations in Michigan. En: McManus, K. A. and K.W. Gottschalk, eds. Proceedings. 20th U.S. Department of Agriculture interagency research forum on invasive species 2009; 2009 January 13-16; Annapolis, MD.Gen. Tech. Rep. NRS-P-51. Newtown Square, PA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Northern Research Station. P. 65.
- Castrillo, L.A., M.H. Griggs, H. Liu, L.S. Bauer y J.D. Vandenberg. 2009b. Field persistence and efficacy of the fungus *Beauveria bassiana* against the emerald ash borer, *Agrilus planipennis*. En: McManus, K. A. and K.W. Gottschalk, eds. Proceedings. 20th U.S. Department of Agriculture interagency research forum on invasive species 2009; 2009 January 13-16; Annapolis, MD.Gen. Tech. Rep. NRS-P-51. Newtown Square, PA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Northern Research Station. P. 64.
- Castrillo, L. A., M.H. Griggs, H. Liu, L. S. Bauer and J.D.Vandenberg. 2010a. Assessing deposition and persistence of *Beauveria bassiana* GHA (Ascomycota: Hypocreales) applied for control of emerald ash borer, *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae), in a commercial tree nursery. *Biological Control*. 54:61-67.
- Castrillo, L.A., L.S. Bauer, H. Liu, M.H. Griggs and J.D. Vandenberg. 2010b. Characterization of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) isolates associated with *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae) populations in Michigan. *Biological Control* 54 (2): 135-140.
- Castrillo, L.A., M.H., Griggs y J.D. Vandenberg. 2008. Quantitative detection of *Beauveria bassiana* GHA (Ascomycota: Hypocreales), a potential microbial control agent of the emerald ash borer, by use of real-time PCR. *Biological Control* 45: 163-169.
- Charnov, E.L. 1982. *The Theory of Sex Allocation*. Princeton University Press, Princeton.
- Coggins, B.G. and J.P.Lelito. 2011. Long-term cold-storage in *Tetrastichus planipennisi* - progress in mass-rearing. En:Mastro V.C., Lance, D. (eds.) Proceedings of the 2011 Emerald Ash Borer research and technology development meeting; October 12-13, Wooster, OH. *En prensa*.
- Cossé, A.A., R.J. Petroski, B.W. Zilkowski, K. Vermillion, J.P. Lelito, M.F. Cooperband, and J.R. Gould. 2012. Male-produced pheromone of *Spathius agrili*, a parasitoid introduced for the biological control of the invasive emerald ash borer, *Agrilus planipennis*. *J. Chem. Ecol.*,38: 389-399.
- Crook, D.J., A. Khrimian, J.A. Francese, I. Fraser, T.M. Poland, A.J. Sawyer and V. C. Mastro. 2008. Development of a Host-Based Semiochemical Lure for Trapping Emerald Ash Borer *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae). *Environmental Entomology* 37(2):356-365.
- Crook, D. J. y V. C. Mastro. 2010. Chemical ecology of the emerald ash borer *Agrilus planipennis*. *Journal of Chemical Ecology* 36(1): 101-112.

- Crosthwaite, J.C., S. Sobek, D.B. Lyons, M.A. Bernards y B.J. Sinclair. 2011. The overwintering physiology of the emerald ash borer, *Agrilus planipennis* Fairmaire (Coleoptera: Buprestidae). *Journal of Insect Physiology* 57(1):166-173.
- Dean, K. M., J. D. Vandenberg, M. H. Griggs, L. S. Bauer y M. K. Fierke. 2012. Susceptibility of two hymenopteran parasitoids of *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae) to the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). *Journal of Invertebrate Pathology* 109(3):303-306.
- De Clerck-Floate, R.A., P.G. Mason, D.J. Parker, D.R. Gillespie, A.B. Broadbent y G. Boivin. 2006. Guide for the Importation and Release of Arthropod Biological Control Agents in Canada.
<http://publications.gc.ca/site/eng/289155/publication.html>
- Duan, J.J., Bauer, L.S., Abell, K.J., Lelito, J.P. y R. van Driesche. 2013. Establishment and abundance of *Tetrastichus planipennisi* (Hymenoptera: Eulophidae) in Michigan: Potential for success in classical biocontrol of the invasive emerald ash borer. *J. Econ. Ent.* 106: 1145-1154.
- Duan, J.J., L.S. Bauer, K.J. Abell y R. van Driesche. 2012. Population responses of hymenopteran parasitoids to the emerald ash borer (Coleoptera: Buprestidae) in recently invaded areas in north central United States. *Biol. Control* 57: 199-209.
- Duan, J. J., R.W. Fuester, J. Wildonger, P.B. Taylor, S. Barth and S.E. Spichiger. 2009. Parasitoids Attacking the Emerald Ash Borer (Coleoptera: Buprestidae) in Western Pennsylvania. *Florida Entomologist* 92(4):588-592.
- Duan, J.J., C.B. Opper, M.D. Ulyshen, L.S. Bauer y J.P. Lelito. 2011. Biology and life history of *Tetrastichus planipennisi* (Hymenoptera: Eulophidae), a larval endoparasitoid of the emerald ash borer (Coleoptera: Buprestidae). *Florida Entomologist* 94: 933-940.
- Duan, J.J., P.B. Taylor y R.W. Fuester. 2011a. Biology and life history of *Balcha indica*, an ectoparasitoid attacking the emerald ash borer, *Agrilus planipennis*, in North America. *Journal of Insect Science* 11, article 127.
- Duan J.J., M.D. Ulyshen. L.S. Bauer. J. Gould y R. Van Driesche. 2010. Measuring the impact of biotic factors on populations of immature emerald ash borers (Coleoptera: Buprestidae). *Environmental Entomology* 39(5):1513-1522.
- Duan, J. J., G. Yurchenko y R. Fuester. 2012. Occurrence of Emerald Ash Borer (Coleoptera: Buprestidae) and Biotic Factors Affecting Its Immature Stages in the Russian Far East. *Environmental Entomology* 41(2):245-254.
- EAB WEB Site. <http://www.emeraldashborer.info/index.cfm>
- Federal Register. 2007. <http://www.regulations.gov/fdmspublic/component/main?main=DocketDetail&d=APHIS-2007-0060>.
- Gibson, G.A.P. 2005. The world species of *Balcha* Walker (Hymenoptera: Chalcidoidea: Eupelmidae), parasitoids of wood-boring beetles. *Zootaxa* 1033: 1-62.
- Godfray, H.C.J. 1994. *Parasitoids: Behavioral and Evolutionary Ecology*. Princeton University Press, Princeton.

- Haack, R.A., D.M. Benjamin y B.A. Schuh. 1981. Observations on the biology of *Phasgonophora sulcata* (Hymenoptera: Chalcididae), a larval parasitoid of the two-lined chestnut borer, *Agrilus bilineatus* (Coleoptera: Buprestidae) in Wisconsin. *The Great Lakes Entomologist* 14: 113-116.
- Haack, R.A., E. Jendek, H. Liu, K.R. Marchant, T.R. Petrice, T.M. Poland y H. Ye. 2002. The emerald ash borer: a new exotic pest in North America. *Newsletter of the Michigan Entomological Society* 47(3-4):1-5.
- Hahn, J., D.A. Herms y D. G. McCullough. 2011. Frequently asked questions regarding potential side effects of systemic insecticides used to control emerald ash borer. University of Minnesota, Michigan State University, and The Ohio State University Extension Emerald Ash Borer Fact Sheet. 4 pp.
- Hajek, A. E. 2009. Invasive arthropods and approaches for their microbial control. En: Hajek, A.E., T.R. Glare y M. O'Callaghan, eds. *Use of microbes for control and eradication of invasive arthropods*. Dordrecht, The Netherlands: Springer: Chapter 1. P.3-15.
- Hajek, A. E. and R. J. St. Leger. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual Review of Entomology* 39: 293-322.
- Hajek, A.E. y L.S. Bauer. 2007. Microbial control of wood-boring insects attacking forest and shade trees. En: Lacey, L. A. and H.K. Kaya, eds. *Field manual of techniques in invertebrate pathology*. Chapter VII-10. Secaucus, NJ: Springer. P. 505-533.
- Hajek, A.E. y L.S. Bauer. 2009. Use of entomopathogens against invasive wood boring beetles in North America. En: Hajek, A.E., T.R. Glare, T.R. and M. O'Callaghan, eds. *Use of microbes for control and eradication of invasive arthropods*. Dordrecht, The Netherlands: Springer: Chapter 10. P.159-179.
- Hajek, A.E., M.L. McMannus y I. Delalibera Jr. 2007. A review of introductions of pathogens and nematodes for classical biological control of insects and mites. *Biological Control* 41(1): 1–13.
- Herms, D. A., D.G. McCullough, D.R. Smitley, C.S. Sadof, R.C. Williamson y P.L. Nixon. Insecticide Options for Protecting Ash Trees from Emerald Ash Borer. 2009. North Central IPM Center Bulletin. 12 pp. http://www.emeraldashborer.info/files/Multistate_EAB_Insecticide_Fact_Sheet.pdf
- Humber, R.A. 2012. ARSEF Catalogs. <http://www.ars.usda.gov/Main/docs.htm?docid=12125&page=2>
- Inglis, G.D., M.S. Goettel y D.L. Johnson. 1993. Persistence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, on phylloplanes of crested wheatgrass and alfalfa. *Biological Control* 3: 258-270.
- Inglis G.D., M. S. Goettel, T. M. Butt y H. Strasser. 2001. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. En: Butt, T.M., C. Jackson and N. Magan, eds. *Fungi as biocontrol agents*, CABI Publishing. p. 23-69.
- James, R.R., B.T. Shaffer, B. Croft y B. Lightbart. 1995. Persistence and effects on the pea aphid and a non-target coccinellid in alfalfa. *Biocontrol Science and Technology* 5(4): 425-437.
- Johny, S., G. Kyei-Poku, D. Gauthier, K. van Frankenhuyzen y P.J. Krell. 2012. Characterization

and virulence of *Beauveria* spp. recovered from emerald ash borer in southwestern Ontario, Canada. *Journal of Invertebrate Pathology* 111:41-49.

Johny, S., G. Kyei-Poku, D. Gauthier y K. van Frankenhuyzen. 2012b. Isolation and characterisation of *Isaria farinosa* and *Purpureocillium lilacinum* associated with emerald ash borer, *Agrilus planipennis* in Canada. *Biocontrol Science and Technology* 22 (6): 723-732.

King, B.H. 1987. Offspring sex ratios in parasitoid wasps. *Q. Rev.Biol.* 62: 367–396.

Kabaluk, J. T., A. M. Svircev, M. S. Goettel y S. G. Woo. 2010. The Use and Regulation of Microbial Pesticides in Representative Jurisdictions Worldwide. IOBC Global.

Kovacs, F.K., R.G. Haight, D.G. McCullough, R.J. Mercader, N.W. Siebert y A.M. Leibhold. 2010. Cost of potential emerald ash borer damage in U.S. communities, 2009– 2019. *Ecological Economics* 69: 569–578.

Kreutz, J., G. Zimmermann y O. Vaupel. 2004. Horizontal transmission of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* among the spruce bark beetle, *Ips typographus* (Col., Scolytidae) in the laboratory and under field conditions. *Biocontrol Science and Technology* 14(8): 837-848.

Kula, R. R., K. S. Knight, J. Rebeck, L. S. Bauer, D. L. Cappaert y K. J. K. Gandhi. 2010. *Leluthia astigma* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae: Doryctinae) as a parasitoid of *Agrilus planipennis* Fairmaire (Coleoptera: Buprestidae: Agrilinae), with an assessment of host associations for Nearctic species of *Leluthia* Cameron. *Proceedings of the Entomological Society of Washington* 112: 246-257.

Kyei-Poku, G., D. Gauthier, R. Schwarz y K. van Frankenhuyzen. 2008. A new *Cystosporogenes* isolate from *Agrilus anxius* (Coleoptera: Buprestidae). 41st Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology and 9th International Conference on *Bacillus thuringiensis* August 3-7, 2008 University of Warwick, Coventry, United Kingdom.

Kyei-Poku, G., K. Wilson, D. Gauthier, K. van Frankenhuyzen y S. Johny. 2009. *Rhabditis (Oscheius)* species (Nematoda: Rhabditidae), associate with *Agrilus planipennis*. 2009. 42nd Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, Park City, Utah, August 16-20.

Kyei-Poku, G., D. Gauthier, R. Schwarz y K. van Frankenhuyzen. 2011. Morphology, molecular characteristics and prevalence of a *Cystosporogenes* species (Microsporidia) isolated from *Agrilus anxius* (Coleoptera: Buprestidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 107(1):1–10.

Lindell, C. A., D.G. McCullough, D. Cappaert, N.M. Apostolou y M.B. Roth. 2008. Factors Influencing Woodpecker Predation on Emerald Ash Borer. *The American Midland Naturalist* 159(2):434-444.

Liu H. y L.S. Bauer. 2006. Susceptibility of *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae) to *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. 2006. *Journal Economic Entomology* 99(4):1096-1103.

Liu, H. y L.S. Bauer. 2008a. Microbial control of emerald ash borer, *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae) with *Beauveria bassiana* strain GHA: Greenhouse and field trials. *Biological Control* 45: 124-132.

- Liu, H. and L.S. Bauer. 2008b. Microbial control of emerald ash borer, *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae) with *Beauveria bassiana* strain GHA: field applications. *Biological Science and Technology* 18:571-585.
- Liu, H., L.S. Bauer, R. Gao, T. Zhao, T.R. Petrice y R.A. Haack. 2003. Exploratory survey for the emerald ash borer, *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae), and its natural enemies in China. *The Great Lakes Entomologist* 36:191-204.
- Liu, H., L.S. Bauer, D.L. Miller, T. Zhao, R. Gao, L. Song, Q. Luan, R. Jin y C. Gao. 2007. Seasonal abundance of *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae) and its natural enemies *Oobius agrili* (Hymenoptera: Encyrtidae) and *Tetrastichus planipennis* (Hymenoptera: Eulophidae) in China. *Biological Control* 42:61–71.
- Lyons, D.B. 2010. Biological control of emerald ash borer biology. En: Lyons, D.B. and T.A. Scarr (eds.) *Workshop proceedings: guiding principles for managing the emerald ash borer in urban environments*. Ontario Ministry of Natural Resources and Natural Resources Canada, Canadian Forest Service, Sault Ste. Marie, Canada. p. 29-34.
- Lyons, D. B., G.C. Jones y K. Wainio-Keizer. 2004. The biology and phenology of the emerald ash borer, *Agrilus planipennis*. En: Mastro, V. and R. Reardon, comp. 2004. *Proceedings of Emerald Ash Borer Research and Technology Development Meeting, September 30-October 1, 2003; Port Huron, Michigan*. FHTET-2004-02.p. 5.
- Lyons D.B., R. Lavallée, G. Kyei-Poku, K. van Frankenhuyzen, S. Johny, C. Guertin, J. Francese, J. Jones y M. Blais. 2012. Towards the development of an autocontamination trap system to manage populations of emerald ash borer with the native entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *Journal of Economic Entomology* (en prensa).
- Marchant, K.R. 2007. Managing the emerald ash borer in Canada. En: Mastro, V., D. Lance, R. Reardon y G. Parra, comp. Proceedings of Emerald Ash Borer Research and Technology Meeting 2006, October 29-November 2, 2006; Cincinnati, Ohio. FHTET-2007-04.
- Marsh, P.M. 1979. Family Braconidae. En: Krombein, K.V., Hurd Jr., P.D., Smith, D.R. y B.D. Burks (eds.). *Catalog of Hymenoptera in America north of Mexico, Volume 1, Symphyta and Apocrita (Parasitica)*. Smithsonian Institution Press, Washington, DC, p.144-295.
- Marsh, P.M. y J.S. Strazanac. 2009. A taxonomic review of the genus *Spathius* Nees (Hymenoptera: Braconidae) in North America and comments on the biological control of the emerald ash borer (Coleoptera: Buprestidae). *Journal of Hymenoptera Research* 18: 80-112.
- Marsh, P.M., J.S. Strazanac y S.Y. Laurusonis. 2009. Description of a new species of *Atanycolus* (Hymenoptera: Braconidae) from Michigan reared from the emerald ash borer, *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae: Agrilinae). *The Great Lakes Entomologist* 42: 8-15.
- Marshall, S.A., S.M. Paiero y M. Buck. 2005. Buprestid sampling at nests of *Cerceris fumipennis* (Hymenoptera: Crabronidae) in southern Ontario: the first Canadian records of three buprestids (Coleoptera: Buprestidae). *The Canadian Entomologist* 137: 416-419.
- Mason, P.G., R.G. Flanders y H.A. Arredondo-Bernal. 2005. How can legislation facilitate the use of biological control of arthropods in North America? En: Hoddle, R.G., Compiler. *Proceedings of the 2nd International Symposium on Biological Control of Arthropods, Davos, Switzerland, 12-16 September 2005, United States Department of Agriculture, Forest Service, Morgantown, WV, FHTET-2005-08, Vol II. P. 701-714.*

- McCullough, D.G.yR. J. Mercader. 2012. Evaluation of potential strategies to slow ash mortality (SLAM) caused by emerald ash borer (*Agrilus planipennis*): SLAM in an urban forest. *International Journal of Pest Management* 58(1): 9-23.
- Moore, D., P.D. Bridge, P.M. Higgins, R.P. Bateman y C. Prior. 1993. Ultra-violet radiation damage to *Metarhizium flavoviride* conidia and the protection given by vegetable and mineral oils and chemical sunscreens. *Annals of Applied Biology* 122: 605-616.
- Poland, T. M. 2007. Twenty Million Ash Trees Later: Current Status of Emerald Ash Borer in Michigan. *Newsletter of the Michigan entomological society* 52 (1&2).
- Poland, T.M. y D.G. McCullough. 2006. Emerald Ash Borer: Invasion of the Urban Forest and the Threat to North America's Ash Resource. *Journal of Forestry* 104 (3):118-124.
- Poland, T.M. y D.G. McCullough. 2010. SLAM: A multi-agency pilot project to SLow A.sh M.ortality caused by emerald ash borer in outlier sites. *Newsletter of the Michigan Entomological Society* 55 (1 and 2): 4-8.
- Rebek E.J., D.A. Herms y D.R. Smitley. 2008. Interspecific variation in resistance to emerald ash borer (Coleoptera: Buprestidae) among North American and Asian ash (*Fraxinus* spp.). *Environmental Entomology* 37(1):242-6.
- Rodriguez-Saona, C., J.R. Miller, T.M. Poland, T.M. Kuhn, G.W. Otis, T. Turk and N. McKenzie. 2007. Behaviours of adult *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae). *Great Lakes Entomologist* 40: 1–16.
- RSPM 7. 2008. *Guidelines for petition for first release of non-indigenous phytophagous biological control agents*. Ottawa, NAPPO.
- RSPM 12. 2008. *Guidelines for petition for first release of non-indigenous entomophagous biological control agents*. Ottawa, NAPPO.
- Ryall, K. L., P.J. Silk, P. Mayo, D. Crook, A. Khimian, A. Cossé y J. Sweeney. 2012. Attraction of *Agrilus planipennis* (coleoptera: Buprestidae) to a volatile pheromone: Effects of release rate, host volatile, and trap placement. *Environmental Entomology* 41(3): 648-656.
- Schaefer, P. W. 2004. *Agrilus planipennis* (= *A. marcopoli*) (Coleoptera: Buprestidae) in Japan and Mongolia - preliminary findings. En: V. Mastro and R. Reardon (eds), Emerald ash borer research and technology development meeting, 30 Sept. -1 Oct. 2003, Port Huron, Michigan. US.Department of Agriculture Forest Service.FHTET-2004-02.p.13.
- Schröder, D. 1974. A study of the interactions between the internal parasites of *Rhyacionia buoliana* (Lepidoptera: Olethreutidae). *Entomophaga* 19: 145-171.
- Silk, P. J., K. Ryall, P. Mayo, M.A. Lemay, G. Grant, D. Crook, A. Cossé, I. Fraser, J.D. Sweeney, D.B. Lyons, D. Pitt, T. Scarr y D. Magee. 2011. Evidence for a Volatile Pheromone in *Agrilus planipennis* Fairmaire (Coleoptera: Buprestidae) that Increases Attraction to a Host Foliar Volatile. *Environmental Entomology* 40(4): 904-916.
- Tanis, S. R. y D. G. McCullough. 2012. Differential persistence of blue ash and white ash following emerald ash borer invasion. *Canadian Journal Forest Research* 42: 1541-1550.
- Taylor, P.B., Duan, J.J., Fuester, R.W., Hoddle, M. y R.van Driesche. 2012. Parasitoid guilds of *Agrilus* woodborers (Coleoptera: Buprestidae): their diversity and potential for use in

biological control. *Psyche*.DOI:10.1155/2012/813929.

- Taylor, R.A.J., L.S. Bauer, T.M. Poland y K.N. Windell. 2010. Flight performance of *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae) on a flight mill and in free flight. *Journal of Insect Behavior* 23: 128-148.
- Turnbull, A.L. y D.A. Chant. 1961. The practice and theory of biological control of insects in Canada. *Can. Journal of Zool.*39: 697-753.
- Ulyshen, M.D., J.J. Duan, L.S. Bauer y I. Fraser. 2010. Suitability and Accessibility of Immature *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae) Stages to *Tetrastichus planipennisi* (Hymenoptera: Eulophidae). *Biol. And Microbial Control*, 103: 1080-1085.
- Ulyshen, M.D., J.J. Duan y L.S. Bauer. 2010. Interactions between *Spathius agrili* (Hymenoptera: Braconidae) and *Tetrastichus planipennisi* (Hymenoptera: Eulophidae), larval parasitoids of *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae). *Biol. Control*52: 188-193.
- University of Florida. 2012. Importation and Release of Non-Indigenous Biological Control Agents. Available at <http://ipm.ifas.ufl.edu/applying/methods/biocontrol/controlrelease.shtml> (accessed on August 17, 2012)
- USDA-APHIS. 2012. Trapping Protocol - USDA-APHIS-PPQ-EAB Trapping protocols 2012. http://www.aphis.usda.gov/plant_health/plant_pest_info/emerald_ash_b/downloads/survey_guidelines.pdf
- USDA-APHIS/ARS/FS. 2013. Emerald Ash Borer, *Agrilus planipennis* (Fairmaire), Biological Control Release and Recovery Guidelines. USDA-APHIS-ARS-FS, Riverdale, Maryland.
- USDA-APHIS/ARS/FS. 2012. Emerald Ash Borer, *Agrilus planipennis* (Fairmaire), Biological Control Release and Recovery Guidelines. USDA-APHIS-ARS-FS, Riverdale, Maryland.
- USDA-APHIS/FS. 2007. Proposed Release of Three Parasitoids for the Biological Control of the Emerald Ash Borer (*Agrilus planipennis*) in the Continental United States. USDA-APHIS-FS, Riverdale, Maryland.
- Vandenberg, J. D. 2007a. Fungal insecticide may stop ash borer. *Industrial Bioprocessing* 29:05.
- Vandenberg, J.D., L.A. Castrillo, H. Liu, M.H. Griggs y L.S. Bauer. 2007b. Use of *Beauveria bassiana* and imidacloprid for control of emerald ash borer in an ash nursery. *Proceedings of the Emerald Ash Borer and Asian Longhorned Beetle Research and Development Review 2006*. *Proceedings of the Emerald Ash Borer and Asian Longhorned Beetle Research and Development Review 2006*.p. 56.
- Vandenberg, J.D., L.A. Castrillo, H. Liu, M. H. Griggs y L.S. Bauer. 2008. Impact of *Beauveria bassiana* and imidacloprid, alone and in combination, used against emerald ash borer in a newly-infested ash nursery. *Proceedings of the Emerald Ash Borer and Asian Longhorned Beetle Research and Development Review 2006*.p. 50.
- Wallander, E. 2008. Systematics of *Fraxinus* (Oleaceae) and evolution of dioecy. *Plant Systematics and Evolution* 273: 25-49.
- Wang, X.-Y., Z.-Q. Yang, H. Wu y J.R. Gould. 2008. Effects of host size on the sex ratio, clutch size, and size of adult *Spathius agrili*, an ectoparasitoid of emerald ash borer. *Biol. Control*44: 7-12.

- Wang, X.-Y., Z.-Q. Yang, J.R. Gould, H. Wu y J.-H. Ma. 2010. Host-seeking behavior and parasitism by *Spathius agrili* Yang (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of the emerald ash borer. *Biol Control* 52: 24-29.
- Wei, X., Y. Wu, R. Reardon, T.-H.Sun, M. Lu y J.-H.Sun. 2007. Biology and damage traits of emerald ash borer (*Agrilus planipennis* Fairmaire) in China. *Insect Science* 14: 367-373.
- Wisconsin. 2009. Ash wood processing options for the homeowner. Wisconsin's emerald ash borer information source. <http://datcpservices.wisconsin.gov/eab/index.jsp>.
- Yang, S., J.J. Duan, J.P. Lelito y R. van Driesche. 2012. Multiparasitism by *Tetrastichus planipennisi* (Hymenoptera: Eulophidae) and *Spathius agrili* (Hymenoptera: Braconidae): Implication for Biological Control of the Emerald Ash Borer Larvae (Coleoptera: Buprestidae). *Biol. Control. In Press*.
- Yang, Z.-Q., J.S. Strazanac, P.M. Marsh, C. Van Achterberg y W.-Y. Choi. 2005. First recorded parasitoid from China of *Agrilus planipennis*: a new species of *Spathius* (Hymenoptera: Braconidae, Doryctinae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 98: 636-642.
- Yang, Z.-Q., J.S Strazanac, Y.-X. Yao y X.-Y. Wang. 2006. A new species of emerald ash borer parasitoid from China belonging to the genus *Tetrastichus* Haliday (Hymenoptera: Eulophidae). *Proc. Entomol. Soc. Wash.* 108: 550-558.
- Yang, Z.-Q., X.-Y. Wang, J.R. Gould y H. Wu. 2008. Host specificity of *Spathius agrili* Yang (Hymenoptera: Braconidae), an important parasitoid of the emerald ash borer. *Biol. Control* 47: 216-221.
- Zhang, Y-Z., D.-W.Huang, T-H. Zhao, H-P. Liu y L. S. Bauer. 2005. Two new egg parasitoids (Hymenoptera: Encyrtidae) of economic importance from China. *Phytoparasitica* 33: 253-260.
- Zwölfer, H. 1971. The structure and effect of parasite complexes attacking phytophagous host insects. En: P.J. den Boer and G.R. Gradwell, eds., *Dynamics of Populations: Proceedings of the Advanced Study Institute on "Dynamics of Numbers in Populations"* (Oosterbeek, 1970) Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen, The Netherlands. pp. 405-418.