

Histología del daño en fruto y rama de aguacate ‘Hass’ por escamas armadas (Hemiptera: Diaspididae)*

Histology of the damage in fruits and branches of ‘Hass’ avocado trees caused by armored scales (Hemiptera: Diaspididae)

Rubén Hernández-Rivero¹, M^a de Lourdes C. Arévalo-Galarza^{1,2§}, Guadalupe Valdovinos-Ponce³, Héctor González-Hernández³, Jorge Valdez-Carrasco³ y Martha Elva Ramírez-Guzmán^{2,4}

¹Recursos Genéticos y Productividad- Fruticultura-Colegio de Postgraduados. Carretera México-Texcoco, km 36.5. Montecillo, Texcoco, Estado de México. C. P. 56230. ²Línea Prioritaria de Investigación en Inocuidad, Calidad de Alimentos y Bioseguridad (LPI-7). Tel. 01 595 95 20200. Ext. 1571. ³Posgrado en Fitosanidad Colegio de Postgraduados. ⁴Posgrado en Estadística-Colegio de Postgraduados. (larevalo@colpos.mx; gvanpon@colpos.mx; hgzzhdz@colpos.mx; jvaldez@colpos.mx; marthag@2010@gmail.com). §Autora para correspondencia: larevalo@colpos.mx.

Resumen

Las escamas armadas *Abgrallaspis aguacatae* y *Hemiberlesia lataniae* son plagas ocasionales en aguacate ‘Hass’; sin embargo, causan problemas durante la producción y empaque del fruto. A pesar de su importancia como plagas, las interacciones entre estos insectos y sus plantas hospederas han sido poco estudiadas. El objetivo de este trabajo fue determinar si las especies de escamas armadas causan alteraciones histológicas en frutos y ramas de aguacate ‘Hass’. Se colectaron frutos en madurez fisiológica y ramas jóvenes con y sin presencia de escamas armadas en cinco huertos comerciales de Michoacán, México en enero y julio de 2011. Se realizaron cortes histológicos para observar los cambios a nivel celular como respuesta a la presencia de la escama. Se identificaron tres especies: *Hemiberlesia lataniae*, *Hemiberlesia diffinis* y *Abgrallaspis aguacatae*. Estas escamas no provocaron cambios macroscópicos ni anatómicos en los tejidos de ramas y frutos, pero como respuesta a la presencia y al proceso de alimentación de estas especies, se detectó acumulación de fenoles en paredes celulares, interior de las células de la epidermis y corteza así como en las paredes y el citoplasma de los tejidos epidérmico y parenquimatoso del exocarpio, en las paredes y el citoplasma de los tejidos

Abstract

Armored scales *Abgrallaspis aguacatae* and *Hemiberlesia lataniae* are occasional pests of ‘Hass’ avocado trees; however, they can cause problems during the production and packing of the fruit. Despite its importance as pests, the interactions between these insects and their host plants has been little studied. The aim of this study was to determine if armored scale species cause histological alterations in fruits and branches of ‘Hass’ avocado trees. Physiologically mature fruits and young branches with and without the presence of armored scales were collected in five commercial orchards of Michoacán, Mexico, in January and July 2011. Histological sections were performed in order to observe changes that occurred at the cellular level in response to the presence of the scales. Three species were identified: *Hemiberlesia lataniae*, *Hemiberlesia diffinis* and *Abgrallaspis aguacatae*. These scales caused no macroscopic or anatomical changes in the tissues of branches and fruits, but the accumulation of phenols was detected, in response to the presence and the feed process of these species, in interior cell walls of epidermis and bark cells, as well as on the walls and cytoplasm of epidermal and parenchymal tissues of the exocarp, and in the area where the insects were located. In the branches, the stylets of the scales were found in the bark and fruits, and most were located in

* Recibido: septiembre de 2012
Aceptado: abril de 2013

epidérmico y parenquimatoso del exocarpio y en el área en donde se localizó el insecto. En rama, los estiletes de las escamas se detectaron en corteza, y en frutos la mayoría fueron localizados a nivel de las células del exocarpio. Aparentemente la penetración del aparato bucal de las escamas en los tejidos del aguacate fue intracelular y no se observó asociación de los estiletes con el tejido vascular. Zamora- Magdaleno *et al.*, 2001) (Zamora *et al.*, 2001).

Palabras clave: *Hemiberlesia lataniae*, *Hemiberlesia diffinis*, *Abgrallaspis aguacatae*, polifenoles, plantaciones de aguacate, plaga.

Introducción

El aguacate se cultiva en 60 países del mundo, de los cuales México destaca como el principal productor (29% de la producción mundial), exportador (40%) y el de mayor consumo *per cápita* (10 kg) (Gutiérrez *et al.*, 2010; SE, 2012). En 2010, México exportó 368 mil toneladas principalmente a Estados Unidos de América (73.3%), Japón (11%) y Canadá (6.8%). Por lo que este fruto representa una de las principales fuentes de divisas agrícolas para el país (SE, 2012). La producción nacional de aguacate se lleva a cabo en 28 entidades federativas, de las cuales Michoacán destaca por ser el principal productor, aportando 86% de la producción, con la mayor superficie sembrada y cosechada (SE, 2012).

Sin embargo, en el sistema productivo del aguacate la presencia de plagas insectiles y enfermedades afectan la productividad y el rendimiento del cultivo, limitando en algunos casos el comercio internacional debido a los riesgos fitosanitarios que representan y a la exigencia de productos de mejor calidad en los mercados. Recientemente, en Estados Unidos de América, se reportó la presencia de ciertas especies de escamas armadas en frutos de aguacate 'Hass' provenientes de Michoacán, México, de las cuales algunas no están reportadas para este país (Morse *et al.*, 2009).

Las escamas armadas pertenecen a la familia Diaspididae y constituyen el grupo más numeroso de la superfamilia Coccoidea con alrededor de 400 géneros y 2 650 especies, de las cuales cerca de 200 son consideradas plagas de importancia económica (Miller y Davidson, 1990; Moran y

the exocarp cells. Apparently, the mouthparts of the scales penetrated the tissues of avocado intracellularly, and no association of the stylets with the vascular tissue was observed.

Keywords: *Abgrallaspis aguacatae*, avocado orchards, *Hemiberlesia diffinis*, *Hemiberlesia lataniae*, pest polyphenols.

Introduction

Avocado is grown in 60 countries, of which Mexico stands out as the largest producer (29% of world production), exporter (40%) and the one with the highest consumption *per capita* (10 kg) (Gutiérrez *et al.* 2010; SE, 2012). In 2010, Mexico exported 368 000 tons, mainly to the United States of America (73.3%), Japan (11%) and Canada (6.8%). Therefore, this fruit represents a major agricultural source of revenue for the country (SE, 2012). Domestic production of avocado takes place in 28 states, of which Michoacan is the largest producer, contributing 86% of the total production, with the largest planted and harvested area (SE, 2012).

However, the presence of insect pests and diseases in the production system of avocado affect productivity and crop yield, in some cases limiting international trade because of the phytosanitary risks they pose and the need for better quality products in the markets. Recently, the presence of certain species of armored scales in 'Hass' avocados from Michoacán, México, was reported in the United States of America; some of those species are not reported in Mexico (Morse *et al.*, 2009).

Armored scales belong to the family Diaspididae and constitute the largest group of the superfamily Coccoidea with about 400 genera and 2 650 species, of which about 200 are considered pests of economic importance (Miller and Davidson, 1990; Moran and Goolsby, 2010). Most of these insect species are polyphagous and cosmopolitan, while others are endemic to a particular geographic region (Kondo and Muñoz, 2009).

Worldwide, 53 species of armored scales belonging to 29 genera are reported to be associated with the cultivation of avocado, but few are of quarantine interest (Evans *et al.*, 2009; Kondo and Muñoz, 2009). Nine species have been detected in Mexico, particularly in Michoacán, of which *Hemiberlesia lataniae* (Signoret) and *Abgrallaspis aguacatae* (Evans, Watson and Miller) were the most widely distributed in the state, with *A. aguacatae* probably endemic to Michoacán (Lázaro- Castellanos *et al.*, 2011).

Goolsby, 2010). La mayoría de las especies de este insecto son polífagas y cosmopolitas, mientras que otras son endémicas de una determinada región geográfica (Kondo y Muñoz, 2009).

A nivel mundial se reportan asociadas al cultivo de aguacate a 53 especies de escamas armadas pertenecientes a 29 géneros, pero pocas son de interés cuarentenario (Evans *et al.*, 2009; Kondo y Muñoz, 2009). En México particularmente en Michoacán, se han detectado nueve especies, de las cuales *Hemiberlesia lataniae* (Signoret) y *Abgrallaspis aguacatae* (Evans, Watson y Miller) fueron las de mayor distribución en el estado, siendo *A. aguacatae* probablemente endémica de Michoacán (Lázaro-Castellanos *et al.*, 2011).

Con sus cuatro largos y finos estiletes adaptados para perforar los tejidos celulares y succionar sus fluidos nutritivos (Foldi, 1997), las escamas armadas dañan por punción las células del mesófilo y algunas veces los tejidos vasculares de hojas, ramas y frutos, afectando el crecimiento y en ocasiones (altas infestaciones) provocando la muerte de los tejidos de la planta (McClure, 1990). En aguacate, las escamas son abundantes en troncos y ramas mientras que en hojas y frutos se presentan como infestaciones progresivas (Faber y Phillips, 2003). Éstos insectos se establecen en zonas de difícil acceso como es el pedúnculo del fruto de aguacate, lo que dificulta su remoción en la línea de empaque, causando un incremento en el costo del proceso porque obliga a su remoción manual.

En México, el interés en la presencia de estos insectos en el cultivo de aguacate se ha ido incrementando por ser una plaga distribuida en la región productora. Sin embargo, a la fecha se desconoce el efecto de su establecimiento y alimentación en ramas y frutos. Además, existe escasa información acerca de la variabilidad en la susceptibilidad y en los mecanismos de defensa utilizados por el tejido vegetal ante el ataque de la escama armada (Miller y Davidson, 2005). En este sentido, la histología es una de las herramientas para el diagnóstico e identificación y hábitos de algunos fitopatógenos, que provee información de la interacción planta-patógeno, permitiendo conocer los mecanismos estructurales de defensa que tiene la planta para contrarrestar el ataque del patógeno. Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación, fue determinar si las especies de escamas armadas presentes en frutos y ramas de aguacate 'Hass' causan alteraciones a nivel histológico y sus implicaciones en los frutos y ramas.

With its four long thin stylets adapted to pierce the cell tissues and suck their nutritive fluids (Foldi, 1997), the armored scales damage the mesophyll cells by puncture and sometimes the vascular tissues of leaves, branches and fruits, affecting growth and occasionally (heavy infestation) killing the plant tissues (McClure, 1990). The scales are abundant in the trunk and branches of avocado, while in the leaves and fruits they appear as progressive infestations (Faber and Phillips, 2003). These insects establish themselves in hard-to-reach areas such as the peduncles of avocado fruits, making it difficult to remove them when the fruits are in the packing line and causing an increase in the cost of the process, as it becomes necessary to remove them manually.

In Mexico, interest in the presence of these insects has been increasing due to the fact that it is a pest that has spread all across the production region. However, to date the effect on branches and fruits of the colonization by these insects and of their feeding is not known. Moreover, there is little information about the variability of the susceptibility and the defense mechanisms used by plant tissues against the attack of armored scales (Miller and Davidson, 2005). Histology is one of the tools for the diagnosis and identification of the habits of some pathogens, providing information on the plant-pathogen interaction and helping us to know the structural defense mechanisms with which the plants can counter the pathogen attack. Therefore, the objective of this investigation was to determine whether the species of armored scales present in fruits and branches of 'Hass' avocado trees cause histological alterations and what are its implications for the fruits and branches.

Materials and methods

Histology

During January and June 2011, physiologically mature fruits and young branches (1 to 1.5 cm in diameter) with and without the presence of armored scales were collected (*A. aguacatae* and *Hemiberlesia* spp.) from commercial orchards of 'Hass' avocado located in the state of Michoacán, Mexico. Five trees were selected from each orchard (three with presence of scales and two without scales), apparently homogeneous with respect to phenology and size. Sampling was conducted in the four cardinal points and in two tree layers: medium (3-4 m) and low (1 to 2.5 m). Four fruits and four branches were collected per tree, with a total of 40 fruits and 40 branches per orchard. Fruits and branches were

Materiales y métodos

Histología

Durante enero y junio de 2011, se colectaron frutos en madurez fisiológica y ramas jóvenes (1 a 1.5 cm de diámetro) con y sin presencia de escamas armadas (*A.aguacatae* y *Hemiberlesia* spp.) de huertas comerciales de aguacate 'Hass', ubicadas en el estado de Michoacán, México. De cada huerta se seleccionaron 5 árboles (tres con presencia de escama y dos sin escama) aparentemente homogéneos en fenología y tamaño. Los muestreos se realizaron en los cuatro puntos cardinales y en dos estratos del árbol: medio (3 a 4 m) y bajo (1 a 2.5 m). Se recolectaron cuatro frutos y cuatro ramas por árbol, cubriendo un total de 40 frutos y 40 ramas por huerto. Los frutos y ramas se disectaron en fragmentos de aproximadamente 1 cm² y se agruparon en muestras con presencia de escama, sin escama y en muestras en donde se removió el insecto.

El material disectado, se fijó por 48 h en una mezcla de formaldehído, ácido acético glacial, etanol al 96% y agua destilada en proporción 100:50:50:350 mL. Posteriormente, se lavó con agua corriente durante 15 minutos, se deshidrató e infiltró en un procesador automático de tejidos Tissue - Tek® II, modelo 4640-B® (Sakura Finetechnical Co., LTD. Tokio Japan) durante 5 horas en cada una de las siguientes soluciones: etanol al 50, 70, 85, 96 y 100%; etanol absoluto: xilol absoluto (1:1), xilol absoluto y en dos cambio de paraplast (SIGMA chemical®) por 2.5 h en cada uno.

El tejido vegetal, se embebió en paraplast y se cortó transversalmente a 11 µm de grosor en un micrótopo rotatorio (Jung Histocut®, Marca Leica, modelo 820). Los cortes se montaron en portaobjetos con adhesivo de Haupt, se extendieron en una plancha térmica (C. O. Slide - Warner, modelo 26020) a 20- 25 °C durante 24 h y se tiñeron con safranina-verde rápido según la metodología de López *et al.* (2005). Las observaciones se realizaron en un microscopio óptico marca Carl Zeiss®, modelo Axiostar.

Estimación de polifenoles

Para la estimación de polifenoles totales, se seleccionaron de 5 a 12 preparaciones (laminillas) representativas de cada uno de los tratamientos evaluados (con presencia de la escama, sin escama, escama removida, y con dos especies de escama por sección de rama). De cada laminilla se seleccionaron

dissected in pieces of about 1 cm² and grouped in samples with and without the presence of scales, and in samples where the insect was removed.

The dissected material was fixed for 48 h in a mixture of formaldehyde, glacial acetic acid, 96% ethanol and distilled water in a proportion of 100:50:50:350 mL. Subsequently, it was washed with running water for 15 minutes, dehydrated and infiltrated into an automatic tissue processor Tissue - Tek® II, Model 4640-B® (Sakura Finetechnical Co., LTD. Tokyo Japan) for 5 hours in each of the following solutions: ethanol 50, 70, 85, 96 and 100%; absolute ethanol: absolute xylene (1:1), absolute xylene, and in two changes of Paraplast (Sigma Chemical®) 2.5 h in each.

The plant tissue was embedded in paraplast and cut transversely at a thickness of 11 µm in a rotary microtome (Jung Histocut®, Leica brand, model 820). The sections were mounted on slides with Haupt adhesive, spread on a thermal plate (C.O. Slide - Warner, model 26020) at 20 to 25 °C for 24 h and stained with safranin-fast green according to the methodology of López *et al.* (2005). The observations were made in a light microscope Carl Zeiss®, model Axiostar.

Estimation of polyphenols

For estimation of total polyphenols, 5 to 12 representative preparations (lamellae) were selected from each of the treatments evaluated (presence of scales, without scales, removed scales, and two species of scales per branch section). Three cuts were randomly selected from each lamella, and photographs from six different visual fields were taken of each cut (two fields before the scales were observed, two fields of view of the site where the scales were located, and two visual fields after the scales were observed). Ten points were randomly selected on each of the captured visual fields and the following color values were measured: R (Red) G (Green) B (Blue), with the GIMP program, version 2.6.11. The images were taken with a digital microscope camera Pax cam 3® integrated to a photomicroscope Carl Zeiss III®. The photographs were taken with a 40 x lens with a resolution of 300 dpi.

Identification of the armored scales species

Ten adult females of each genus and species were collected in the field (*Hemiberlesia* spp. and *Abgrallaspis aguacatae*), preserved in 70% alcohol and mounted following the technique of Kosztarab (1963). The identification of the species was made using the keys of Evans *et al.* (2009).

aleatoriamente tres cortes y de cada corte se tomaron fotografías de seis campos visuales diferentes (dos campos antes de observarse la escama, dos campos visuales del sitio en donde se localizó la escama, y dos campos visuales después de observar la escama). De cada uno de los campos visuales capturados se seleccionaron al azar diez puntos y en ellos se midió el color en valores R (Red) G (Green) B (Blue), con el programa GIMP versión 2.6.11. Las imágenes se tomaron con una cámara digital para microscopía Pax cam 3® integrada a un fotomicroscopio III de Carl Zeiss®. Las fotografías se tomaron con el objetivo de 40 x a una resolución de 300 dpi.

Identificación de las especies de escamas armadas

Del material colectado en campo, se tomaron diez hembras adultas de cada género y especie (*Hemiberlesia* spp y *Abgrallaspis aguacatae*), conservadas en alcohol al 70% y se montaron siguiendo la técnica de Kosztarab (1963). La identificación a nivel de especie se hizo con las claves de Evans *et al.* (2009).

Análisis estadístico

Los valores de color R G B, se analizaron de manera conjunta, mediante la construcción de una variable canónica. El modelo estadístico utilizado para frutos y ramas fue el mismo:

$$R_{ijk} G_{ijk} B_{ijk} = \mu + \zeta_i + \delta_j(\zeta_i) + \epsilon_{ijk} \quad (1)$$

Donde: RX_{ijkirj} = valor de color R de la k -ésima observación del sitio j -ésimo dentro del tratamiento i -ésimo; GX_{ijkirj} = valor de color G de la k -ésima observación del sitio j -ésimo dentro del tratamiento i -ésimo; BX_{ijkirj} = valor de color B de la k -ésima observación del sitio j -ésimo dentro del tratamiento i -ésimo; μ = vector de medias general; ζ_i = tratamiento i -ésimo, donde $i = 1, \dots, 4$ para rama, $i = 1, \dots, 5$ para fruto; $\delta_j(\zeta_i)$ = sitio j -ésimo dentro del tratamiento i -ésimo.

Donde $j = 1, \dots, 6$. Si $j = 1$ y 2 se refiere al sitio antes de localizarse el insecto, $j = 3$ y 4 sitio de localización del insecto y $j = 5$ y 6 se refiere al sitio después de la localización del insecto; ϵ_{ijk} = error experimental.

Posteriormente con las variables canónicas $W_1 = 0.0391 * R - 0.0071 * G + 0.0291 * B$ (en rama) y $W_1 = 0.0274 * R - 0.0468 * G + 0.0701 * B$ (en fruto) generadas a partir del modelo (1), se procedió a probar los siguientes juegos de

Statistical analysis

The RGB color values were analyzed together by constructing a canonical variable. The statistical model used for fruits and branches was the same:

$$R_{ijk} G_{ijk} B_{ijk} = \mu + \zeta_i + \delta_j(\zeta_i) + \epsilon_{ijk} \quad (1)$$

Where: RX_{ijkirj} = R color value of the k -th observation at the j -th site in the i -th treatment; GX_{ijkirj} = G color value of the k -th observation at the j -th site in the i -th treatment; BX_{ijkirj} = B color value of the k -th observation at the j -th site in the i -th treatment; μ = overall mean vector; ζ_i = i -th treatment, where $i = 1, \dots, 4$ for branch, $i = 1, \dots, 5$ for fruit; $\delta_j(\zeta_i)$ = j -th site in the i -th treatment.

Where $j = 1, \dots, 6$. Where $j = 1$ and 2 refers to the site before the insect was located, $j = 3$ and 4 to the site where the insect was located and $j = 5$, and 6 refers to the site after the insect was located; ϵ_{ijk} = experimental error.

Later, using the canonical variables $W_1 = 0.0391 * R - 0.0071 * G + 0.0291 * B$ (in branch) and $W_1 = 0.0274 * R - 0.0468 * G + 0.0701 * B$ (in fruit) generated from the model (1), we proceeded to test the following set of hypotheses, and multiple comparisons were performed with the Tukey test $\alpha = 0.05$ by a univariate analysis of variance (ANOVA):

$$\begin{aligned} H_a: & \text{At least one of the treatments} \\ H_0: & \zeta_1 = \zeta_2 = \zeta_3 \dots = \zeta_5 \quad \text{vs. is different from the others.} \\ H_a: & \text{At least one site is different} \\ H_0: & \delta_1 = \delta_2 = \delta_3 \dots = \delta_5 \quad \text{vs. from the others sites within} \\ & \text{treatments.} \end{aligned}$$

From the model:

$$W_{ijk} = \mu + \zeta_i + \delta_j(\zeta_i) + \epsilon_{ijk} \quad (2)$$

Where: W_{ijk} = k -th linear combination of RGB assigned to the j -th site of the i -th treatment.

Finally, the means of treatments and of sites within treatments were located in the canonical space and the correlations between the original variables and the canonical variables created were calculated.

W_1 is a contrast between B (tissue without damage), R (damaged tissue) and G (little damaged tissue). Therefore, if the mean values for the first canonical variable (W_1)

hipótesis y se realizaron comparaciones múltiples con la prueba de Tukey $\alpha=0.05$, a través de un análisis univariado de varianza (ANOVA):

$$H_0: \zeta_1 = \zeta_2 = \zeta_3 \dots = \zeta_5 \quad \text{vs.} \quad \begin{array}{l} \text{Ha: Al menos uno de los} \\ \text{tratamientos es diferente a los} \\ \text{demás.} \\ \text{Ha: Al menos uno de los sitios} \\ \text{es diferente a los demás dentro} \\ \text{de tratamientos.} \end{array}$$

A partir del modelo:

$$W_{ijk} = \mu + \zeta_i + \delta_j(\zeta_i) + \epsilon_{ijk} \quad (2)$$

Donde: W_{ijk} = combinación lineal k -ésima de R G B asignada al sitio j -ésimo dentro del tratamiento i -ésimo.

Finalmente se ubicaron las medias de tratamientos y de sitios dentro de tratamientos en el espacio canónico y se calcularon las correlaciones entre las variables originales y las variables canónicas creadas.

W_1 es un contraste entre B (tejido sin daño) vs R (tejido dañado) vs G (tejido poco dañado). Por lo tanto, si los valores de las medias para la primera variable canónica (W_1), son mayores y positivos significa que hay una menor acumulación de fenoles y en consecuencia menor daño al tejido vegetal (rama y fruto). En contraste si los valores de las medias de W_1 son menores e incluso negativos, significa que hay una mayor acumulación de fenoles y por lo tanto mayor daño. Esta variable canónica (W_1) es un indicador de un posible daño en los tejidos vegetales analizados. El análisis univariado y multivariado, así como la comparación múltiple de las medias de tratamientos y de sitios dentro de tratamientos se realizaron con la prueba de Tukey $\alpha=0.05$, usando el paquete estadístico SAS® para Windows versión 9.1.3.

Resultados y discusión

Identificación de las especies de escamas armadas

Se identificaron tres especies de escamas armadas: *Hemiberlesia lataniae* (Signoret), *H. diffinis* (Newsted) (escamas blancas) y *Abgrallaspis aguacatae* (Evans, Watson y Miller) (escama café), las cuales se detectaron infestando frutos y ramas de aguacate 'Hass'. *H. lataniae* es una especie cosmopolita y altamente polífaga presente en diversos

are higher and positive, it means that there is a lower accumulation of phenols and, therefore, less damage to the plant tissue (branch and fruit). In contrast, if the mean values of W_1 are lower and even negative, it means that there is a greater accumulation of phenols and, therefore, more damage. This canonical variable (W_1) is an indicator of possible damage to the plant tissues analyzed. Univariate and multivariate analysis, as well as the multiple comparison of the means of treatments and sites within treatments, were performed with the Tukey test $\alpha=0.05$, using the statistical package SAS® for Windows, version 9.1.3.

Results and discussion

Identification of armored scales species

We identified three species of armored scales: *Hemiberlesia lataniae* (Signoret), *H. diffinis* (Newsted) (white scales) and *Abgrallaspis aguacatae* (Evans, Watson and Miller) (brown scales), which were found infesting fruits and branches of 'Hass' avocado trees. *H. lataniae* is a highly cosmopolitan and polyphagous species present in various hosts, fruit, ornamental trees and forest trees (Miller and Davidson, 2005; Vargas and Rodríguez, 2008). According to studies by Lazarus-Castellanos *et al.*, (2011), *H. lataniae* was present in ten orchards of 'Hass' avocado sampled in nine municipalities of the state of Michoacán, and was the most widely distributed in this state. This scale has been reported infesting avocado in California, USA (Rugman-Jones *et al.*, 2009), Israel (Gerson and Zor, 1973), Australia (Waite, 1988), Chile (Vargas and Rodríguez, 2008) and South Africa (De Villiers and Van Den Berg, 1987).

The *H. diffinis* scale has been reported in a wide variety of hosts (Entomological Fauna of Nicaragua, 2012). This species has a smaller distribution in the avocado producing area in Michoacán, Mexico (Lázaro-Castellanos *et al.*, 2011) and has been reported infesting avocado in Nicaragua (Nicaragua Entomological Fauna, 2012).

Abgrallaspis aguacatae is a newly described species associated with 'Hass' avocado (Evans *et al.*, 2009), found in nine orchards located in six municipalities of Michoacán; it is a widespread species, probably endemic to this state (Lázaro-Castellanos *et al.*, 2011).

hospederos tanto frutales, como ornamentales y forestales (Miller y Davidson, 2005; Vargas y Rodríguez, 2008). De acuerdo con estudios realizados por Lázaro-Castellanos *et al.*, 2011), *H. lataniae* estuvo presente en diez huertos de aguacate 'Hass' muestreados en nueve municipios del estado de Michoacán, y fue la de mayor distribución en este estado. Esta escama, se ha reportado infestando aguacate en California EUA (Rugman-Jones *et al.*, 2009), Israel (Gersony y Zor, 1973), Australia (Waite, 1988), Chile (Vargas y Rodríguez, 2008) y Sudáfrica (De Villiers y Van Den Berg, 1987).

La escama *H. diffinis* se ha reportado en una amplia variedad de hospederos (Fauna Entomológica de Nicaragua, 2012). Ésta es una especie de menor distribución en la zona productora de aguacate en Michoacán, México (Lázaro-Castellanos *et al.*, 2011) y ha reportado infestando aguacate en Nicaragua (Fauna Entomológica de Nicaragua, 2012).

Abgrallaspis aguacatae es una especie de reciente descripción asociada al aguacate 'Hass' (Evans *et al.*, 2009), encontrándose en nueve huertos ubicados en seis municipios de Michoacán, siendo una especie de amplia distribución y probablemente endémica de este estado (Lázaro-Castellanos *et al.*, 2011).

Anatomía de ramas y frutos de aguacate sin escamas armadas

Rama. El tejido epidérmico de las ramas estuvo formado por un sólo estrato celular con una cutícula más o menos gruesa proyectada hacia las paredes anticlinales. Las células presentaron cuerpos densos rojizos de naturaleza fenólica (Figura 1A). La corteza y la médula estuvieron constituidas por varios estratos de células parenquimatosas isodiamétricas, las cuales mostraron citoplasma denso en la corteza y paredes celulares delgadas en la médula (Figuras 1A y 1B). El xilema se observó como un anillo grueso de tejido fibroso con numerosos vasos individuales o agrupados radialmente (Figuras 1B y 1C).

Fruto. El exocarpio, que puede ser rugoso e irregular (Barrientos *et al.*, 1996), presentó una cutícula gruesa, continua y homogénea que cubrió el tejido epidérmico (Schroeder, 1950), proyectándose entre, las paredes anticlinales de las células (Figura 1D). La epidermis estuvo formada por un sólo estrato celular y se extendió completamente sobre la superficie del fruto. Al igual que en las ramas, las células presentaron fenoles a manera de inclusiones más o menos densas de color castaño a rojizo (Figura 1D). Adyacentemente, se localizaron varias capas

Anatomy of branches and fruits of avocado trees without armored scales

Branches. The epidermal tissue of the branches was formed by a single cell layer with a more or less thick cuticle projected towards the anticlinal walls. The cells showed dense, reddish bodies of phenolic nature (Figure 1A). The bark and medulla were constituted by several layers of isodiametric parenchymal cells, which showed a dense cytoplasm in the bark, and thin cell walls in the medulla (Figures 1A and 1B). The xylem was observed as a thick ring of fibrous tissue with numerous individual or radially grouped vessels (Figures 1B and 1C).

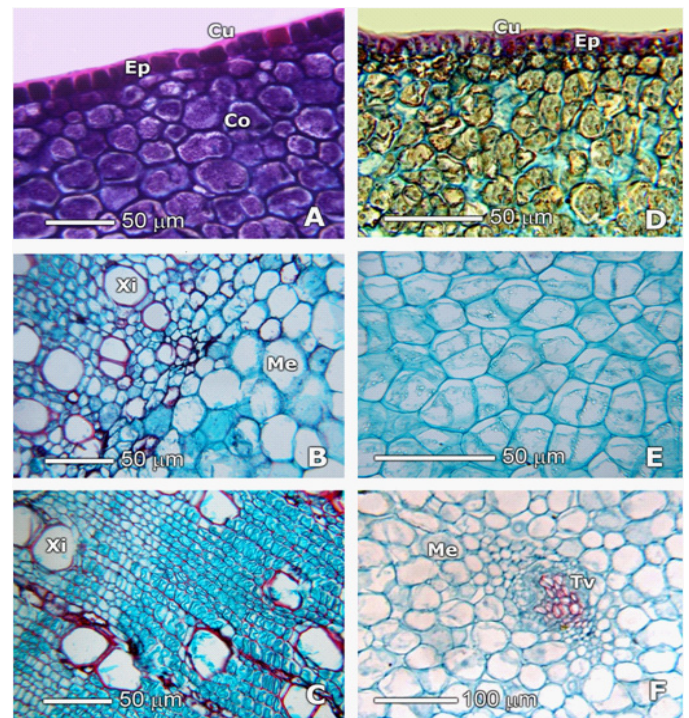


Figura 1. Fotomicrografías de cortes transversales de ramas jóvenes (A, B, y C) y frutos (D, E, y F) de aguacate 'Hass' sin presencia de escama. Tejido epidérmico y cortical. (A). Xilema y médula; (B). Xilema (C). Exocarpio; (D). Mesocarpio; (E). Médula y tejido vascular; (F). Corteza; (Co). Cutícula (Cu). Epidermis; (Ep). Médula; (Me). Tejido vascular; (Tv); y Xilema (Xi). Fotografías tomadas a 40 x.

Figure 1. Photomicrographs of transverse sections of young branches (A, B, and C) and fruits (D, E, and F) of 'Hass' avocado without the presence of scales. Epidermal and cortical tissue. (A). Xylem and medulla; (B). Xylem (C). Exocarpium; (D). Mesocarpium; (E). Medulla and vascular tissue; (F). Bark; (Co). Cuticle (Cu). Epidermis; (Ep). Medulla; (Me). Vascular tissue; (Tv); and xylem (Xi). Photographs taken at 40 x.

de células parenquimatosas isodiamétricas de pared delgada y con abundantes cloroplastos, los cuales le dan el color verde al exocarpo (Barrientos *et al.*, 1996) (Figura 1D). El mesocarpo estuvo constituido por células grandes de pared delgada y con pequeñas inclusiones de lípidos (Figura 1E). El xilema y el floema formaron haces de tejido vascular distribuidos en las células del mesocarpo (Figura 1F).

Respuesta histológica al establecimiento de escamas armadas en ramas y frutos de aguacate

Rama. No se observaron alteraciones estructurales en los tejidos de rama de aguacate en respuesta al establecimiento de las escamas armadas (Figuras 2A, y 2B). Hill *et al.* (2011) observaron que solo algunos genotipos de kiwi (*Actinidia chinensis*) infestados con *H. lataniae*, indujeron la formación de una herida en el punto de contacto entre la peridermis de la rama y la presencia de esta escama y las células del colénquima mostraron acumulación de material fenólico, hipertrofia y colapso celular.

El análisis de varianza para la acumulación de compuestos fenólicos mostró diferencias significativas en la epidermis y corteza de las ramas de aguacate en respuesta al establecimiento de las escamas armadas (Cuadro 1). El depósito de estos compuestos fue significativamente mayor en ramas infestadas con especies de escama blanca (*H. lataniae* y *H. diffinis*) en comparación con las infestadas por la escama café y con dos especies de escama por sección de rama (Cuadro 1), y podrían ser el resultado de la respuesta de la planta ante el ataque de insectos herbívoros, la cual involucra la activación de diversos genes que codifican la síntesis y acumulación de metabolitos secundarios (entre ellos los compuestos fenólicos). Algunos de estos compuestos fenólicos participan activamente restringiendo la invasión del insecto al resto de la planta (Sepúlveda *et al.*, 2004) y podrían estar relacionados con la inhibición de la actividad de enzimas pectolíticas producidas por el insecto (Agris, 2004).

La escasa deposición de compuestos fenólicos observada en secciones de rama con escama café y con dos especies de escama por sección de rama, posiblemente se deba a que la rama ya presentaba crecimiento secundario. Hill *et al.* (2011), observaron que ramas maduras de kiwi (*Actinidia chinensis*) infestadas con *H. lataniae* mostraron una respuesta más lenta y menos pronunciada al establecimiento de esta escama comparada con la observada en ramas jóvenes.

Fruit. The exocarpo, which can be rough and irregular (Barrientos *et al.*, 1996), presented a thick, continuous and homogeneous cuticle covering the epidermal tissue (Schroeder, 1950) and projecting between the anticlinal walls of the cells (Figure 1D). The epidermis was formed by a single cell layer and spread completely over the surface of the fruit. As in the branches, the cells presented phenols as more or less dense inclusions of brown to reddish color (Figure 1D). Adjacent to this, there were several layers of thin-walled isodiametric parenchymal cells with abundant chloroplasts, which give its green color to the exocarpo (Barrientos *et al.*, 1996) (Figure 1D). The mesocarpo was constituted by large thin-walled cells with small lipid inclusions (Figure 1E). The xylem and the phloem formed vascular tissue bundles distributed in the mesocarpo cells (Figure 1F).

Histological response to the colonization by armored scales in branches and fruits of avocado trees

Branches. No structural changes were observed in tissues of avocado branches in response to the colonization by armored scales (Figures 2A and 2B). Hill *et al.* (2011) found that only some kiwi genotypes (*Actinidia chinensis*) infested with *H. lataniae* induced the formation of a wound at the point of contact between the periderm of the branch and the scales; the collenchyma cells showed accumulation of phenolic material, hypertrophy and cellular collapse.

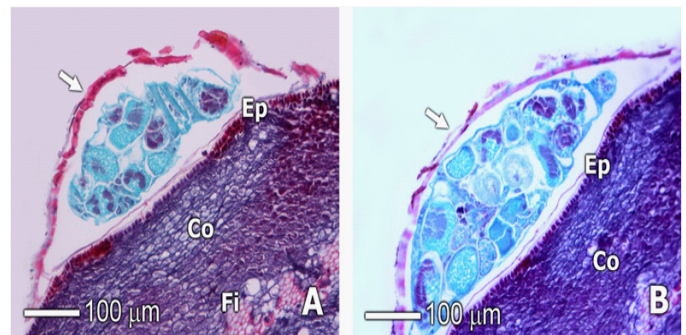


Figura 2. Fotomicrografías de secciones transversales de rama de aguacate infestadas con escamas armadas. Escama blanca (*Hemiberlesia* spp.) (A). Escama café (*A. aguacatae*); (B). Corteza; (Co). epidermis (Ep); y fibras (Fi). Las flechas señalan la localización de la escama. Fotografías tomadas a 10 x.

Figure 2. Photomicrographs of transverse sections of avocado branches infested with armored scales. White scale (*Hemiberlesia* spp.) (A). Brown scale (*A. aguacatae*); (B). Bark; (Co). Epidermis (Ep); and fibers (Fi). The arrows indicate the location of the scale. Photographs taken at 10 x.

Cuadro 1. Acumulación de fenoles en ramas de aguacate 'Hass' infestadas con escamas armadas.

Table 1. Accumulation of phenols in branches of 'Hass' avocado trees infested with armored scales.

Rama	Medias Color (RGB)
Sin escama	0.48a*
Con dos especies de escama (<i>Hemiberlesia</i> spp. y <i>A. aguacatae</i>)	-0.64b
Con escama café (<i>A. aguacatae</i>)	-1.13c
Con escama blanca (<i>H. lataniae</i> o <i>H. diffinis</i>)	-1.60d

*Estos valores representan el promedio de 1 660 campos visuales observados por tratamiento. Letras diferentes en la columna indican diferencia estadística significativa (Tukey, 0.05).

Fruto. Se observaron depresiones del tejido epidérmico asociadas con el establecimiento de las escamas armadas (Figura 3A). Es probable que tales cambios se hayan originado por la presión mecánica generada sobre el exocarpo; sin embargo no siempre se encontró tal asociación, además el exocarpo de la variedad 'Hass' es rugoso e irregular (Barrientos *et al.*, 1996), y las escamas tienden a localizarse en este tipo de superficies (Washington y Walker, 1990; Morse *et al.*, 2009), para protegerse de depredadores y de las condiciones ambientales, ya que al emerger de los huevecillos, la ninfa migratoria no presenta una cubierta protectora.

Los tejidos epidérmico y parenquimatoso del exocarpo del fruto presentaron acumulación de compuestos de naturaleza fenólica, esta respuesta fue mayor en aquellos tejidos en donde se removieron las escamas (Figuras 3B y 3C) (Cuadro 2). La acumulación de fenoles observada en ramas y frutos de Los resultados observados en las ramas y frutos de aguacate 'Hass' analizados, sugieren que las escamas se alimentan a partir de células vivas sin estimular la muerte de estas (De la garza, 1996; Stout *et al.*, 2006), o quizá su establecimiento no provocó un estrés tan severo que provocara un daño celular importante, pero si estimuló la síntesis de enzimas como la fenilalanina amónico liasa (PAL), la cual es clave en la biosíntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos (Agrios, 2004; Van Ledyveld, 1983), de los cuales Ramírez y Bor (1973), en frutos de aguacate refrigerados identificaron los siguientes: isómeros del ácido clorogénico y *p*-coumarylquinic, catequinas, leucoantocianinas, isoflavonoides, ácido cafeínico y *p*-cumarico. Siendo el ácido caféínico y cúmarico los que se encontraron en mayores cantidades en frutos mediana y altamente dañados (Van Ledyveld, 1983). No se observaron alteraciones celulares

The analysis of variance for the accumulation of phenolic compounds showed significant differences in the epidermis and bark of the branches of avocado in response to the colonization by armored scales (Table 1). The deposition of these compounds was significantly higher in branches infested with white scale species (*H. lataniae* and *H. diffinis*) compared to the ones infested with brown scales and with two scale species per branch section (Table 1); this could be the result of the response of the plant to an attack by herbivore insects, involving the activation of different genes that encode the synthesis and accumulation of secondary metabolites (including phenolic compounds). Some of these phenolic compounds actively participate in restricting the insect invasion from spreading to the rest of the plant (Sepulveda *et al.*, 2004) and may be related to the inhibition of the activity of the pectolytic enzymes produced by the insect (Agrios, 2004).

The low deposition of phenolic compounds observed in branch sections with brown scales and two species of scale per branch section is possibly due to the branch already showing secondary growth. Hill *et al.* (2011) observed that mature branches of kiwi (*Actinidia chinensis*) infested with *H. lataniae* showed a slower and less pronounced response to the colonization by this scale compared to that observed in young branches.

Fruit. We observed depressions in the epidermal tissue associated with the colonization by armored scales (Figure 3 A). It is likely that such changes were caused by the mechanical pressure generated on the exocarp; however, such association was not always found. Besides, the exocarp of the 'Hass' variety is rough and irregular (Barrientos *et al.*, 1996), and the scales tend to locate in these kind of surfaces (Washington and Walker, 1990; Morse *et al.*, 2009) to protect themselves from predators and environmental conditions, as the migratory nymphs lack a protective cover when they emerge from the eggs.

The epidermal and parenchymal tissue of the fruit exocarp presented an accumulation of phenolic compounds; this response was greater in those tissues from which the scales were removed (Figures 3B and 3C) (Table 2). The observed accumulation of phenols in branches and fruits of the 'Hass' avocado trees analyzed suggest that the scales feed from living cells without causing their death (De la Garza, 1996; Stout *et al.*, 2006). Or perhaps the colonization by the scales did not cause a stress so severe that would produce significant cell damage, but it did stimulate the synthesis of enzymes such as phenylalanine ammonia lyase (PAL), a key enzyme for the biosynthesis of most phenolic compounds (Agrios, 2004; Van Ledyveld, 1983), of which Ramirez and Bor (1973) identified the

ni anatómicas en los diferentes tejidos del fruto (exocarpio y mesocarpio) a pesar de la presencia de las especies de escamas armadas (*A. aguacatae*, *Hemiberlesia spp*), y el insecto aparentemente desarrollo normalmente.

Cuadro 2. Acumulación de fenoles en frutos de aguacate 'Hass' infestados con escamas armadas.

Table 2. Accumulation of phenols in 'Hass' avocado fruits infested with armored scales.

Fruto	Medias Color (RGB)
Sin escama	2.66a*
Con escama blanca (<i>H. lataniae</i> o <i>H. diffinis</i>)	1.93b
Con escama café (<i>A. aguacatae</i>)	1.75c
Con escama café removida	-0.05d
Con escama blanca removida	-0.1 d

*Estos valores representan el promedio de 500 campos visuales observados por tratamiento. Letras diferentes en la columna indican diferencia estadística significativa (Tukey 0.05).

Similares observaciones reportaron Washington & Walker (1990) en frutos de limón infestados con escama roja de California (*Aonidiella aurantii* Maskell), los cuales presentaron una mínima cantidad de células dañadas asociadas con la alimentación de esta escaguate 'Hass', sugiere que el establecimiento de las escamas indujo la biosíntesis de la fenilalanina amonialiasa (PAL), enzima involucrada en la biosíntesis de ácido caféico y cúmarico, en respuesta a condiciones de estrés (Agrios, 2004; Van Ledyveld, 1983), (Ramírez y Bor, 1973; van Ledyveld *et al.*, 1984; Agrios, 2004). En frutos al igual que en ramas no se observaron alteraciones estructurales, en respuesta al establecimiento de las escamas (Figura 3D).

Respuesta histológica de los tejidos de ramas y frutos de aguacate a la penetración del estilete.

Los estiletes de las escamas armadas están adaptados para perforar los tejidos de sus hospederos y succionar sus fluidos nutritivos (Foldi, 1997). En este trabajo no se observaron daños asociados con la penetración de los estiletes en la cutícula ni en las células epidérmicas de los frutos y ramas de aguacate (Figuras 4A y 4B). De acuerdo con el nivel de resolución microscópico, el estilete penetró intracelularmente las células parenquimatosas del exocarpio, la epidermis y corteza de rama (Figuras 4C y 4D), lo cual coincide con lo reportado en ramas de mora (Yasuda, 1979), en hojas y ramas de cítricos (Washington y Walker, 1990), y en ramas y frutos de kiwi (Hill *et al.*, 2011) infestados con escamas armadas.

following in refrigerated avocado fruits: isomers of chlorogenic acid and *p*-coumarylquinic, catechins, leucoanthocyanins, isoflavonoids, caffeic acid and *p*-coumaric acid. The caffeic and coumaric acids were found in greater amounts than other compounds in medium and highly damaged fruits (Van Ledyveld, 1983). No cellular or anatomical alterations were observed in the fruit tissues (exocarp and mesocarp) despite the presence of armored scales (*A. aguacatae*, *Hemiberlesia spp.*), and the insect had an apparently normal development.

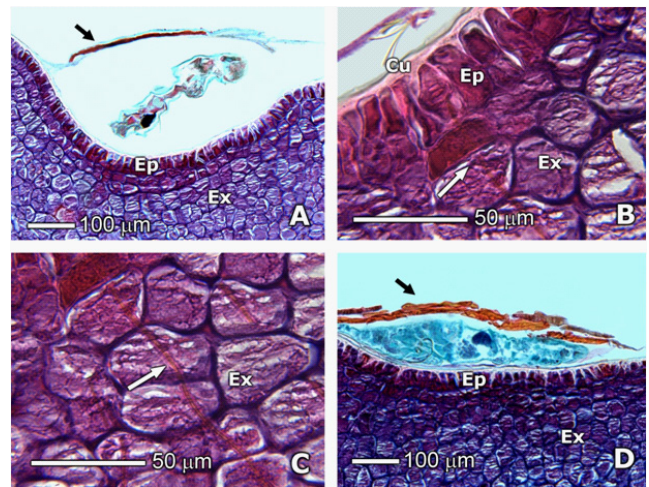


Figura 3. Fotomicrografías de secciones transversales de fruto de aguacate 'Hass' con presencia de especies de escama blanca (*Hemiberlesia spp.*) (A). Tejido epidérmico y parenquimatoso con depósitos de compuestos de naturaleza fenólica; (B y C). Secciones transversales de fruto de aguacate 'Hass' con presencia de escama café (*A. aguacatae*); (D). Cutícula; (Cu). Epidermis (Ep); y exocarpio (Ex). Las flechas señalan la ruta de penetración del estilete de la escama a través de los tejidos parenquimatosos del exocarpio y la localización de la escama. Fotografías A y D tomadas a 16 x, B y C tomadas a 40 x.

Figure 3. Photomicrographs of transverse sections of 'Hass' avocado fruits with presence of white scales (*Hemiberlesia spp.*) (A). Epidermal and parenchymal tissue with deposits of phenolic compounds; (B and C). Transverse sections of 'Hass' avocado fruits with presence of brown scales (*A. aguacatae*) (D). Cuticle; (Cu). Epidermis (Ep); and exocarp (Ex). The arrows indicate the path of penetration of the stylet of the scale through the parenchymal tissue of the exocarp, as well as the location of the scale. A and D photographs were taken at 16 x; B and C were taken at 40 x.

Washington & Walker (1990) reported similar observations in lemon fruits infested with California red scales (*Aonidiella aurantii* Maskell); the fruits had a minimal amount of

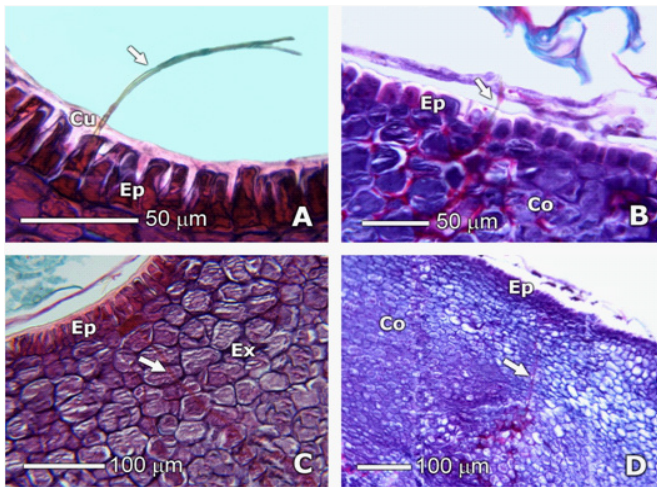


Figura 4. Fotomicrografías de secciones transversales de aguacate 'Hass' mostrando la penetración de los estiletes de la escama a través de los tejidos epidérmico y fundamental de frutos (A y C) y ramas (B y D) de aguacate 'Hass'. Corteza (Co). Cutícula; (Cu). Epidermis (Ep); y Exocarpio (Ex). Las flechas señalan los estiletes de la escama y su penetración a través de los tejidos epidérmico y parenquimatoso de ramas y frutos de aguacate. Fotografías A y B Tomadas a 40 x, fotografía C a 16 x y fotografía D a 10 x.

Figure 4. Photomicrographs of transverse sections showing the penetration of the stylets of the scales through the underlying epidermal tissue of fruits (A and C) and branches (B and D) of 'Hass' avocado. Bark (Co). Cuticle; (Cu). Epidermis (Ep); and exocarp (Ex). The arrows indicate the stylets of the scales and its penetration through the epidermal and parenchymal tissue of avocado fruits and branches. A and B photographs were taken at 40 x, the C photograph was taken at 16x, and the D photograph at 10 x.

Rama. No se observó asociación de los estiletes con el tejido vascular de las ramas. Es posible que las fibras de este tejido actúen como una barrera física y limiten el avance y penetración de estas estructuras de alimentación (Hill *et al.*, 2011), obteniendo estos insectos los nutrientes requeridos de las células del exocarpio y corteza. Sin embargo, se sugiere evaluar diferentes planos de corte para corroborar si existe o no asociación del estilete con el tejido vascular.

Fruto. Las paredes celulares del tejido parenquimatoso del exocarpio presentaron acumulación de compuestos de naturaleza fenólica a través de la ruta de penetración del estilete (Figura 5A). Es posible que la acumulación de estos compuestos contribuya con un aumento en la rigidez de las paredes celulares (Sepúlveda *et al.*, 2004), actuando como una barrera física al daño causado durante la penetración

damaged cells associated with the feeding of the scales, which suggests that, in the case of the 'Hass' avocado, the colonization by the scales induced the biosynthesis of phenylalanine ammonia lyase (PAL), an enzyme involved in the biosynthesis of caffeic and coumaric acids in response to stress conditions (Agrios, 2004; Van Ledyveld, 1983) (Ramirez and Bor, 1973; van Ledyveld *et al.* 1984; Agrios, 2004). No structural alterations were observed in fruits or branches in response to the colonization by the scales (Figure 3D).

Histological response to stylet penetration of the tissues of branches and fruits of avocado trees.

The stylets of the armored scales are adapted to pierce the tissue of their hosts and to suck their nutritional fluids (Foldi, 1997). No damages associated with the penetration of the stylets were observed in the cuticle or in the epidermal cells of the avocado fruits and branches in this study (Figures 4A and 4B). According to the microscopic observations, the stylet penetrated intracellularly the parenchymal cells of the exocarp, as well as the epidermis and the bark of the branches (Figures 4C and 4D), which is consistent with what was reported for berry branches (Yasuda, 1979), for leaves and branches of citrus trees (Washington and Walker, 1990), and for branches and fruits of kiwi trees (Hill *et al.*, 2011) infested with armored scales.

Branches. No association of the stylets with the vascular tissue of the branches was observed. It is possible that the fibers of this tissue act as a physical barrier to limit the advance and penetration of the feeding structures (Hill *et al.*, 2011), and so the insects obtain the nutrients they require from the exocarp and bark cells. However, we suggest evaluating different cutting planes in order to verify whether or not there is an association of stylets with vascular tissue.

Fruit. The cell walls of the parenchymal tissue of the exocarp showed accumulation of phenolic compounds through the stylet penetration pathway (Figure 5 A). It is possible that the accumulation of these compounds contributes to an increase in the rigidity of the cell walls (Sepúlveda *et al.*, 2004), acting as a physical barrier to the damage caused by the penetration of the stylet. The saliva of the insect allows the stylet to penetrate into the plant tissues (Snodgrass, 1935), and its enzymatic action probably induces too the accumulation of phenolic compounds. Although there are no reports of the composition of the saliva of the armored scales, Baranyovits (1953) and Ebeling (1959) reported that the California red scale (*Aonidiella aurantii*) has a salivary toxin that may be

del estilete. La saliva del insecto permite la penetración de los estiletes en los tejidos vegetales (Snodgrass, 1935) y su acción enzimática probablemente también indujo la acumulación de compuestos fenólicos. Aunque no existen reportes de la composición de la saliva de las escamas armadas, Baranyovits (1953) y Ebeling (1959) reportan que la escama roja de California (*Aonidiella aurantii*) posee una toxina salival que posiblemente sea el agente causal del daño provocado en los tejidos de ramas de cítricos, pero estos autores no dan más detalles de la composición de la toxina.

Por el contrario, las células que fueron atravesadas por los estiletes de las escamas aparentemente no presentaron daño (Figura 5B), Albrigo y Brooks (1977), observaron resultados similares en las células de corteza de ramas de cítricos atravesadas por los estiletes de la escama nieve (*Unaspis citri* Comst) y sugieren que las células pueden mantener su función aún después de la penetración de los estiletes.

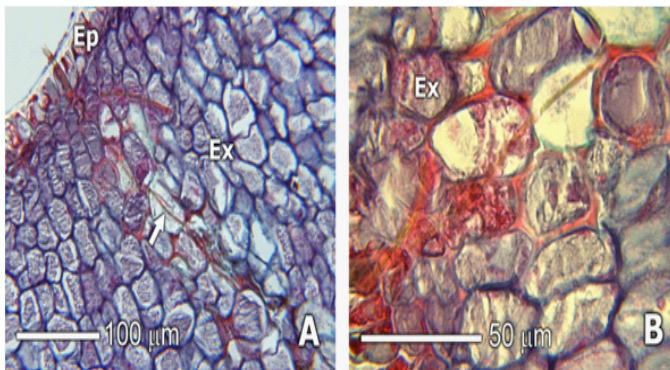


Figura 5. Fotomicrografías de secciones transversales de fruto de aguacate 'Hass', mostrando acumulación de compuestos fenólicos en las paredes celulares del exocarpo a través de la ruta de penetración (señalada por flechas) de los estiletes de la escama (A). Células de exocarpo sin presencia de daño a pesar de la penetración de los estiletes de la escama; (B). Epidermis (Ep); y Exocarpo (Ex). Fotografía A tomada a 16 x y fotografía B a 40 x.

Figure 5. Photomicrographs of transverse sections of 'Hass' avocado fruits, showing accumulation of phenolic compounds in the cell walls of the exocarp through the penetration pathway (indicated by arrows) of the stylets of the scale (A). Exocarp cells without damage despite being pierced by the stylets of the scales; (B). Epidermis (Ep); and Exocarp (Ex). Photograph A taken at 16 x and photograph B taken at 40 x.

Como se ha mencionado, una de las principales respuestas de las ramas y frutos de aguacate al establecimiento y penetración de los estiletes de las escamas armadas fue la

the causative agent of the damage done to the tissues of citrus branches, but these authors do not give more details about the composition of the toxin.

On the contrary, the cells that were pierced by the stylets of the scales showed no apparent damage (Figure 5B); Albrigo and Brooks (1977) observed similar results in the bark cells of citrus branches pierced by the stylets of snow scales (*Unaspis citri* Comst) and suggest that the cells can maintain their function even after being pierced by the stylets.

As mentioned, one of the main responses of the branches and fruits of avocado trees to the colonization by armored scales and the penetration of their stylets was the accumulation of phenolic compounds in the apoplast and symplast of the tissues of these organs. The fruits and branches infested with scales showed a higher accumulation of these compounds in the exocarp and in the epidermis and bark of the branches (Figures 6A and 6C) compared to the fruits and branches without scales (Figures 6B and 6D).

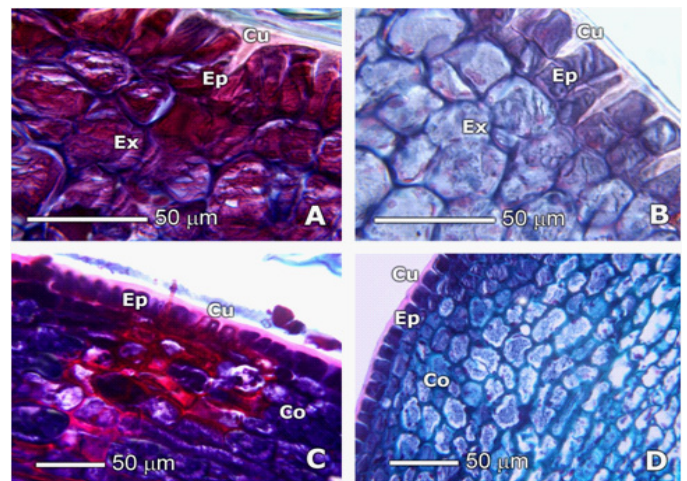


Figura 6. Fotomicrografías de cortes transversales de frutos (A y B) y ramas (C y D) de aguacate 'Hass'. Sin presencia de escamas armadas (B y D); con presencia de escamas armadas (A y C); mostrando deposición de compuestos de naturaleza fenólica en las células parenquimatosas del exocarpo de fruto (A) y de peridermis y corteza de rama (C). Corteza; (Co). Cutícula; (Cu). Epidermis (Ep); y exocarpo (Ex). Fotografías tomadas a 40 x.

Figure 6. Photomicrographs of transverse sections of fruits (A and B) and branches (C and D) of 'Hass' avocado. Without the presence of armored scales (B and D); with presence of armored scales (A and C); showing deposition of phenolic compounds in the parenchymal cells of the fruit exocarp (A) and in the periderm and bark of the branches (C). Bark; (Co). Cuticle; (Cu). Epidermis (Ep); and Exocarp (Ex). Photographs taken at 40 x.

acumulación de compuestos de naturaleza fenólica en el apoplasto y simplasto de los tejidos de estos órganos. Los frutos y ramas infestados con escamas mostraron mayor acumulación de estos compuestos en el exocarpo y en la epidermis y corteza de las ramas (Figuras 6A y 6C) con respecto a los frutos y ramas sin escama (Figuras 6B y 6D).

Conclusiones

Las escamas armadas. Lo anterior posiblemente sea el resultado en la respuesta de la defensa química contra el ataque de insectos herbívoros en las plantas superiores, la cual induce la síntesis y acumulación de metabolitos secundarios que participan activamente matando al insecto y/o restringiendo su invasión al resto de la planta (Sepúlveda, 2004). Sin embargo, aún cuando hubo acumulación de compuestos fenólicos el insecto aparentemente desarrollo normalmente y alimentación de las especies de escamas armadas (*A. aguacatae*, *Hemiberlesia spp.*). Sin embargo, a pesar de la presencia de compuestos fenólicos el insecto aparentemente desarrollo normalmente. *Hemiberlesia lataniae*, *H. diffinis* y *Abgrallaspis aguacatae* estuvieron asociadas a ramas y frutos de aguacate 'Hass'. El establecimiento de estas escamas y la penetración de su estilete en los tejidos de ramas y frutos indujeron la acumulación de compuestos fenólicos. En ramas los estiletes de las escamas se detectaron en la corteza y en el exocarpo de frutos. No se observó asociación de los estiletes con el tejido vascular de los órganos evaluados y las células que fueron atravesadas por los estiletes de las escamas no presentaron cambios en su estructura celular.

La calidad de la pulpa no se ve comprometida por la infestación de estas escamas. Sin embargo, es necesario un manejo integral en campo que reduzca las poblaciones de esta plaga en el cultivo y por ende en los frutos de aguacate 'Hass' con el objetivo de mejorar su apariencia externa.

Literatura citada

- Agrios, G. N. 2004. Fitopatología. Ed. Limusa. México D. F. 821p.
 Albrigo, L. G. and Brooks, R. F. 1977. Penetration of citrus cuticles and cells by citrus snow scale, *Unaspis citri* (Comst.). Proc. Int. Soc. Citric. 2:463-467.
 Baranyovits, F. 1953. Some aspects of the biology of armoured scale insects. Endeavour 12:202-209.

Conclusions

The processes described may be the result of the chemical defense response of superior plants against the attack of herbivorous insects, inducing the synthesis and accumulation of secondary metabolites involved actively in killing the insect and/or restricting the invasion from spreading to the rest of the plant (Sepúlveda, 2004). However, even when there was accumulation of phenolic compounds, the insect, apparently, developed normally. *Hemiberlesia lataniae*, *H. diffinis* and *Abgrallaspis aguacatae* were associated with branches and fruits of 'Hass' avocado. The colonization by these scales and the piercing of the tissues of branches and fruits by their stylets induced the accumulation of phenolic compounds. The stylets of the scales were detected in the bark of the branches and in the exocarp of the fruits. No association was observed between the stylets and the vascular tissue of the evaluated organs, and the cells that were pierced by the stylets of the scales showed no change in their cellular structure.

The pulp quality was not compromised by the infestation of these scales. However, a comprehensive in-field management is needed to reduce the populations of this pest in the crops and in the fruits of 'Hass' avocado in order to improve their appearance.

End of the English version



- Barrientos, P. A.; García, V. E.; y Avitia, G. E. 1996. Anatomía del fruto de aguacate, ¿Drupa o Baya? Revista Chapingo Serie Horticultura 2:189-198.
 De Villiers, E. and Van Den Berg, M. 1987. Avocado insects of South Africa. South African Avocado Growers Association. Yearbook. 10:75-79.
 Evans, G. A.; Watson, G. W.; and Miller, D. R. 2009. A new species of armored scale (Hemiptera: Coccoidea: Diaspididae) found on avocado fruit from Mexico and a key to the species of armored scales found on avocado worldwide. Zootaxa 1991:57-68.
 Ebeling, W. 1959. Subtropical fruit pests. University of California. Division of Agricultural Science, Berkeley. 436 pp.
 Faber, B. A. and Phillips, P. A. 2003. Avocado armored scale. UC IPM management guidelines: avocado. UC ANR Publication 3436. 5 p.
 Fauna Entomológica de Nicaragua. 2012. Familia Diaspididae. <http://www.avocadosource.com> (consultado agosto, 2012).
 Foldi, I. 1997. Internal anatomy of the adult female *In*: soft scale insects- Their biology and control. Ben-Dov, Y. and Hodgson, C. J. (Ed.). Elsevier Science B.V.
 Gerson, U. and Zor, Y. 1973. The armored scale insect (Homoptera: Diaspididae) of avocado trees in Israel. J. Nat. His. 7:513-533.

- Gutiérrez, C. M.; Lara, C. B.; Guillén, A. H.; y Chávez, B. A. 2010. Agroecología de la franja aguacatera en Michoacán, México. *Rev. Interciencia*. 35(9):647-653.
- Hill, M. G.; Mauchline, N. A.; Jones, M. K. and Sutherland, P. W. 2011. The response of resistant kiwifruit (*Actinia chinensis*) to armoured scale insect (Diaspididae) feeding. *Arthropod-Plant Interactions*. DOI 10.1007/s11829-011-9124-9 (consultado junio, 2011).
- Kondo, T. y Muñoz, V. J. 2009. Biodiversidad de los insectos escama en el aguacate/palta en el mundo y su importancia cuarentenaria. *In: Memoria del Tercer Congreso Latinoamericano del Aguacate*. Colombia. 2-23 p.
- Kosztarab, M. 1963. The armoured scale insect of Ohio (Homoptera: Coccoidea: Diaspididae). *Bull. Ohio, Biol. Survey, Ohio St. Univ.* 2(2) 120 pp.
- Lázaro-Castellanos, C.; González-Hernández, H.; Lomeli-Flores, J. R.; Svetlana, N. M.; Ortega-Arenas, L. D. y Ochoa-Ascencio, S. 2012. Enemigos naturales de escamas armadas (Hemiptera: Diaspididae) en aguacate Hass en Michoacán, México. *Revista Colombiana de Entomología* 38(1):6-13.
- López, C. L.; Márquez, G. J. y Munguía, S. G. 2005. Técnicas para el estudio del desarrollo en angiospermas. Editorial Las prensas de Ciencias. Facultad de Ciencias UNAM. 178 p.
- McClure, M. S. 1990. Host relationships. *In: Armored scale insects, their biology, natural enemies, and control*. Rosen, D. (Ed.). Elsevier New York. 289-303 p.
- Miller, D. R. and Davidson, J. A. 1990. A list of the armored scale insect pests. *In Armored scale insects, their biology, natural enemies, and control*. D. Rosen (Ed.). World crop pests, vol. 4B. Elsevier, New York. 299-306 p.
- Miller, D. R. and Davidson, J. A. 2005. Armored scale insects pest of trees and Shrubs. Cornell University Press, Itahaca, 442 p.
- Moran, J. P. and Goolsby, A. J. 2010. Biology of the armored scale *Rhizaspidiotus donacis* (Hemiptera: Diaspididae), a candidate agent for biological control of giant reed. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 103(2):252-263.
- Morse, J. G.; Rugman-Jones, P. F.; Watson, G. W.; Robinson, L. J.; Bi, J. L. and Stouthamer, R. 2009. High levels of exotic armored scales on imported avocados raise concerns regarding USDA-APHIS' phytosanitary risk assessment. *J. Econ. Entomol.* 102:855-867.
- Ramírez, M. J. R. and Bor, S. L. 1973. Phenolic Compounds in Frozen Avocados. *J. Sci. Food Agric.* 24:219-225.
- Rugman-Jones, P. F.; Morse, J. G. and Sthouthamer, R. 2009. Rapid molecular identification of armored scale insects (Hemiptera: Diaspididae) on Mexican 'Hass' avocado. *J. Econ. Entomol.* 102(5):1948-1953.
- Schroeder, C. A. 1950. The structure of the skin or rind of the avocado. *California avocado Society Yearbook*. 34:169-176.
- Secretaría de Economía (SE). 2012. Dirección General de Industrias Básicas. Monografía del Sector Aguacate en México: situación actual y oportunidades de mercado. <http://www.economia.gob.mx> (consultado mayo, 2012).
- Sepúlveda, J. G.; Porta, D. H. y Rocha, S. M. 2004. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21(3):355-363.
- Snodgrass, R. E. 1935. Principles of insects morphology. Mc. Graw Hill Book Company. 667 p.
- Vargas, R. y Rodríguez, S. 2008. Escama latania. *In: Manejo de plagas en paltos y cítricos*. Ripa, R.; Larral, P. (Eds.). Gobierno de Chile, Ministerio de Agricultura, Colección libros INIA. 23:163-171.
- Waite, G. K. 1988. Biological control of lataniae scale on avocados in south-east Queensland. *J. Agric. Animal Sci.* 45(2):165-167.
- Washington, J. R. and Walker, G. P. 1990. Histological studies of California red scale (Homoptera: Diaspididae) feeding on citrus. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 83(5):939-948.
- Yasuda, S. 1979. Microscopic observations on the external morphology of *Pseudaulacaspis pentagona* Targioni and on the portion of mulberry tissues inserted with the stylet. *Jpn. J. Applied Entomol. Z* 23(2):61-68.