

TÉCNICAS PARA LA REPRODUCCIÓN MASIVA Y LIBERACION EN CAMPO
DE *Trichopria drosophilae* (Perkins), PARASITOIDE DE LA MOSCA
DEL VINAGRE DE ALAS MANCHADAS

Elaborado por:

Jaime González-Cabrera, Jorge A. Sánchez-González, Lucía T. Fuentes-Guardiola, Gabriel Moreno-Carrillo, E. Gisela Córdoba-Urtiz, Ramón Cobián-Castellanos, Mario Y. Mendoza-Ceballos, Rosa E. García-García, y Hugo C. Arredondo-Bernal

Adscripción: Centro Nacional de Referencia de Control Biológico, CNRF-DGSV, SENASICA, Tecomán, Colima, México. Tel: (313) 324 0745. Correo-e: antonio.sanchez@senasica.gob.mx

Revisores externos en contenido y forma:

Dr. Juan A. Villanueva-Jiménez. SNI nivel 2 y Director General del Colegio de Postgraduados. Mexico. Correo-e: javj@colpos.mx

Dr. Valenzuela Escoboza. Fernando Alberto. SNI nivel 1 y Director de Facultad de Agricultura del Valle del Fuerte, Universidad Autónoma de Sinaloa. México. Correo-e: fernando.vzla@favf.mx

Dr. Samuel Ramírez Alarcon. SNI nivel 1 y profesor investigador del Posgrado Chapingo. Departamento de Parasitología Agrícola. Chapingo, Mexico. Correo-e: samuelram@prodigy.net.mx

Dr. Luis Devotto Moreno. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA-Quilamapu, Chile. Correo-e: ldevotto@inia.cl

Nota: la presente versión no ha sido sometida a Diseño Gráfico Digital

CONTENIDO	Página
Introducción.....	(4)
Clasificación taxonómica y distribución geográfica de <i>Trichopria drosophilae</i>	(6)
Descripción morfológica de <i>T. drosophilae</i>	(6)
Biología de <i>T. drosophilae</i>	(7)
<i>Trichopria drosophilae</i> como agente de control de <i>Drosophila suzukii</i>	(8)
Historia de <i>T. drosophilae</i> en México.....	(10)
Metodología de reproducción de <i>T. drosophilae</i>	(11)
Reproducción en <i>D. suzukii</i>	(11)
Compra del hospedero: plátano fresco.....	(11)
Colonia de <i>D. suzukii</i>	(12)
Colonia de <i>T. drosophilae</i>	(13)
Reproducción en <i>D. melanogaster</i>	(15)
Preparación del hospedero: dieta artificial	(15)
Colonia de <i>D. melanogaster</i>	(15)
Colonia de <i>T. drosophilae</i>	(15)
Almacenamiento de <i>T. drosophilae</i>	(16)
Envío, traslado, y liberación en campo de <i>T. drosophilae</i>	(16)

Control de calidad de <i>T. drosophilae</i>	(18)
Calidad en laboratorio.....	(18)
Calidad en el envío.....	(20)
Calidad en campo.....	(21)
Obtención y renovación genética de <i>T. drosophilae</i> y sus huéspedes.....	(22)
Colecta de los pies de cría.....	(22)
Mantenimiento del vigor genético.....	(24)
Prácticas sanitarias utilizadas en la reproducción de <i>T. drosophilae</i>	(25)
Instalaciones y equipos utilizados en la reproducción de <i>T. drosophilae</i>	(27)
Observaciones finales.....	(27)
Referencias citadas.....	(28)
Anexos.....	(35)
Cuadros.....	(35)
Figuras.....	(45)
Fotos.....	(46)

INTRODUCCIÓN

Drosophila suzukii (Matsumura) (Diptera Drosophilidae), conocida comúnmente como mosca del vinagre de alas manchadas, tiene su origen en el sureste del continente asiático (Cini *et al.*, 2012). No obstante, a partir del 2007, se inició la expansión de su distribución geográfica, y para marzo 2021 (última actualización de este documento) se encuentra distribuida en varios países de África, América, Europa y otras partes de Asia (Asplen *et al.*, 2015). Se considera una plaga de alto riesgo para la industria mundial de frutillas (arándanos, frambuesas, fresas, zarzamoras, entre otras), porque puede ocasionar pérdidas directas e indirectas (i.e., infección secundaria por diversos patógenos) de 20 a 50% del valor de la cosecha en cultivos convencionales y de hasta 100% en parcelas orgánicas (Cuch-Arguibau *et al.*, 2013; Cini *et al.*, 2012). Adicionalmente, puede ocasionar daños en frutas cultivadas de cáscara suave, por ejemplo, durazno, higo, manzana y uva (Asplen *et al.*, 2015).

A nivel mundial, *D. suzukii* se combate principalmente a través de productos químicos de amplio espectro como los piretroides y organofosforados. Estos productos pueden dañar al medio ambiente y la salud del consumidor, pero además han probado ser insuficientes para solucionar el problema, es decir, a pesar de que se aplican todas las prácticas de manejo recomendadas, la plaga aún causa una pérdida media de rendimiento del 19% en frambuesas y otros frutos rojos (DiGiacomo *et al.*, 2019). Adicionalmente, estas prácticas de manejo no se aplican en zonas urbanas, ni en terrenos adyacentes a los sitios de cultivo, y si estos sitios contienen una de las 50 especies de plantas hospederas silvestres de *D. suzukii* pueden ser una fuente constante de inóculo hacia las zonas agrícolas (Asplen *et al.*, 2015; Haye *et al.*, 2016). Por lo anterior, actualmente se evalúan métodos ecológicos y sustentables para controlar

a este díptero invasor (Hopwood *et al.*, 2016), entre ellos, el uso del parasitoide *Trichopria drosophilae* (Perkins), que es una opción viable para contribuir en el manejo fitosanitario de *D. suzukii*, debido a que su efecto en la reducción de la plaga alcanzaría tanto las áreas agrícolas como las circundantes.

Desde el 2015 (Trottin *et al.*, 2014; Gabarra *et al.*, 2015), evaluaciones realizadas en condiciones de laboratorio, invernadero y campo han indicado que *T. drosophilae* presenta un alto potencial para ser usado como agente de control biológico en un manejo integrado de *D. suzukii*; no obstante, seis años después de que se reconociera su alto potencial, aun no se libera rutinariamente como medida complementaria o de control total de *D. suzukii* (excepto un caso de comercialización descrito más adelante), probablemente por la falta de métodos eficaces de producción masiva.

La mosca del vinagre de alas manchadas fue detectada por primera vez en México durante el 2011, por lo cual para liberar parasitoides en los cultivos agrícolas afectados por este díptero invasor, y así contribuir en la protección de la industria nacional de frutillas (tercer producto agrícola más importante, con un valor económico de 2.106 millones de dólares [SIAP, 2019]), se estableció en mayo del 2015 la cría de *T. drosophilae* en el Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB), institución gubernamental ubicada en Tecomán, Colima, dependiente de la Dirección General de Sanidad Vegetal del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. A nivel mundial, *T. drosophilae* se reproduce a pequeña escala en los huéspedes *D. suzukii* y *D. melanogaster* Meigen (Diptera Drosophilidae), y para reproducir ambos huéspedes se utiliza una dieta artificial que contiene ingredientes de alto costo, como lo son el agar y metil parabeno. En contraste, en el CNRCB, *T. drosophilae* se reproduce en ambas especies huéspedes (foto 1), pero su

producción tiene el enfoque de cría masiva, es decir, no se requiere personal técnico especializado, los sustratos para reproducir a los huéspedes son de bajo costo (plátano fresco y dieta de germen de trigo), no se requieren instalaciones sofisticadas (solo se controla la temperatura y humedad relativa utilizando equipos de uso doméstico), y no se utiliza agar ni conservadores.

En este documento se detalla la experiencia generada en el CNRCB en la reproducción y liberación de *T. drosophilae* sobre *D. suzukii* y *D. melanogaster* desde el 2015. A la fecha (marzo 2021 = última actualización de este documento), ambos sistemas de producción se consideran exitosos porque ambos son relativamente estables al ataque de microorganismos patógenos, tienen altos volúmenes de producción, y cada una de ellos, tiene sus propias ventajas (descritas más adelante); además que las evaluaciones de campo indican reducciones de hasta 50% de la plaga como consecuencia directa de las liberaciones de este parasitoide (González-Cabrera *et al.*, 2019).

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE *T. drosophilae*

Trichopria drosophilae pertenece al reino Animal, phylum Arthropoda, clase Insecta, orden Hymenoptera, suborden Apocrita, infraorden Parasítica, superfamilia Proctotrupeoidea, familia Diapriidae, subfamilia Diapriinae, género *Trichopria*, especie *Trichopria drosophilae* (Carton *et al.*, 1986). Se considera un parasitoide cosmopolita. Su distribución incluye países de Asia (China, Corea), Europa (España, Francia, Italia, y Suiza) y América (Estados Unidos, México) (Woltering *et al.*, 2019). En México fue recolectado durante exploraciones de enemigos naturales nativos asociados a *D. suzukii*, las cuales fueron llevadas a cabo de marzo 2013 a febrero 2015, en Colima, México.

DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DE *T. drosophilae*

Trichopria drosophilae fue originalmente identificado en Hawaii como *Diapria drosophilae* (Perkins) (Perkins, 1910). Ambos sexos tienen alas sub-infuscadas con cilios cortos; cuerpo de aprox. 2 mm de longitud; patas amarillas con los segmentos apicales de los tarsos oscuros; cabeza lisa y brillante, con escasos pelos largos y un parche de pubescencia pálida a lo largo de los márgenes occipitales; tórax pulido con escasos pelos largos, pronoto revestido densamente con pelos; escutelo foveolado en la base; propodeo con una carina media formando un ángulo proyectado anteriormente, y el cual en vista lateral es pubescente a cada lado (Perkins, 1910).

El adulto presenta dimorfismo sexual en el abdomen y las antenas (foto 2). El cuerpo de los machos es casi negro teñido suavemente de rojo, mientras en las hembras el cuerpo es negro, con tórax, peciolo abdominal y algunas veces el segundo segmento abdominal más o menos rojizo o rojizo opaco. La antena en los machos es larga, el pedicelo no tan largo como el primer segmento funicular, el cual es mucho más corto que los siguientes y carece de un pedicelo basal largo, el segundo y siguientes segmentos funiculares son similares, cada uno con un pedicelo delgado, tan largo o más largo que la parte engrosada de cada segmento, el cual presenta una espiral de pelos largos; los segmentos funiculares apicales son notablemente más cortos que los basales, el último segmento es el más pequeño de todos. La antena de las hembras es más corta que la del macho, con una clava con tres segmentos bien definidos, el pedicelo más ancho y largo que el primer segmento funicular, el cual con todos los siguientes segmentos son alargados o sub-alargados, el séptimo segmento funicular es notablemente más ancho que los otros, pero aun así menos ancho que el segmento basal de la clava. El abdomen de las

hembras tiene el peciolo liso y corto, tan largo como ancho; en los machos es largo y con pubescencia densa (Perkins, 1910).

BIOLOGÍA DE *T. drosophilae*

Trichopria drosophilae es un endoparasitoide (i.e., que se desarrolla dentro del huésped) generalista que ataca pupas de drosophilidos (Diptera: Drosophilidae), entre las que se encuentran *Drosophila busckii* Coquillett, *D. hydei* Sturtevant, *D. immigrans* Sturtevant, *D. melanogaster*, *D. subobscura* Collin, *D. suzukii* y *Zaprionus indianus* Gupta (Carton *et al.*, 1986; Chabert *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2016). Es sinovigénico, idiobionte, solitario y protandro, es decir que las hembras al emerger requieren de un periodo de oviposición y alimentación para desarrollar y madurar sus huevos; paraliza al huésped después del ataque; oviposita un huevo por huésped; y los machos emergen primero que las hembras, respectivamente (Wang *et al.*, 2016; Kaçar, *et al.*, 2017; Woltering *et al.*, 2019).

Se desarrolla entre 15 y 35 °C, lo que le permite estar presente todo el año en la mayor parte del mundo, exceptuando en los países que tienen inviernos severos como Italia y Alemania. Su temperatura óptima está entre 20 y 25 °C (Rossi-Stacconi *et al.*, 2017; Amiresmaeili *et al.*, 2018).

Su ciclo de vida tiene cuatro estados de desarrollo: huevo, larva, pupa y adulto. Su desarrollo desde huevo hasta adulto fluctúa entre 17 a 23 días dependiendo de la temperatura, el sexo y tipo de huésped sobre el cual se desarrolla (Chabert *et al.*, 2012; Rossi-Stacconi *et al.*, 2017; Amiresmaeili *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018), por ejemplo, a 23 ± 1 °C y $40 \pm 5\%$ de humedad relativa, el ciclo de vida de las hembras de *T. drosophilae* reproducidas sobre *D. suzukii* dura 17.4 días (García-Cancino *et al.*, 2020). En condiciones óptimas de desarrollo, las hembras de *T. drosophilae* inician la oviposición 24 horas después de su emergencia, con una tasa de producción de 90 a

94 huevos (Chen *et al.*, 2018). Los adultos pueden vivir hasta 40 días (Rossi-Stacconi *et al.*, 2017; García-Cancino *et al.*, 2020).

Por el comportamiento del parasitoide ante altas densidades de huéspedes, ya sea grupos pequeños o un solo conjunto, se considera que tiene una respuesta funcional tipo II, es decir, conforme aumenta la densidad de huéspedes, tiene una fuerte respuesta en tiempo de residencia, número de encuentros y aumento del parasitismo (Kacar *et al.*, 2017).

Trichopria drosophilae* COMO AGENTE DE CONTROL DE *Drosophila suzukii

El uso de parasitoides es una opción viable para combatir a *D. suzukii*, principalmente porque el control puede alcanzar las zonas agrícolas y los sitios aledaños a los cultivos (Cuch-Arguimbau *et al.*, 2013; Cini *et al.*, 2012); consecuentemente, científicos de varias regiones de América, Asia y Europa, han explorado su fauna local en busca de parasitoides asociados a este díptero. Al momento se han determinado 16 especies que parasitan larvas, entre ellas *Ganaspis brasiliensis* Ihering y *Leptopilina boulandi* Barbotin, Carton & Kelner-Pillault (ambas, Hymenoptera: Figitidae) (García-Cancino *et al.*, 2015), y cuatro especies que parasitan pupas: *Pachycrepoideus vindemmiae* Rondani, *Spalangia simplex* Perkins (ambas, Hymenoptera: Pteromalidae), *Trichopria anastrephae* Lima y *T. drosophilae* (ambas, Hymenoptera: Diapriidae) (García-Cancino *et al.*, 2015; Moreno-Carrillo *et al.*, 2015; Rossi-Stacconi *et al.*, 2015; Vieira *et al.*, 2019).

Subsecuentes estudios indican que de todos los parasitoides nativos recolectados a nivel mundial, *T. drosophilae* tiene el más alto potencial para combatir a *D. suzukii*. En laboratorio se han registrado porcentajes de parasitismo de hasta 85% (Chabert *et al.*, 2012); los resultados obtenidos en

invernadero demuestran que el parasitoide restringe el crecimiento poblacional de la mosca, aunque este efecto se obtuvo solo durante un corto periodo de tiempo (Trottin *et al.*, 2014), y en tres estudios realizados en campo abierto se ha determinado que las liberaciones inundativas de este parasitoide redujeron hasta en 50% las poblaciones de la mosca (Rossi-Stacconi *et al.*, 2018a, b; González-Cabrera *et al.*, 2019). El primer y segundo estudio fueron realizados en cultivos de zarzamora en Italia (Rossi-Stacconi *et al.*, 2018a, b). En el primero, los investigadores liberaron 1000 parasitoides por sitio de muestreo durante 5 semanas, y al final de la prueba registraron que la población de la plaga disminuyó 28% (Rossi-Stacconi *et al.*, 2018a). En el segundo estudio, se liberaron parasitoides durante 7 semanas (0.33 adultos/m²), y al final de dicho periodo, se registró una reducción del 42% de la plaga como consecuencia de las liberaciones (Rossi-Stacconi *et al.*, 2018a). El tercer caso de liberaciones inundativas del parasitoide *T. drosophilae* se realizó en cultivos agrícolas de Colima y Jalisco, México (González-Cabrera *et al.*, 2019), y los resultados indicaron que los parasitoides redujeron en 50% la población de la mosca del vinagre de alas manchadas.

Cabe aclarar que a los agricultores que participaron en el estudio de González-Cabrera *et al.*, (2019) no se les restringió la aplicación de ninguna práctica agronómica, es decir, ellos aplicaron a su entera libertad una o varias de las siguientes actividades: desmalezado intensivo, eliminación total del fruto caído, trampeo masivo (trampas pegajosas, vinagre, o levadura + azúcar), detergentes y jabones, aceites esenciales, insecticidas botánicos (extractos de ajo, cuasia, canela, cebolla o neem) y químicos [Entrust® (Dow AgroSciences LLC, Indianápolis USA) o Mixxert® (Zare Agrhos, Michoacán México)]; por lo tanto, basado en el hecho de que la evaluación se llevó a cabo en áreas agrícolas en las que se permitió a los agricultores seguir las prácticas agrícolas normales, estos resultados

indican que *T. drosophilae* contribuye significativamente al manejo fitosanitario de *D. suzukii*.

Sin embargo, a pesar de que las múltiples evaluaciones realizadas a nivel laboratorio, invernadero y campo abierto indican que *T. drosophilae* tiene potencial para ser utilizado como agente de control biológico en un programa de manejo integrado de *D. suzukii* (Trottin *et al.*, 2014; Mazzetto *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016; Kacar *et al.*, 2017; Rossi-Stacconi *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018; Rossi-Stacconi *et al.*, 2018a, 2018b; González-Cabrera *et al.*, 2019), hoy en día este parasitoide no se utiliza como una práctica establecida de control. Excepto que se empezó a comercializar en Italia desde el 2017 (<http://bioplanet.eu/2152-2/>), y posteriormente en España, Francia y Portugal (Jessica Panchi, Bioplanet), pero para nuestro conocimiento no hay reportes públicos de cómo estos parasitoides se están utilizando.

HISTORIA DE *T. drosophilae* EN MÉXICO

El parasitoide *T. drosophilae* se colectó por primera vez en México durante los trabajos de exploración para la búsqueda de enemigos naturales de *D. suzukii*, realizados de marzo 2013 a febrero 2015 en Colima y Jalisco, y su cría se implementó en mayo del 2015 en el Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB)(18° 55' 37.73" N, 103° 53' 0.41" O) (foto 3).

Trichopria drosophilae se reproduce de dos maneras en el CNRCB. Inicialmente en mayo del 2015, se estableció la cría utilizando como huésped pupas de *D. suzukii*, con la ventaja de que los parasitoides adultos que se reproducen en este huésped tienen un mayor tamaño, y por consiguiente una mejor calidad. En parasitoides en general, el tamaño del adulto se correlaciona positivamente con su fecundidad, longevidad y capacidad de búsqueda, entre otras características (Slansky, 1982; Bai *et al.*

1992). No obstante a lo anterior, se derivó una segunda colonia reproducida exclusivamente en el díptero *D. melanogaster* en julio de 2019. Esta segunda colonia se implementó porque *D. melanogaster* es más prolífico, fácil de reproducir y tiene un ciclo de vida más corto que *D. suzukii*. Hoy en día, aun cuando se han realizado comparaciones biológicas entre ambos tipos de huéspedes, no se ha determinado cuál de los dos dípteros produce parasitoides con una mejor capacidad para controlar las poblaciones silvestres de *D. suzukii* (Daane et al. 2016; Wang et al. 2016; Kacar et al. 2017; Amiresmaeli et al. 2018; Woltering et al. 2019).

A marzo 2021, las crías de *T. drosophilae* en *D. suzukii* y *D. melanogaster* tienen más de 70 (desde mayo del 2015) y 24 generaciones (desde julio del 2019) de establecidas, respectivamente, y tras múltiples mejorías implementadas en el proceso de producción, ambas se consideran exitosas (razones previamente mencionadas). El ciclo de vida de huevo a adulto para *D. suzukii*, *D. melanogaster*, *T. drosophilae* reproducida en *D. suzukii* y *T. drosophilae* reproducida en *D. melanogaster*, y bajo condiciones ambientales establecidas en el CNRCB (descritas más adelante), es de 16 ± 2 , 14 ± 2 , 21 ± 3 y 18 ± 2 días, respectivamente (Fig. 1). En la siguiente sección, se describe la metodología de reproducción de *T. drosophilae* en ambos huéspedes.

METODOLOGÍA DE REPRODUCCIÓN DE *T. drosophilae*

A continuación se describen las actividades principales de la reproducción de *T. drosophilae* sobre *D. suzukii* y *D. melanogaster* (Fig. 1, Cuadro 1).

Reproducción en *D. suzukii*

La reproducción de *T. drosophilae* sobre *D. suzukii* se lleva a cabo utilizando dos espacios (cuartos de cría): uno para reproducir a los dípteros

y el otro para reproducir a los parasitoides. Las condiciones de temperatura y humedad relativa donde se reproducen los parasitoides es $25 \pm 1^\circ\text{C}$ y $60 \pm 5\%$, respectivamente, y las condiciones donde se reproduce los dípteros es $23 \pm 1^\circ\text{C}$ y $40 \pm 5\%$. En ambos casos, la fuente de iluminación es luz natural.

Compra del hospedero: plátano fresco. El plátano [*Musa paradisiaca* L. var. Colima (Zingiberales : Musaceae)] es el hospedero que se utiliza para la cría de *D. suzukii*. Éste debe estar maduro (cáscara color amarillo-claro) para usarse como sustrato de oviposición de la mosca del vinagre de alas manchadas. Si por necesidad se utiliza un plátano inmaduro (verde-amarillo) o con madurez avanzada (amarillo marrón) (foto 4), la cantidad de las pupas producidas se reduce hasta un 50%. La adquisición de plátano es local, se realiza una vez por semana, y se almacena en el mismo espacio donde se encuentra la colonia de *D. suzukii*. Previo a su uso para la cría de *D. suzukii*, el plátano se introduce en una solución compuesta de 20 mL de bactericida Microdyn® (Aurrera/Wal-Mart de México, Colima, México) con 40 L de agua durante 30 minutos, se talla suavemente para remover impurezas presentes en la cáscara, se enjuaga tres veces en agua limpia de grifo, se deja escurrir una hora, y cada plátano se corta longitudinal y transversalmente en trozos de 5 cm de largo (foto 5).

Colonia de *D. suzukii*. Para iniciar el ciclo de producción de la colonia de *D. suzukii*, se colocan en el interior de un cubo de reproducción 25 trozos de plátano lavado. Los cubos de oviposición de la mosca son de 40 cm por lado (estructura hecha de perfiles angulares de aluminio de 1 mm de grosor, 2.5 cm de ancho y remachado en las esquinas), cubierto con una capa de tela de organza, papel periódico en el fondo, con 200-400 adultos de *D. suzukii* de ≥ 4 días de edad (foto 6). Después de 48 horas (Fig. 1), se retiran los trozos de plátano y se colocan homogéneamente dentro

de cinco charolas de producción de *D. suzukii* (R10, Reyma. Guanajuato, México) (foto 7), e inmediatamente, se asperjan los trozos de plátano con alcohol etílico al 95% para evitar problemas de hongos, y a continuación se sellan las charolas con papel Parafilm® (Pechiney Plastic Packing, Chicago, Illinois, USA) o plástico para emplayar Clingfilm® (Reyma S.A. de C.V. León, Guanajuato) para evitar que escapen las larvas emergidas. Estas charolas selladas, se almacenan dentro del mismo laboratorio para permitir el desarrollo de la mosca. Ocho a diez días después, los huevos depositados se desarrollan hasta convertirse en pupas de *D. suzukii*; por lo que la charola se traslada al área de reproducción de los parasitoides, y así cíclicamente, cada tercer día se procesan 40 charolas R10. Estas charolas miden 17 cm en diámetro por 8 cm en altura; en su tapa tienen un orificio con tela de organza de 8 cm de diámetro para ventilación, y contienen en su interior tiras de papel periódico de 60 cm de largo por 5 cm de ancho (foto 8) para absorber los 25 mL de agua que exuda la fruta fresca durante el proceso de incubación (foto 9), lo cual evita que las larvas del díptero se ahoguen en este exudado.

Colonia de *T. drosophilae*. Para la reproducción de *T. drosophilae* se utilizan charolas R10 (proveniente del área de producción de *D. suzukii*), las cuales contienen 400 pupas de ≤ 48 horas de edad entremezcladas en los trozos de plátano (foto 10). A estas charolas, se les drena el líquido excedente generado por los exudados del plátano (foto 9), se les introducen 25 adultos de *T. drosophilae* (20 hembras + 5 machos de ≤ 2 días de edad) (foto 11) para llevar a cabo la oviposición del huésped, y se sellan como fue previamente mencionado para evitar la fuga de los parasitoides (los cuales nunca se retiran); a continuación, las charolas se almacenan dentro del mismo laboratorio para permitir el desarrollo de *T. drosophilae* (foto 12). Dieciocho a 24 días después emergerán los parasitoides adultos (foto 13), por lo que en el día 18 las charolas se

introducen al interior de un cubo de emergencia de parasitoides. Este cubo mide 1 m por lado, tiene una base metálica cubierta con cartulina blanca, está cubierto con tela de organza, y tiene tiras de papel encerado de 30 cm de largo x 2 cm de ancho con líneas delgadas (1 mm de ancho) de 50% miel + 50% polen como alimento de los parasitoides (Miel Santa Rosa. Tecomán, Colima; y La Abejita. Tecomán, Colima, respectivamente) (foto 14). Una vez dentro del cubo, las charolas se destapan para permitir la salida de los parasitoides adultos (foto 15). Estos adultos se colectan con un aspirador conectado a una bomba de vacío FE-1500L (Felisa. San Juan de Ocotán Zapopan, Jalisco) (foto 16), y se introducen en grupos de 100 individuos dentro de viales de plástico transparente (2 cm en diámetro por 6 cm en altura, orificios de 1.3 mm de diámetro en su parte superior para ventilación) (foto 17). Estos viales se etiquetan como Td/Ds (es decir *T. drosophilae* reproducida en *D. suzukii*) y se llevan al área de almacenado (foto 18) para utilizarlos como pie de cría o investigación. Todas estas actividades previamente mencionadas se repiten cada tercer día, y cada tercer día se procesan 40 charolas R10 con pupas de *D. suzukii* parasitadas.

Como no todas las pupas se parasitan, los dípteros emergidos en las charolas de producción de *T. drosophilae* (foto 19) se recolectan y se introducen (tan frecuente como sea necesario) en los cubos de reproducción de *D. suzukii* para renovar el pie de cría.

Reproducción en *D. melanogaster*

La reproducción de *T. drosophilae* sobre *D. melanogaster* se lleva a cabo utilizando tres espacios (cuartos de cría). En el primero se mantiene a las colonias de los dípteros y se ocupa para que dichos adultos ovipositen en la dieta artificial, el segundo se utiliza para el desarrollo de larva a pupa de los dípteros, y el tercero se utiliza para reproducir a los parasitoides. Las

condiciones de temperatura y humedad relativa para cada uno de estos tres espacios es $23 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C} / 40 \pm 5\%$, $23 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C} / 80 \pm 5\%$ y $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C} / 80 \pm 5\%$, respectivamente. La fuente de iluminación de estos espacios es luz natural.

Preparación del hospedero: dieta artificial. La colonia de *D. melanogaster* se lleva a cabo en una dieta artificial cuyo ingrediente principal es el germen de trigo, no requiere agar y el principal conservador o antibiótico es el benzoato de sodio. Esta dieta está basada en la cría de *Anastrepha ludens* Loew (Diptera: Tephritidae) (Bautista-Martínez, 2004), pero con modificaciones descritas por González-Cabrera *et al.* (2018, 2019). Sus ingredientes son los siguientes: ácido clorhídrico, agua purificada, alcohol etílico, azúcar de mesa, benzoato de sodio, germen de trigo crudo, harina de maíz, levadura de cerveza (González-Cabrera *et al.* 2017, 2018) y propionato de sodio (foto 20). Para propósitos de cría masiva en el CNRCB, la receta se maneja por lote (= 4 unidades) (Cuadro 2). El proceso de preparación es el siguiente: se mezclan en agua fría todos los ingredientes (excepto ácido clorhídrico y alcohol) y se hierven durante siete minutos, se enfrían a temperatura ambiente durante 10 minutos, se agregan el ácido clorhídrico y alcohol, y después de mezclarse todo por 30 segundos, esta dieta húmeda queda lista para usarse como sustrato de oviposición de *D. melanogaster* (foto 21).

Colonia de *D. melanogaster*. El ciclo de producción de la colonia de *D. melanogaster* se inicia cuando se depositan homogéneamente 220 gramos de dieta recién elaborada en el fondo de dos charolas de plástico transparente R10 (previamente descritas). Estas charolas conteniendo la dieta húmeda (sustrato para la oviposición) (foto 22) se introducen en el interior de un cubo de reproducción, el cual mide 40 cm por lado, su base es de plástico, sus paredes son de una capa de tela de organza y otra de Agribon® (Bonlam S.A. de C.V. San Luis Potosí,

México)], contiene 2000 adultos de *D. melanogaster* de ≥ 4 días de edad, y tiene un vaso cerrado de 24.8 mL con pabalo de algodón que les proporciona como alimento miel diluida en agua (proporción 2:3, respectivamente) a las moscas adultas (Foto17a, 24a). Después de 48 horas de oviposición, se extraen las charolas del cubo, y se transfieren a otra área para permitir el desarrollo embrionario de los huevos depositados. De ocho a diez días después, los huevos depositados se desarrollan hasta convertirse en pupas (foto 23), las cuales se extraen de las charolas de dos maneras: (1) si las pupas se encuentran pegadas en las paredes y tapa de las charolas, éstas se colectan utilizando una esponja húmeda; (2) pero si las pupas se encuentran entremezcladas en la dieta se procede a realizar un lavado: se colocan aproximadamente 10 litros de agua de grifo en una cubeta de plástico, enseguida se retira suavemente la dieta de las charolas R10 (i.e., ahí se encuentran contenidas las pupas) y se sumerge en el agua, la mezcla se agita varias veces para disolverla en el agua; subsecuentemente, las pupas flotan y se recolectan utilizando un colador casero (foto 24a). A continuación, tanto las pupas provenientes de la esponja o del lavado en agua, se dejan escurrir por 10 minutos en toallas de papel (Sanitas®. Kimberly-Clark de México, S.A.B. de C.V. DF, México), y ya secas se compilan en el fondo de otras nuevas charolas R10, es decir, ambos métodos permiten colectar pupas limpias, y confinarlas en un espacio menor (foto 24b). Finalmente, las pupas compiladas se trasladan al área de reproducción de los parasitoides. Cada tercer día se procesan 22 charolas R10 de reproducción de *D. melanogaster*.

Colonia de *T. drosophilae*. La reproducción de la colonia de *T. drosophilae* sobre *D. melanogaster* en el CNRCB, se realiza de la siguiente manera:

60 hembras y 20 machos de *T. drosophilae* (≤ 4 días de edad) se introducen en el fondo de una charola R10 con 3000 pupas lavadas de \leq

48 horas de edad (provenientes del área de producción de *D. melanogaster*) (foto 25). Se sella la charola colocando papel Parafilm o plástico para emplayar alrededor de la tapa para evitar el escape de los parasitoides, los cuales se dejan en la charola hasta su muerte. Inmediatamente, estas charolas se almacenan dentro de esta área del laboratorio para permitir la incubación de los huevos depositados por el parasitoide (foto 26). Dieciséis a 20 días después emergerán los parasitoides adultos (foto 27), por lo que en el día 16, las charolas se introducen al interior de un cubo de emergencia de parasitoides de 1 m por cada lado (previamente descritos), y una vez ahí dentro, se destapan para permitir la salida de los adultos (foto 28). La captura de los parasitoides adultos aquí emergidos se hace de manera idéntica a la captura de los parasitoides emergidos en *D. suzukii* (foto 29), y los viales se etiquetan como Td/Dm (es decir *T. drosophilae* reproducida en *D. melanogaster*). Cada vial, con 100 parasitoides, se lleva al área de almacenamiento donde se usan como pie de cría o para el desarrollo de investigación. Cada tercer día se procesan 18 charolas R10 con 3000 pupas.

Debido a que no todas las pupas se parasitan, los dípteros adultos emergidos en las charolas de producción de *T. drosophilae*, se colectan y se introducen tan frecuente como sea necesario en los cubos de reproducción de *D. melanogaster* para mantener constante la población de 2000 dípteros adultos por cubo.

ALMACENAMIENTO DE *T. drosophilae*

Los parasitoides emergidos de *D. suzukii* y *D. melanogaster* se almacenan hasta por 5 días como máximo en un anaquel que se encuentra en el mismo cuarto de cría (i.e., son dos lugares diferentes), y mientras permanecen ahí, cada tercer día se introduce una tira de papel encerado (6 cm de largo por 1.5 de ancho) con líneas delgadas de miel más

polen (previamente descritas) por vial (foto 30), la cual proporciona alimento a los parasitoides hasta que se decida su uso final, ya sea como pie de cría o para su liberación en campo.

ENVÍO, TRASLADO Y LIBERACIÓN EN CAMPO DE *T. drosophilae*

Para un óptimo desempeño de *T. drosophilae* en campo, se aplican varios lineamientos para el envío, selección de áreas, traslado y liberación, los cuales son descritos a continuación:

Las zonas de liberación de los parasitoides deben de cumplir tres especificaciones: (1) que en el sitio se haya detectado previamente la presencia de adultos de *D. suzukii*. *Trichopria drosophilae* es un parasitoide cosmopolita que parasita a especies de Drosophilidae, por ejemplo *D. melanogaster* o *Z. indianus*; no obstante su uso se fomenta para el control de *D. suzukii*, ya que las otras plagas son oportunistas, y por lo tanto, su presencia en las parcelas debe de estar positivamente correlacionada con la población de *D. suzukii* ahí presente (Bernardi *et al.* (2017); (2) la liberación se debe de realizar tanto en campos orgánicos como en cultivos convencionales que realicen un control de plagas bajo el concepto del manejo integrado de plagas. *Trichopria drosophilae* permite disminuir significativamente las poblaciones de *D. suzukii*, siempre y cuando su liberación sea parte integral del manejo agronómico dado a la parcela (González-Cabrera *et al.* 2019), es decir, si es necesario aplicar una medida fitosanitaria que afectará directamente a los parasitoides, la liberación de los parasitoides se debe de hacer respetando los intervalos de seguridad de dicha práctica; y 3) las liberaciones en campo se deben de realizar durante la etapa de floración hasta que finalice el corte de fruta fresca. Al ser *T. drosophilae* un parasitoide de pupas, si las liberaciones se hacen fuera de este periodo, solo se desperdiciarían ya que no habría huéspedes potenciales. Con respecto a la liberación en etapa de floración,

ésta es necesaria porque algunas frutas maduran hasta 30 días antes que el grueso de la cosecha.

El traslado de los parasitoides hacia las áreas de liberación se realiza de la siguiente manera: los viales con los parasitoides se colocan dentro de una hielera de unicel (i.e., poliestireno expandido) (tamaño de acuerdo al número de viales por envío) con un gel refrigerante (foto 31), se coloca la tapa, y se traslada en vehículo al lugar de destino. Es importante que el vehículo tenga encendido el aire acondicionado (19 °C), y que la hielera no este directamente bajo los rayos del sol. Una vez en el predio agrícola se procede a la liberación de *T. drosophilae*. Si por alguna razón hay que esperar unas horas, la hielera se debe de mantener cerrada en un lugar fresco (19 °C) y bajo sombra. Veinte minutos antes la liberación, se recomienda el retiro del gel refrigerante para homogenizar gradualmente las condiciones de temperatura dentro y fuera de la hielera. Posteriormente, se extraen los viales, se destapan y se le dan pequeños golpes en la parte trasera para ayudar a salir al parasitoide; esta actividad se hace a una altura de 15 cm del suelo (foto 32). La liberación se realiza por la mañana [antes de las 10:00 h] o por la tarde [después de la 17:00 h]; la apertura de cada vial se debe de realizar cada 50 metros lineales. Finalmente, las cantidades, fechas y sitios geográficos (coordenadas geográficas marcadas en el GPS) de liberación (foto 32) deben de registrarse en los formatos internos para validar la efectividad de las liberaciones.

La frecuencia de liberación recomendada es cada 25 días durante la etapa de floración, cada 15 días durante la etapa de fructificación, y cada 8 días durante la época de cosecha (ésta es la etapa cuando se prohíbe la aplicación de insecticidas en la parcela). La frecuencia como la cantidad liberada está sujeta a la disponibilidad de parasitoides producidos en el insectario.

CONTROL DE CALIDAD DE *T. drosophilae*

Calidad en laboratorio

La evaluación de la calidad de *T. drosophilae* se realiza mes a mes, bajo las mismas condiciones ambientales donde se reproducen. Se registran ocho parámetros de calidad, los cuales acomodados en orden de importancia son los siguientes: (1) parasitoides por unidad de producción; (2) fecundidad; (3) longevidad; (4) tamaño de hembras; (5) proporción sexual; (6) anormalidades morfológicas en adultos (deformes); (7) porcentaje de parasitación; y (8) porcentaje de emergencia de parasitoides (cuadro 3). Los valores mínimos aceptables se establecieron en base a valores los obtenidos en reportes mensuales internos y en datos publicados en revistas científicas (Cuadro 3).

Parasitoides por unidad de producción. Del lote de charolas R10 con pupas de *D. sukii* o *D. melanogaster* que fueron expuestas al proceso normal de parasitación, se escogen al azar 4 unidades (i.e., repeticiones por tratamiento), y se almacenan dentro del mismo cuarto de cría para permitir la incubación de los huevos depositados por el parasitoide. Días después (cuando emerjan y mueran todos los parasitoides), se contabilizan bajo un microscopio estereoscópico los parasitoides emergidos por charola (foto 34). La medición de este parámetro es útil porque desviaciones de la media histórica de producción sería un temprano indicador de que hay un problema en algún componente del ciclo de producción; adicionalmente puede ayudar a determinar si la implementación de alguna nueva práctica se refleja en un aumento de la producción.

Fecundidad total. El número de huevos depositados por hembra durante los días que permanece viva, se mide de la manera siguiente: siete

parejas vírgenes de ≤ 24 horas de emergidas (repeticiones por tratamiento) se colocan individualmente en viales transparentes cubiertos con tela de organza para permitir ventilación, con algodón húmedo de agua y miel (proporción 2:3) como fuente de alimento y con 60 pupas de ≤ 24 horas de edad como sustrato de oviposición (foto 35). Cada 48 horas, las parejas se transfieren hacia nuevos contenedores, finalizando las transferencias hasta la muerte natural de las hembras. Días después, cuando emergen y mueren todos los adultos, se contabiliza bajo microscopio estereoscópico el número de especímenes emergidos (medición indirecta de la oviposición) por contenedor. La medición de este parámetro es importante porque en parasitoides solitarios, como lo es *T. drosophilae*, la fecundidad total se relaciona con el número de individuos muertos de la plaga.

Longevidad de hembras. Para medir el número de días que viven las hembras, se recolectan 15 especímenes de ≤ 24 horas de emergidas (repeticiones por tratamiento), se colocan individualmente en viales transparentes con tapa cubierta por tela de organza para permitir la ventilación, y algodón húmedo de agua y miel (proporción 2:3) como fuente de alimento. La mortalidad se mide diariamente contabilizando los cadáveres en cada vial. La longevidad es un parámetro utilizado para determinar la calidad de un organismo que se produce en insectarios, por ejemplo, dietas mal preparadas o la presencia de patógenos ocasionan que los adultos vivan menos días, lo que alertaría al personal de que hay un problema en el sistema de producción.

Tamaño de hembras. Para conocer el tamaño de los individuos, se escogen al azar ocho hembras (repeticiones por tratamiento), y se les mide el largo de la tibia de una de las patas traseras (foto 36). Estas medidas se toman con un micrómetro óptico montado en el ocular-40X de un microscopio de contraste de fases. La medición de este parámetro es

importante porque en parasitoides, el tamaño del adulto esta correlacionado directamente con su fecundidad, longevidad y capacidad de búsqueda, entre otras características (Slansky, 1982; Bai *et al.* 1992).

Proporción sexual de la progenie. Del lote de charolas R10 con pupas parasitadas por *T. drosophila*, se escogen al azar 4 unidades (i.e., repeticiones por tratamiento), y se almacenan dentro del mismo cuarto de cría para la incubación de los huevos depositados por el parasitoide. Días después (cuando emerjan y mueran todos los parasitoides), se determina bajo un microscopio estereoscópico la proporción sexual (hembras) de toda la progenie por charola (foto 37). Este parámetro es importante porque un exceso de hembras o de machos es una indicación temprana de que algún problema está afectando la colonia, por ejemplo, una enfermedad genética (depresión endogámica o selección inadvertida hacia las condiciones de cría) o condiciones defectuosas en alguna de las etapas de cría.

Anormalidades morfológicas en adultos. Para medir el porcentaje de adultos deformes, se toman al azar 4 charolas transparentes R10 (repeticiones por tratamiento) de todo el lote de producción, e inmediatamente se recolectan al azar 100 especímenes por unidad de producción. Se revisa la presencia de deformaciones en abdomen, alas y patas (foto 38). El porcentaje de deformidades se calcula al dividir el número de adultos deformes entre 100. Si se llegaran a presentar $\geq 5\%$ de adultos deformes, ello indicaría que existen problemas en alguna parte del proceso de producción, desde fallas eléctricas en la sala de cría, deterioro genético, baja calidad de los insumos y hasta la presencia de patógenos.

Porcentaje de pupas parasitadas y de emergencia de adultos. De cuatro charolas de producción (repeticiones por tratamiento), se seleccionan al azar 100 pupas; de esta cantidad, se determina el número

de pupas parasitadas y la cantidad de adultos emergidos (foto 39). Las pupas parasitadas se distinguen porque son amarillo-cremosas entremezcladas con pigmentación oscura, a diferencia de las no parasitadas que se ven cremosas translúcidas (i.e., vacías, porque la mosca ya emergió), y las pupas con un agujero redondo cerca de los espiráculos respiratorios indican la emergencia de un parasitoide. El porcentaje de pupas parasitadas se calcula al dividir la cantidad de especímenes parasitados entre 100, y el porcentaje de adultos emergidos se calcula dividiendo la cantidad de adultos emergidos entre la cantidad de pupas parasitadas. Igual que en pruebas anteriores, el registro de medias aritméticas menores al límite mínimo es una indicación temprana de que algún factor está afectando la colonia.

Calidad en el envío

El efecto del traslado en la calidad de *T. drosophilae* se mide una vez cada seis meses. Para ejecutar esta prueba se evalúa el material trasladado y no trasladado (cuadro 4), de la manera siguiente: se toman al azar 8 viales con parasitoides del lote de producción del CNRCB; cuatro de ellos se quedan en las condiciones normales de almacenamiento (previamente descritas) y el resto se trasladan siguiendo el procedimiento previamente señalado. Una vez trasladada la hielera al lugar donde se liberarán los parasitoides, se miden dos parámetros (mortalidad y longevidad de los parasitoides) de manera idéntica y simultánea tanto en el CNRCB como en las instalaciones adyacentes al predio donde se realizará la liberación de los adultos de *T. drosophilae*. Para medir la mortalidad ocasionada por el envío, se realiza el conteo de parasitoides adultos muertos por vial (repeticiones por tratamiento), y para medir la longevidad de los parasitoides por vial (repeticiones por tratamiento), se registra la mortalidad del resto de la población cada 24 horas hasta obtener el 100% de mortalidad/vial.

Calidad en campo

La medición del efecto de *T. drosophilae* sobre las poblaciones de *D. suzukii* se hace cada seis meses en campo (cuadro 5). Para medir esta actividad, se seleccionan tres ranchos de zarzamora (bloques completos al azar), y en cada uno se escogen dos áreas de 33 x 33 m, separadas entre ellas por al menos 100 metros lineales. En la primera área no se hacen liberaciones y se considera testigo, y en la segunda se liberará a *T. drosophilae*. Posteriormente, se delimitan con banderines cada una de las áreas experimentales, y se ejecuta el siguiente procedimiento: se liberan 450 parasitoides adultos (recolectados al azar en el CNRCB, ≤ 4 días de edad) en la parcela seleccionada, y quince días después se colocan por sitio 4 trampas de vinagre (repeticiones por tratamiento) y 4 trampas centinelas (repeticiones por tratamiento). Las trampas de vinagre son contenedores de plástico transparente de 18 cm de altura y 6 cm de diámetro; tienen 8 agujeros de 0.8 cm de diámetro en su parte superior por donde son capturados los adultos de *D. suzukii*. A estas trampas, con tapa impermeable, se les colocan 100 mL de vinagre para atraer a los dípteros y subsecuentemente propiciar su ahogamiento (foto 40). Las trampas centinelas (foto 41) son contenedores de plástico transparente de 5.5 cm de altura y 7 cm de diámetro, con tapa impermeable, múltiples agujeros de 1.33 mm de diámetro en su parte media, por donde entre el parasitoide, y 12 pupas de *D. suzukii* de ≤ 2 días de edad para la oviposición de *T. drosophilae* (foto 42). Después de 48 horas de haber estado en las áreas experimentales, se recuperan las trampas de vinagre y se cuantifica visualmente el número de adultos de *D. suzukii* por unidad (medición de la densidad poblacional de este díptero). Las trampas centinelas son recuperadas e introducidas en hieleras de unicel para su transporte a las instalaciones de producción de los insectos benéficos. Una vez ahí, estas trampas se almacenan en el cuarto de cría para el desarrollo embrionario

y post-embrionario del material biológico recién colectado en campo. Días después, cuando emergen los insectos, se determina el número de parasitoides emergidos por trampa (medición de la densidad poblacional de *T. drosophilae*) (foto 43). Insectos que no sean de la especie aquí evaluados se descartan porque se considera que su efecto aleatorio es similar entre todos los tratamientos.

En algunas ocasiones, en las trampas de vinagre instaladas en las parcelas agrícolas se pueden llegar a detectar dípteros oportunistas (i.e., ovipositan en frutos maduros y en maduración, pero con epidermis dañada), como por ejemplo *D. melanogaster* o *Z. indianus*; sin embargo, su presencia en los campos agrícolas esta correlacionada positivamente con las poblaciones de *D. suzukii*; por lo que la población de *D. suzukii* es la variable importante que se debe monitorear.

RENOVACIÓN GENÉTICA DE *T. drosophilae* Y SUS HUÉSPEDES

Colecta de los pies de cría

El establecimiento del pie de cría de *D. suzukii* se hace a partir de la colecta de zarzamora con daño visual en sitios con presencia de adultos de este díptero. Una lupa 30X es suficiente para observar pequeñas hendiduras o pinchados en el epicarpio del fruto ocasionados por las hembras de la plaga, o fruta de desecho que presente hendiduras, golpes o imperfecciones; una vez cosechada la fruta seleccionada, se debe trasladar al laboratorio para incubar el material biológico a 23 ± 1 °C y 40 ± 5 % de humedad relativa. Días después, emergerán los dípteros adultos, y utilizando claves dicotómicas se puede determinar taxonómicamente si es *D. suzukii* (Vlach, 2010; Yuzuki y Tidon, 2020). Si se confirma la identidad, los especímenes son usados como pie de cría para iniciar una colonia. Debido a la gran diversidad de familias y géneros de insectos, no siempre se puede lograr una correcta identificación; por lo que se tiene que recurrir

a los expertos. Una opción es el Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria de la Dirección General de Sanidad Vegetal, SENASICA, ubicado en Km 37.5 Carretera Federal México-Pachuca. Calle Centenario, Tecámac de Felipe de Villanueva, Estado de México. C.P. 55740. Teléfono: (55) 5905 1000 Ext. 51402.

Drosophila melanogaster es un díptero oportunista que se desarrolla en fruta previamente dañada por *D. suzukii* (Bernardi et al., 2017); por lo que su pie de cría también se puede obtener en sitios donde se haya detectado previamente la presencia de adultos de *D. suzukii*, de la manera siguiente: se colocan 10 bandejas de plástico transparente (17 cm de diámetro por 8 cm de altura, con agujeros de 1.3 mm de diámetro en su parte superior para permitir la entrada de insectos más pequeños que este tamaño) con cinco piezas de plátano fresco (5 cm de largo). Después de 48 horas de exposición en el campo, estas trampas centinela se recolectan y se transportan a las instalaciones destinadas para su incubación a 23 ± 1 °C y $40 \pm 5\%$ de humedad relativa. Días después, emergerán los adultos de *D. melanogaster*, y si utilizando claves dicotómicas (Yuzuki y Tidon, 2020) se corrobora su identidad taxonómica (tal y como se hizo con *D. suzukii*), estos adultos pueden ser utilizados como pie de cría.

Para la colecta de *T. drosophilae* se colocan, durante 48 horas, 15 trampas centinelas a nivel del suelo y a 10 cm de distancia de la base de la planta de zarzamora. Las trampas centinela son charolas de plástico transparente (R10. Reyma. Guanajuato, México, de 17 cm de diámetro y 8 cm de alto) con 400 pupas de *D. suzukii* de ≤ 24 horas de edad entremezcladas en los trozos de plátano y tapas perforadas (malla transparente con orificios homogéneos de 1.3 mm de diámetro) para permitir la entrada de parasitoides; las dimensiones de los orificios excluye los enemigos naturales de mayor tamaño que el parasitoide *T.*

drosophilae. Después de 48 horas, se recogen las trampas centinelas, y se llevan a las instalaciones destinadas para monitorear la emergencia de dípteros y parasitoides. Días después, emergerán los adultos parasitoides, los cuales pueden ser identificados con claves taxonómicas bajo microscopio estereoscópico (Perkins, 1910; Wharton, 2020). Otra opción es enviarlos al Centro Nacional de Referencia de Control Biológico de la General de Sanidad Vegetal, SENASICA, ubicado en Km 1.5 Carr. Tecomán-Estación FFCC, 28110 Tecomán, Colima, con Tel. (55) 5905 1000 Ext. 52968.

Mantenimiento del vigor genético

Para mantener la diversidad genética de las colonias de parasitoides y dípteros, se deben introducir al final de cada año entre 300–400 adultos silvestres por colonia. Sin embargo, el reemplazo se puede hacer más frecuente si se observa que la productividad de la colonia se reduce. Las causas que indican la necesidad de un reemplazo, normalmente son una disminución de la media aritmética de algún parámetro de calidad (ver cuadro 3).

La renovación de los pies de cría de *D. melanogaster*, *D. sukuzii* y *T. drosophilae* se hace de manera simultánea. Para ello, se llevan a campo charolas R10 con 400 pupas de *D. sukuzii* asentadas en cinco trozos de plátano fresco, se dejan en cultivos de zarzamora durante 48 horas, y se trasladan al laboratorio para monitorear la emergencia de dípteros y parasitoides, y corroborar la identidad de cada especie.

Para la obtención y renovación del pie de cría de dípteros y parasitoides, se recomienda el uso del plátano como sitio de oviposición de *D. sukuzii* y *D. melanogaster* debido a que es comúnmente usado para atraer a drosófilos y sus parasitoides, además de ser barato y fácil de conseguir (Chabert *et al.*, 2012; Rossi-Stacconi *et al.*, 2015; Mazzetto *et al.*, 2016). *Trichopria drosophilae* es generalista y se puede coleccionar a partir de

alguna otra especie de Drosophilidae, no obstante se recomienda usar *D. suzukii* para su colecta y obtener parasitoides emergidos en este huésped, ya que se aumenta la probabilidad de que el parasitoide se reproducirá exitosamente en *D. suzukii* (Boycheva *et al.*, 2019).

PRÁCTICAS SANITARIAS UTILIZADAS EN LA REPRODUCCIÓN DE *T. drosophilae*

Las medidas sanitarias que se aplican en la cría de *T. drosophilae* reproducida sobre *D. suzukii* son prácticas generales de buena higiene, y en menor medida dos específicas. Las prácticas generales son recomendaciones aplicadas para cualquier laboratorio: un adecuado lavado de los materiales utilizados, uso de bata/cubre bocas, restricción de visitantes en el área de trabajo, y limpieza diaria de las instalaciones (descrita más adelante). Las dos prácticas específicas son el lavado del plátano fresco y la aspersion con alcohol etílico al 95% dentro de las charolas de producción. Este conjunto de prácticas generales y específicas han mantenido bajo control el problema de microorganismos patógenos como bacterias y hongos. Por ejemplo, ocasionalmente se presentan problemas de contaminación por hongos saprofitos (probablemente de los géneros *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp.) (foto 44), pero los años 2018, 2019 y 2020 estuvieron exentos de estas eventualidades, es decir, el sistema de reproducción de *T. drosophilae* en *D. suzukii* es un sistema relativamente estable y resistente al ataque de microorganismos patógenos.

En el pasado, se presentaron problemas de ácaros de los granos almacenados [no identificado (foto 45)] y de hormigas (no identificadas), pero estos se resolvieron lavando más frecuentemente las charolas de producción (actualmente, una vez por semana), y para el caso de hormigas se resolvió al cubrir las patas de los anaqueles con grasa (lubricante

automotriz) o vaselina, lugar por donde las hormigas subían a los cubos de producción.

Para la sanitización de la cría de *T. drosophilae* reproducida sobre *D. melanogaster*, se aplican las prácticas generales de buena higiene, previamente mencionadas, y varias específicas (cuadro 6). Los buenos resultados en la producción constante de *D. melanogaster* se basan en seguir al pie de la letra estas recomendaciones, por ejemplo, uso de bata y tapabocas, tiempo adecuado de cocción de la dieta, etiquetado general de materiales y utensilios. Aunque algunas veces se han presentado problemas de contaminación por microorganismos, presumiblemente levaduras (no identificadas) (foto 46), la cría de *T. drosophilae* en *D. melanogaster* se considera un sistema relativamente resistente al ataque de microorganismos patógenos (observación personal), por las siguientes razones: los problemas de contaminación son esporádicos, focalizados (afectan solo algunas charolas de producción) y su efecto es moderado, es decir las charolas afectadas no disminuyen su producción de pupas en más del 50%.

La desinfección de todas las instalaciones es simple; diariamente se debe limpiar y trapear el piso con una solución de 20 mL Pinol® en 6 L de agua.

INSTALACIONES Y EQUIPOS UTILIZADOS EN LA REPRODUCCIÓN DE *T. drosophilae*

Las instalaciones para llevar a cabo el proceso de producción de *T. drosophilae* consisten de cinco espacios (cuartos o salas de cría) de 4 x 4 x 4 m (cuadro 7), cuyas paredes y techo son de cemento: el primero mantiene la colonia del parasitoide reproducido en *D. melanogaster*, el segundo tiene la colonia del parasitoide reproducido en *D. suzukii*, el tercero aloja tanto la colonia de *D. suzukii* como los adultos de *D. melanogaster* (jaulas de oviposición); adicionalmente, se ocupa un

cuarto espacio, donde se desarrolla *D. melanogaster* de larva a pupa. Tanto la temperatura como la humedad ambiental, se regulan independientemente utilizando aparatos comerciales de amplia distribución, como lo son el aire acondicionado Alfa minisplit (Carrier® Interamerica Corporation, Miami, FL)] y deshumificador modelo DD45 (DeLonghi® México, D.F.), respectivamente.

La otra instalación (quinto espacio) que complementa el sistema de reproducción es un cuarto aislado de 4 x 4 x 4 m donde se prepara la dieta artificial, y que al mismo tiempo se utiliza como bodega para almacenar productos perecederos a 17 °C.

Los materiales y equipo utilizados en la reproducción de *T. drosophilae* en *D. suzukii* y *D. melanogaster* en Tecomán, Colima, México, se han descrito a lo largo del proceso de reproducción aquí detallado, pero para propósitos de este trabajo, en los cuadros 2, 7 y 8 se enlistan las instalaciones y equipo, así como los materiales aquí utilizados (i.e., consumidos) por mes.

OBSERVACIONES FINALES

A nivel mundial, la reproducción de *T. drosophilae* se realiza a pequeña escala sobre *D. suzukii* o *D. melanogaster*, y se utiliza una dieta artificial que contiene ingredientes de alto costo, como lo son el solidificante agar (44.44 USD/kg) y conservador metil parabeno (77.77 USD/kg). En contraste, en este manual se describen dos procedimientos para reproducir a *T. drosophilae* bajo el enfoque de cría masiva y de bajo costo, es decir, los procedimientos son simples, no se requieren instalaciones sofisticadas (solo se controla la temperatura y humedad relativa), y además, los sustratos utilizados son de bajo costo. Para la reproducción de *D. suzukii* se utiliza plátano fresco (0.5 USD/Kg), y para reproducir a *D. melanogaster* se utiliza una dieta artificial a base de

germen de trigo, la cual no contiene agar y utiliza harina de maíz (0.72 USD/kg) como solidificante y benzoato de sodio (2.22 USD/kg) como el conservador principal.

Como se indicó previamente, la reproducción de *T. drosophilae* en el CNRCB se lleva a cabo utilizando tanto a los huéspedes *D. suzukii* como *D. melanogaster*. Ambos sistemas se consideran exitosos porque se tienen altos volúmenes de producción, son relativamente estables al ataque de microorganismos patógenos y las evaluaciones en campo registran hasta un 50% de reducción de la plaga como consecuencia directa de las liberaciones de este parasitoide. Además, ambos sistemas tienen su ventaja única, por un lado la reproducción sobre *D. suzukii* produce parasitoides adultos de mayor tamaño, y por otro lado, la reproducción sobre *D. melanogaster* es prolífica. Y hoy en día, aun cuando se han realizado múltiples comparaciones biológicas a nivel mundial entre ambos tipos de huéspedes, no se ha determinado cuál de los dos huéspedes produce parasitoides con mayor capacidad para controlar las poblaciones silvestres de *D. suzukii*; por lo que, en este manual se presentan ambas formas, para que el usuario final decida cual se adecua más a sus recursos disponibles.

Para marzo 2021 (última actualización de este documento), *D. suzukii* se reporta en cinco estados de México: Baja California, Colima, Jalisco, Guanajuato y Michoacán, pero modelos matemáticos indican que su nicho potencial es todo el país. Dado este probable escenario de amplia distribución de *D. suzukii*, el uso del parasitoide *T. drosophilae* representa una excelente opción para reforzar los actuales métodos de prevención y control. Sin embargo, a nivel mundial no se han desarrollado métodos de producción masiva. En este sentido, a través de la publicación en línea y gratuita de este manual se espera fomentar el establecimiento de crías masivas de *T. drosophilae* en las zonas agrícolas afectadas por este díptero

invasor, y consecuentemente, se generalice el uso de *T. drosophilae* en un manejo integrado de *D. suzukii* en México.

Como adenda a este manual, a la fecha se han establecido cuatro laboratorios de cría masiva de *T. drosophilae* en México, ubicadas las dos primeras en Jalisco y las dos últimas en Baja California, respectivamente (<https://www.gob.mx/senasica/prensa/transfiere-agricultura-a-productores-tecnologia-sustentable-para-combatir-a-la-mosca-del-vinagre-268076>); lo que permitirá a estos grupos de productores autoabastecer sus predios y controlar la plaga utilizando tecnología sustentable y de bajo costo, desarrollada a través del CNRCB y descrita enteramente en este manual.

REFERENCIAS CITADAS

Amiresmaeili N., C. Jucker, S. Savoldelli, and D. Lupi. 2018. Understanding *Trichopria drosophilae* performance in laboratory conditions. Bulletin of Insectology.71: 251-256.

Asplen M. K., G. Anfora, A. Biondi, D. S. Choi, D. Chu, K. M. Daane, and R. Isaacs.

2015. Invasion biology of spotted wing drosophila (*Drosophila suzukii*): a global perspective and future priorities. *J. Pest Sci.* 88: 469-494.

Bai B., R. F. Luck, L. Forster, B. Stephens, and J. M. Janssen. 1992. The effect of host size on quality attributes of the egg parasitoid, *Trichogramma pretiosum*. *Entomologia experimentalis et applicata*, 64: 37-48.

Bautista-Martínez N. 2004. Cría de la mosca de la fruta *Anastrepha ludens* Loew (Diptera: Tephritidae), pp. 57-64. In: Cría de insectos plaga y organismos benéficos (Bautista- Martínez N., H. Bravo-Mojica, y C. Chavarin-Palacio, Eds.).- Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México, México.

Bernardi D., F. Andrezza, M. Botton, C. A. Baronio, and D. E. Nava. 2017. Susceptibility and interactions of *Drosophila suzukii* and *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae) in damaging strawberry. *Neotrop Entomol* 46: 1-7.

Boycheva W. S., J. Romeis, and J. Collatz. 2019. Influence of the rearing host on biological parameters of *Trichopria drosophilae*, a potential biological control agent of *Drosophila suzukii*. *Insects* 10: 183.

Carton Y., M. Bouletreau, J. J. M. van-Alphen, and J. C. van-Lenteren. 1986. The *Drosophila* parasitic wasps. In: Ashburner M., H. L. Carson, and J. N.

Thompson (Eds.). *The Genetics and Biology of Drosophila*. Academic Press Inc., London, pp. 348–394.

Chabert S., T. Allemand, M. Poyet, P. Eslin, and P. Gibert. 2012. Ability of European parasitoids (Hymenoptera) to control a new invasive Asiatic pest, *Drosophila suzukii*. *Biol. Control* 63: 40-47.

Chen J., S. Zhou, Y. Whan, M. Shi, X. Chen, and J. Huang. 2018. Biocontrol characteristics of the fruit fly pupal parasitoid *Trichopria drosophilae* (Hymenoptera: Diapriidae) emerging from different hosts. *Scientific reports* 8: 133-23.

Cuch-Arguimbau N., L. A. Escudero-Colomar, M. Forshage, y J. Pujade-Villar. 2013. Identificadas dos especies de Hymenoptera como probables parasitoides de *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931) en una plantación ecológica de cerezos en Begues (Barcelona, España). *Phytoma* 247: 42–47

Daane K. M., X.-G. Wang, A. Biondi, B. Miller, J. C. Miller, H. Riedl, P. W. Shearer, E. Guerrieri, M. Giorgini, M. Buffington, K. van Achterberg, Y. Song, T. kang, H. Yi, C. Jung, D. Woon Lee, B.-K. Chung, K. A. Hoelmer, and V. M. Walton. 2016. First exploration of parasitoids of *Drosophila suzukii* in South Korea as potential classical biological agents. *J Pest Sci.* DOI 10.1007/s10340-016-0740-0.

Gabarra, R., J. Riudavets, G. A. Rodríguez, J. Pujade-Villar, y J. Arnó. 2015. Prospects for the biological control of *Drosophila suzukii*. *BioControl* 60: 331-339.

García-Cancino M. D., A. González-Hernández, J. González-Cabrera, G. Moreno-Carrillo, J. A. Sánchez-González, y H. C. Arredondo-Bernal. 2015. Parasitoides de *Drosophila suzukii* (Matsumura) (Diptera: Drosophilidae) en Colima, México. *Southwest. Entomol.* 40: 855-858

García-Cancino M. D., J. González-Cabrera, J. A. Sánchez-González, and H. C. Arredondo-Bernal. 2020. Biological and population parameters, as well as oviposition preference, of two pupal parasitoids of *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) in Mexico. *Journal of Entomological Science*, 55: 87-97.

González-Cabrera J., G. Moreno-Carrillo, J. A. Sánchez-González, M. Y. Mendoza-Ceballos, and H. C. Arredondo-Bernal. 2019. Single and combined release of *Trichopria drosophilae* (Hymenoptera: Diapriidae) to control *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). *Neotropical entomology* 48: 949-956.

Haye T., P. Girod, A. G. S. Cuthbertson, X. G. Wang, K. M. Daane, et. al. 2016. Current SWD IPM tactics and their practical implementation in fruit crops across different regions around the world. *Journal of Pest Science* 89: 643-651.

Iglesias L. E., and O. E. Liburd. 2017. The effect of border sprays and between-row soil tillage on *Drosophila suzukii* in organic blackberry production. *Journal of Applied Entomology* 141: 19-27.

Kacar G., X. G. Wang, A. Biondi, and K. M. Daane. 2017. Linear functional response by two pupal *Drosophila* parasitoids foraging within single or multiple patch environments. *PLoS One* 12(8):e0183525. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183525>

Mazzetto F., E. Marchetti E, N. Amiresmaeili, D. Sacco, S. Francati, C. Jucker, M. L. Dindo, D. Lupi and L. Tavella L. 2016. *Drosophila* parasitoids in Northern Italy and their potential to attack the exotic pest *Drosophila suzukii*. *J. Pest Sci.* 89: 837-850.

Moreno-Carrillo G., B. Rodríguez-Vélez, J. A. Sánchez-González, y H. C. Arredondo-Bernal. 2015. Trampeo y registro del parasitoide *Pachycrepoideus vindemmiae* (Rondani) (Hymenoptera: Pteromalidae) sobre *Drosophila suzukii* (Matsumura) (Diptera: Drosophilidae) en México. *Southwest. Entomol.* 40: 99-203.

Perkins R. C. L. 1910. Supplement to Hymenoptera. Fauna Hawaiiensis. Cambridge at the Univertisy Press.

Rossi-Stacconi M. V., N. Amiresmaeili, A. Biondi, C. Carli, S. Caruso, M. L. Dindo, S. Francati, A. Gottardello, A. Grassi, D. Lupi, E. Marchetti, F. Mazzetto, N. Mori, T. Pantezzi, L. Tavella, G. T. Garzia, L. Tonina, G. Vaccari, G.

Anfora, and C. Ioriatti. 2018a. Host location and dispersal ability of the cosmopolitan parasitoid *Trichopria drosophilae* released to control the invasive spotted wing *Drosophila*. *Biol. Control* 117:188-196.

Rossi-Stacconi M. V., A. Grassi, C. Ioriatti, G. Anfora. 2018b. Augmentative releases of *Trichopria drosophilae* for the suppression of early season *Drosophila suzukii* populations. *Biol. Control* 64: 9-19.

Rossi-Stacconi M. V., M. Buffington, K. M. Daane, D. T. Dalton, A. Grassi, G. Kacar, B. Miller, J. C. Miller, N. Baser, C. Ioriatti, V. M. Walton, N. G. Wiman, X. Wang, and G. Anfora. 2015. Host stage preference, efficacy and fecundity of parasitoids attacking *Drosophila suzukii* in newly invaded areas. *Biol. Control* 84: 28–35.

Rossi-Stacconi M.V.R., A. Panel, N. Baser, C. Ioriatti, T. Pantezzi and G. Anfora. 2017. Comparative life history traits of indigenous Italian parasitoids of *Drosophila suzukii* and their effectiveness at different temperatures. *Biol. Control* 112: 20–27.

SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2019. Atlas agroalimentario.

https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2019/Atlas-Agroalimentario-2018. Consultado 04 de febrero del 2020.

Slansky F. 1982. Insect nutrition: an adaptationist's perspective. *The Florida Entomologist*, 65: 45-71.

Rossi-Stacconi M. V., A. Panel, N. Baser, C. Ioriatti, T. Pantezzi y G. Anfora. 2017. Comparative life history traits of indigenous Italian parasitoids of *Drosophila suzukii* and their effectiveness at different temperatures. *Biol. Control* 112: 20-27.

Trottin Y., E. Paulhiac, A. Zicot, V. Baffert V, J. Leyre, C. Weydert, M. Poyet, N. Ris, and P. Gibert. 2014. Experimental studies on *Drosophila suzukii* in protected strawberry crops: biology of the pest and effectiveness of a parasitoid of pupal in field conditions. In: Proceeding of the IOBC VIII Workshop on Integrated Soft Fruit Production. Trento, pp. 26-28.

Vieira J. G. A., A. P. Krüger, T. Scheuneumann, M. C. Morais, H. J. Speriogin, F. R. M. Garcia, et. al., and D. Bernardi. 2019. Some aspects of the biology of *Trichopria anastrephae* (Hymenoptera: Diapriidae), a resident parasitoid attacking *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) in Brazil. *Journal of Economic Entomology*. <https://doi.org/10.1093/jee/toz270>.

Vlach, J. 2010. Identifying *Drosophila suzukii*. Oregon department of Agriculture. Salem, Oregon, USA.

Wang X-G., G. Kaçar, A. Biondi, and K. M. Daane. 2016. Life-history and host preference of *Trichopria drosophilae*, a pupal parasitoid of spotted wing drosophila. *Biocontrol* 61:387–397.

Wang X. G., M. A. Serrato, Y. Son, V. M. Walton, B. N. Hogg, and K. M. Daane. 2018. Thermal performance of two indigenous pupal parasitoids attacking the invasive *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). *Environ. Entomol.* 47: 764-772.

Wharton, B. 2007. Diapriidae: the Wharton Lab. En línea: http://mx.speciesfile.org/projects/8/public/public_content/show/13166?content_template_id=88. Consultado 2 de julio del 2015.

Yuzuki, K., and R. Tidon. 2020. Identification key for drosophilid species (Diptera, Drosophilidae) exotic to the Neotropical Region and occurring in Brazil. *Rev. Bras. Entomol.* 64: 1-9.

Versión sin diseño gráfico

ANEXOS

Cuadros

Cuadro 1. Calendario semanal de actividades en la reproducción de *Trichopria drosophilae* en *Drosophila suzukii* y *D. melanogaster* en Tecomán, Colima, México.

Días	Actividades Área de dípteros	Actividades Área de parasitoides
Lunes	<ol style="list-style-type: none"> 1. Obtención de plátano 2. Lavado y desinfección del plátano (jabón y cloro) 3. Cortar trozos de plátano de 5 cm para colocarlos dentro del cubo 4. Colocar 5 trozos de plátano dentro de una charola de plástico con periódico 5. Etiquetar cada charola de plástico (la fecha en que fue retirado el plátano) 	<ol style="list-style-type: none"> 6. Aspirar parasitoides con ayuda de una bomba de vacío 7. Colectar 100 parasitoides por vial 8. Alimentación de los parasitoides (miel y polen) 9. Selección de material en el área de dípteros (pupas) ideales para parasitar 10. Retirar el material de pupas parasitadas cada 48 Hrs 11. Colocar 20 parasitoides en pupas

Martes	<ol style="list-style-type: none"> 1. Recortar papel periódico y colocación en charolas de plástico (longitud y ancho de las tiras) 2. Lavado de material utilizado en cría de dípteros con mezcla de agua, jabón y cloro. 3. Perforación de tapas de plástico 4. Lavado de charolas de plástico y tapas 5. Elaboración de cubos para la cría de moscas 6. Recortar Parafilm para sellar las charolas de plástico , (longitud y ancho de las tiras) 	<ol style="list-style-type: none"> 7. Recortar papel encerado para alimentación de los parasitoides, (longitud y ancho de las tiras) 8. Preparar alimento para los parasitoides (miel con polen) 9. Lavado de material (viales) 10. Limpieza de material con alcohol, concentración de agua y OH 11. Perforación de tapas para el uso de los parasitoides 12. Alimentación dentro de los cubos de cría de <i>Trichopria drosophilae</i>
Miércoles	<ol style="list-style-type: none"> 13. Obtención de plátano 14. Lavado y desinfección del plátano (jabón y cloro) 15. Cortar trozos de plátano de 5 cm para colocarlos dentro del cubo 16. Colocar 5 trozos de plátano dentro de una charola de plástico con periódico 17. Etiquetar cada charola de plástico (la fecha 	<ol style="list-style-type: none"> 18. Aspirar parasitoides con ayuda de una bomba de vacío 19. Colectar 100 parasitoides por vial 20. Alimentación de los parasitoides (miel y polen) 21. Selección de material en el área de dípteros (pupas) ideales para parasitar 22. Retirar el material de pupas parasitadas cada 48 horas

	en que fue retirado el plátano)	23. Colocar 20 parasitoides en pupas
Jueves	<p>24. Recortar papel periódico y colocación en charolas de plástico</p> <p>25. Lavado de material utilizado en cría de dípteros</p> <p>26. Perforación de tapas de plástico</p> <p>27. Lavado de charolas de plástico y tapas</p> <p>28. Elaboración de cubos para la cría de moscas</p> <p>29. Recortar Parafilm para sellar las charolas de plástico</p>	<p>30. Recortar papel encerado para alimentación de los parasitoides</p> <p>31. Preparar alimento para los parasitoides (miel con polen)</p> <p>32. Lavado de material (viales)</p> <p>33. Limpieza de material con alcohol</p> <p>34. Perforación de tapas para el uso de los parasitoides</p> <p>35. Alimentación dentro de los cubos de cría de <i>Trichopria drosophilae</i></p>
Viernes	<p>36. Obtención de plátano</p> <p>37. Lavado y desinfección del plátano (jabón y cloro)</p> <p>38. Cortar trozos de plátano de 5 cm para colocarlos dentro del cubo</p> <p>39. Colocar 5 trozos de plátano dentro de una charola de plástico con periódico</p>	<p>41. Aspirar parasitoides con ayuda de una bomba de vacío</p> <p>42. Colectar 100 parasitoides por vial</p> <p>43. Alimentación de los parasitoides (miel y polen)</p> <p>44. Selección de material en el área de dípteros (pupas) ideales para parasitar</p>

	40. Etiquetar cada charola de plástico (la fecha en que fue retirado el plátano)	45. Retirar el material de pupas parasitadas cada 48 horas 46. Colocar 20 parasitoides en pupas
--	--	--

Versión sin diseño gráfico

Cuadro 2. Ingredientes de la dieta artificial para la reproducción de *Trichopria drosophilae* en *D. melanogaster* en Tecomán, Colima, México.

Ingredientes	Cantidad por unidad (receta publicada)	Cantidad por lote (= 4 unidades) de producción	Cantidad utilizada por mes	Proveedor
Ácido clorhídrico	(1.67 ml, 1 M)	(6.68 ml, 1 M)	100.2 ml	(Sigma-Aldrich. CAS: 7647-01-0, H1758)
Agua purificada (de garrafón)	(480 ml)	(1920 ml)	23.04 L	(Pirámide Express, Colima, México)
Alcohol etílico (95%)	(12 ml)	(48 ml)	5.76 L	(Comercializadora Jiquilpan, Jalisco, México)
Azúcar blanca de mesa	(45 g)	(180 g)	2.16 kg	(Aurrera/WalMart de México, Colima, México)
Benzoato de sodio	(8 g)	(32 g)	384 g	(El Harinero, Colima, México)
Propionato de sodio	(0.35 g)	(1.4 g)	16.8 g	(El Harinero, Colima, México)
Germen de trigo crudo	(100 g)	(400 g)	4.8 kg	(Natural México, Jalisco, México)
Harina de maíz	(36 g)	(144 g)	1.72 kg	(MASECA®, GRUMA, DF, México)
Levadura de cerveza	(42 g)	(168 g)	2.01 kg	(Natural México, Jalisco, México)
Sirve para preparar:	8 cajas Petri	22 charolas R10		

Cuadro 3. Parámetros para el control de calidad en condiciones de laboratorio del parasitoide *Trichopria drosophilae* en Tecomán, Colima, México.

Parámetros:	<i>T. drosophilae</i> sobre <i>D. suzukii</i>	<i>T. drosophilae</i> sobre <i>D. melanogaster</i>
Volumen por unidad de producción (adultos)		
Fecundidad	(≥ 100 huevos)	(≥ 80 huevos)
Longevidad	(≥ 25 días de edad)	(≥ 20 días de edad)
Tamaño	(≥ 0.73 - ≤ 0.94 mm)	(≥ 0.65 - ≤ 0.85 mm)
Proporción sexual	(≥ 0.5 hembras/progenie)	(≥ 0.5 hembras/progenie)
Anormalidades (deformes)	(≤ 5.0)	(≤ 5.0)
Porcentaje de parasitación	(≥ 0.6)	(≥ 0.6)

Porcentaje de emergencia parasitoides	de de	(≥ 0.8)	(≥ 0.8)
Hospedero/huésped:			
Realizó:			
Fecha:			

¹Frecuencia de la toma de datos: mensual.

²Las evaluaciones se deben de realizar bajo las mismas condiciones ambientales en las cuales se reproducen los adultos del díptero y parasitoide.

Cuadro 4. Parámetros para el control de calidad durante el envío a campo del parasitoide *Trichopria drosophila* en Tecomán, Colima, México.

	<u>Material no enviado</u>	<u>Material enviado</u>
Mortalidad		
Longevidad ¹		
Huésped:		
Realizó:		
Fecha:		

¹La temperatura y húmeda relativa, así como las condiciones de evaluación, deben de ser las mismas durante la ejecución de estas pruebas.

Cuadro 5. Parámetros para el control de calidad en campo del parasitoide *Trichopria drosophila* en Tecomán, Colima, México.

	<u>Área sin liberaciones</u>	<u>Área con liberaciones</u>

Densidad poblacional de <i>D. suzukii</i>		
Densidad poblacional de <i>T. drosophilae</i>		
Realizó:		
Fecha:		

¹Frecuencia de la toma de datos: una vez cada seis meses.

Cuadro 6. Lineamientos generales para evitar problemas de contaminación microbiana en la preparación de la dieta artificial.

Preparar la dieta recién iniciando la jornada laboral.

Hervir la dieta durante siete minutos. Si se hierve minutos más o menos a lo aquí recomendado, la dieta es más susceptible a contaminarse.

Hervir la dieta a fuego lento. Si se hierve a fuego intenso, la dieta es más susceptible a contaminarse.

Transportar la dieta en contenedores sellados hacia el área de producción de dípteros.

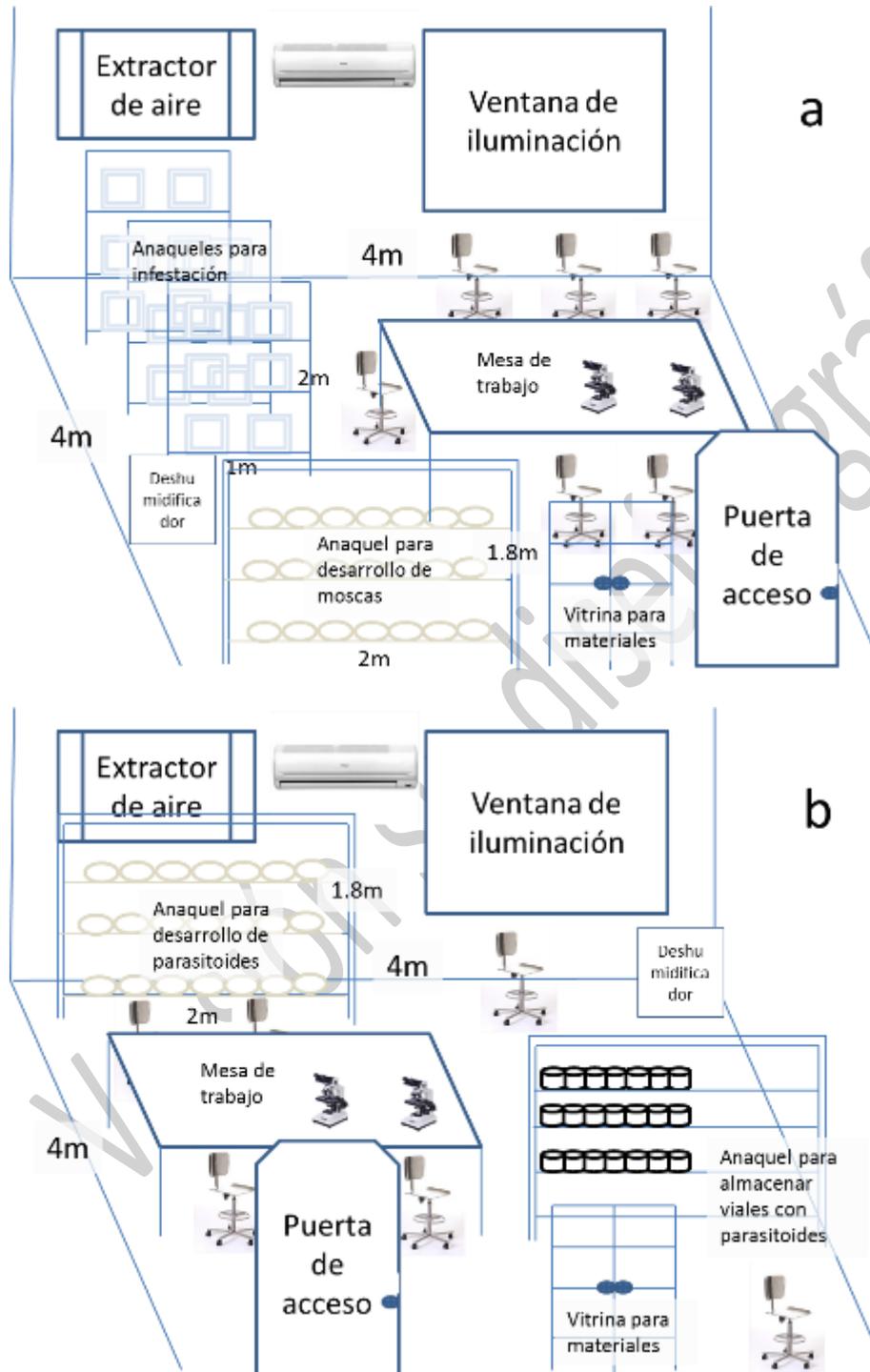
El agua purificada utilizada en las diferentes actividades, no debe de tener más de una semana de haberse abierto.

Etiquetar todos los materiales y utensilios usados en la dieta con fecha de compra, lavado o preparación, tal y como sea necesario.

Lavar con cloro + agua (30 ml en 5 L, respectivamente) todos los utensilios utilizados, por ejemplo, pipetas dispensadoras.

Versión sin diseño gráfico

Cuadro 7. Esquema de la infraestructura para la reproducción masiva de *Trichopria drosophilae* en el CNRCB, en Tecomán, Colima, México. a) sala de cría de moscas hospederas, b) sala de cría del parasitoide.



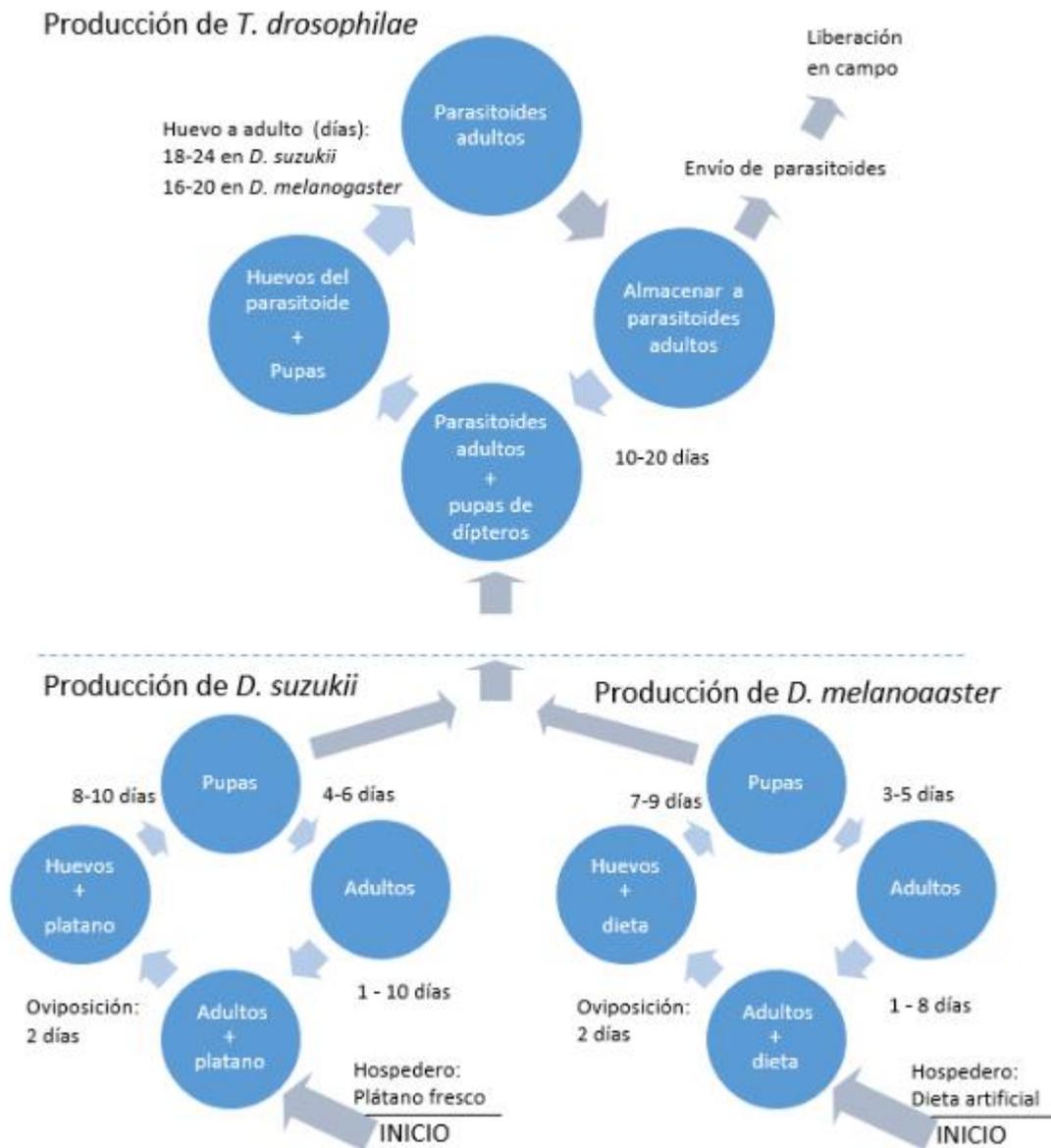
Cuadro 8. Equipos y materiales necesarios para la instalación de una reproducción masiva de *Trichopria drosophilae*, similar a la implementada en Tecomán, Colima, México.

Material	Unidades	Función
1.-Salas	2 (medidas de 3 x 3 metros)	Deberán contar con un ambiente controlado (humedad y temperatura), así como deben de contar con ventanales amplios para la libre entrada de luz natural
2.- Equipo mini Split	4	Para obtener la temperatura optima de reproducción de <i>T. drosophilae</i> y el hospedero a utilizar (dos funcionando y dos de reserva por si alguno falla).
3.- Deshumificador	4	Para obtener la humedad relativa optima de reproducción de <i>T. drosophilae</i> y el hospedero a utilizar (dos funcionando y dos de reserva por si alguno falla).
4.-Anaqueles (2 m de alto x 1.5 m de ancho)	6	Utilizados para el desarrollo y maduración tanto de la plaga como del parasitoide
5.- Cubos (40 cm x lado) cubiertos de tela de organza	14	Contiene para la infestación del hospedero, de 200 a 400 individuos para el caso de <i>D. suzukii</i> y 2000 individuos para el caso de <i>D. melanogaster</i>
6.- Charolas tipo R10	16 cajas (100 unidades/caja)	Utilizadas para la maduración de pupa y para la parasitación. Se utilizan dos cajas durante un periodo de 45 días, y después de eso, se desechan por el desgaste. El material solicitado es para el uso de un año
7.- Cubos (70 x 70 x 70) cubiertos de tela de organza	2	Estos son utilizados para el aspirado del parasitoide

8.- Bomba de vacío	3	Debe contar con las siguientes características: lubrica de 72 L/min vacío Max. 500 mm/Hg motor ¼ HP. Esta se utiliza para aspirar el parasitoide. Se solicitan, ya que se requiere una para cada cubo y tener otra de reserva por si falla alguna)
9.- Plátano	60 kg (semana)	Utilizado como hospedero para la obtención de pupa de <i>D. suzukii</i>
10.- Periódico usado	4 pacas de tamaños medios	Se utiliza en tiras de 60 cm de largo x 5 cm de ancho para la pupación y reposo de la plaga. (estas pacas duran para todo el año)
11.- Guillotina o Tijeras	2	Utilizada para cortar las tiras de periódico.
12.- Dieta artificial	Cuadro 7 (anexado)	Los ingredientes utilizados para la elaboración de la dieta son los siguientes: germen de trigo, levadura de cerveza, harina de maíz, azúcar, benzoato de sodio, propionato de sodio, agua, alcohol y ácido clorhídrico
13.- Datalogger (Onset HOBO®)	1	Para registrar las condiciones de temperatura y humedad relativa promedio internas
14. (opcional) Equipo de laboratorio	1	Equipo básico de laboratorio: microscopio estereoscópico, balanza analítica, material entomológico básico (pinzas y agujas de disección, alfileres entomológicos, material para el montaje, porta y cubre objetos, etc.), probetas y pipetas, y jaulas experimentales de cría de insectos

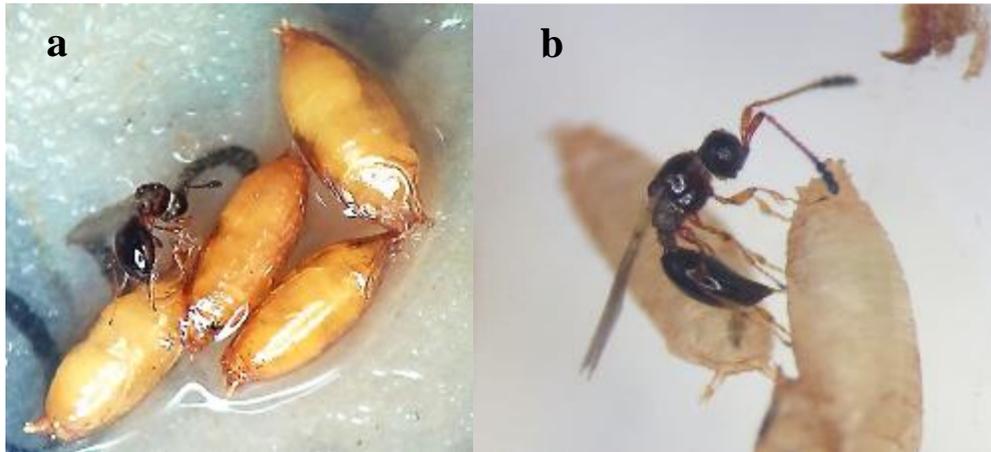
Figuras

Figura 1. Diagrama de flujo de la reproducción de *Trichopria drosophilae* en *Drosophila suzukii* y *D. melanogaster* en Tecomán, Colima, México.

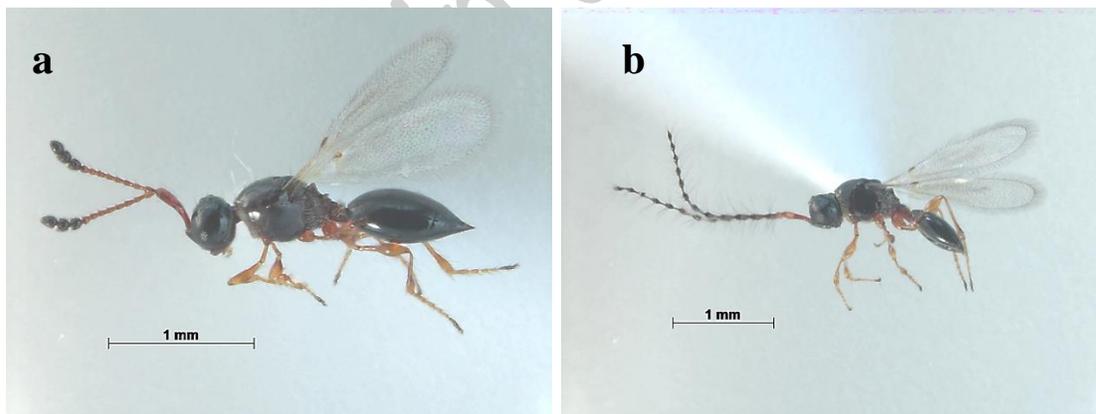


Fotos

1. *Trichopria drosophilae* parasitando pupas de (a) *Drosophila suzukii* y (b) *D. melanogaster*.



2. Vista lateral de (a) hembra y (b) macho del parasitoide *Trichopria drosophilae* (Perkins) (Hymenoptera Diapriidae).



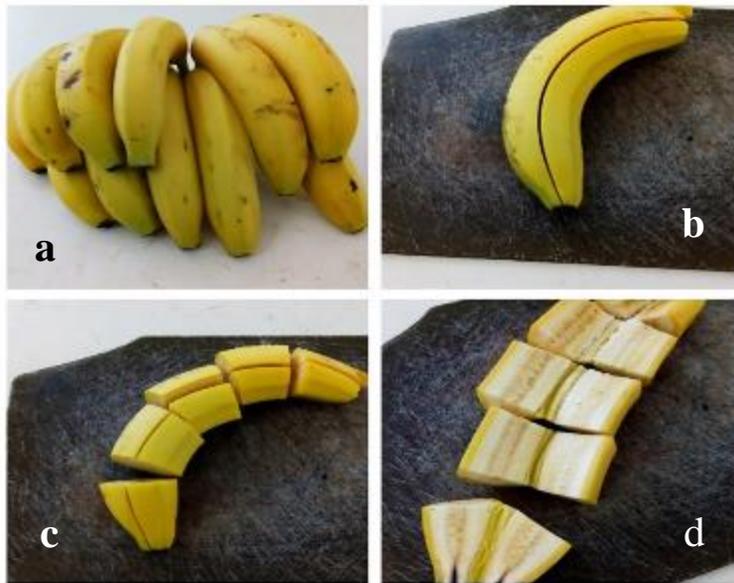
3. Fachada principal del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB), en Tecomán, Colima, México.



4. Plátano fresco utilizado como sustrato de oviposición de *Drosophila suzukii*, en Tecomán, Colima, México: (a) inmaduro, (b) maduro (calidad óptima) y (c) muy maduro.



5. Preparación del plátano fresco previo a su utilización como sustrato de oviposición: (a) plátano desinfectado y seco, (b) corte longitudinal, (c) corte transversal, y (d) trozos listos para infestación.



6. Dípteros adultos ovipositando en plátano fresco dentro de un cubo de reproducción de *Drosophila suzukii*.



7. Charolas de producción de *Drosophila suzukii* con trozos de plátano fresco: (a) abiertas y (b) cerradas.



8. Charolas de producción de *Drosophila suzukii* con tiras de papel periódico para absorber la humedad que exudan los trozos de plátano fresco.



9. Remoción del líquido en las charolas de producción de *Drosophila suzukii*, la cual proviene de exudados del plátano fresco.



10. Charolas de producción de pupas de *Drosophila suzukii*: (a) vista general e (b) individual.



11. Parasitación de pupas de *Drosophila suzukii*.



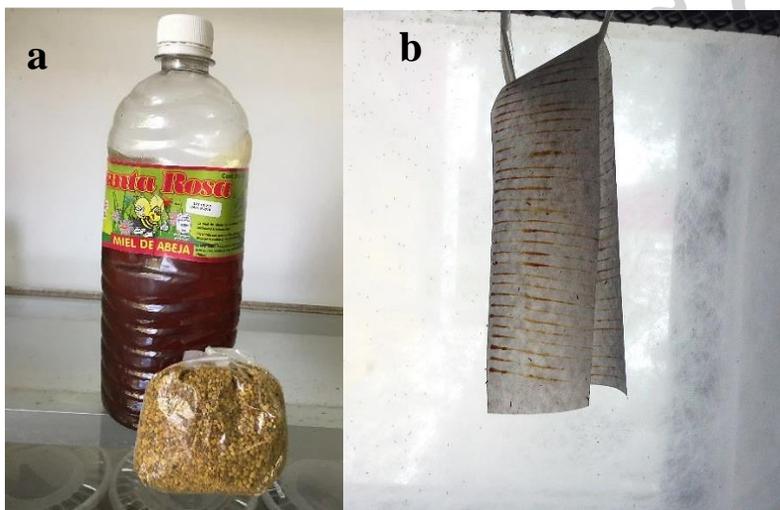
12. Anaquel con charolas de *Trichopria drosophilae* reproducida en *Drosophila suzukii*, en las cuales se desarrolla de huevo a adulto el parasitoide.



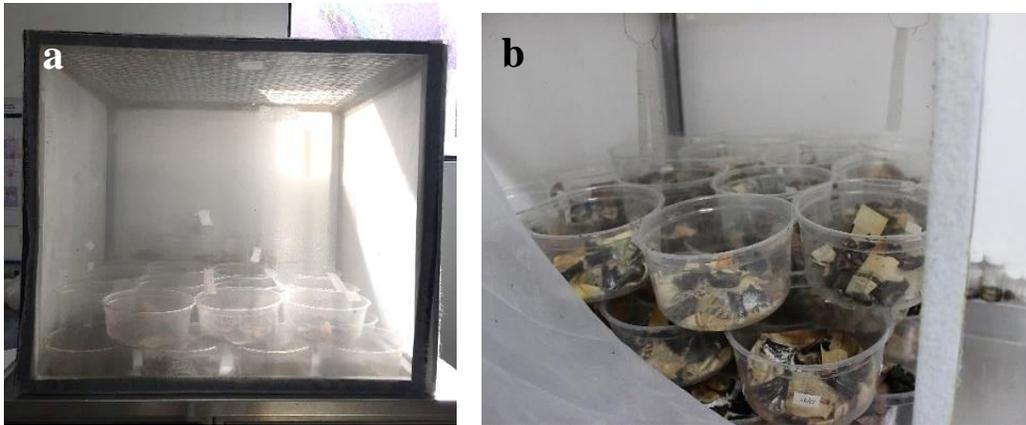
13. (a) Charolas de producción de *Trichopria drosophilae* con parasitoides recién emergidos, y (b) vista individual de la emergencia de un parasitoide.



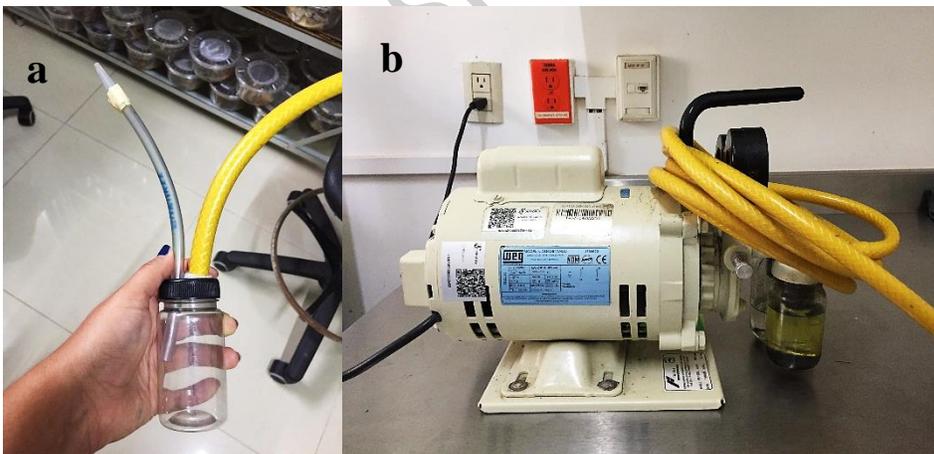
14. Miel y polen para alimentar a los adultos de *Trichopria drosophilae* en los cubos de emergencia: (a) antes y (b) después de la mezcla de ambos ingredientes.



15. Cubo de emergencia de adultos de *Trichopria drosophilae*. (A) vista general y (B) con acercamiento.



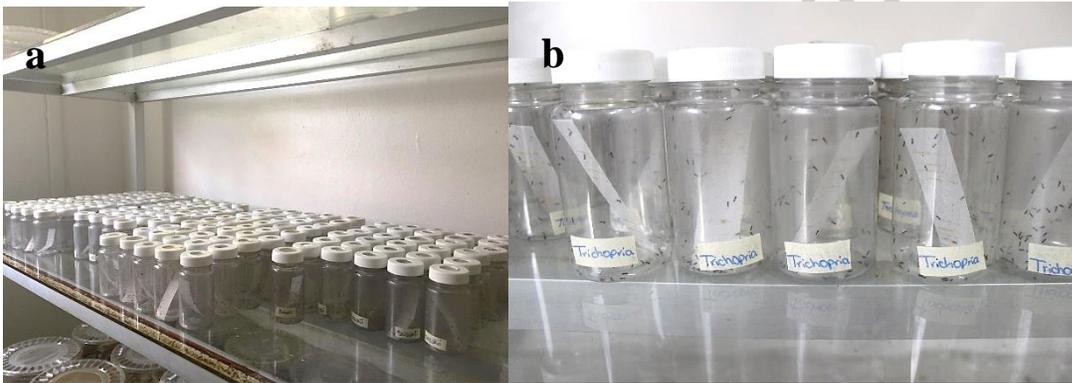
16. (a) Aspirador conectado a una (b) bomba de vacío, los cuales son utilizados para coleccionar adultos de *Trichopria drosophila*.



17. Viales de plástico transparente con adultos de *Trichopria drosophila*.



18. Anaquel para almacenar viales con adultos de *Trichoptera drosophilae*:
(a) vista general y (b) con acercamiento.



19. Adultos de *Drosophila suzukii* emergidos en las charolas de producción de *Trichoptera drosophilae*.



20. Principales ingredientes de la dieta artificial para reproducir a *Drosophila melanogaster*: (a) germen de trigo crudo, (b) levadura de cerveza, (c) harina de maíz, (d) benzoato de sodio, (e) azúcar de mesa, (f) alcohol etílico y (g) ácido clorhídrico.



21. Preparación de la dieta artificial de *Drosophila melanogaster*: (a) pesar ingredientes secos, (b) agregar agua, (c) hervir mezcla durante siete minutos, (d) agregar HLC y alcohol, (e) mezclar todo por 30 segundos, y (f) dieta húmeda lista para usarse como sustrato de oviposición.



22. Cubos de reproducción de *Drosophila melanogaster*: vista (a) general e (b) interna



23. Desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster*: (a) charolas de producción con huevos, (b) asperjado de agua en dieta, (c) larvas y (d, e y f) pupas.



24. (a) Lavado en agua de pupas de *Drosophila melanogaster*, y (b) su posterior compilación.



25. Parasitación de pupas de *Drosophila melanogaster*: (a) vista general de las charolas R10 y (b) con acercamiento.



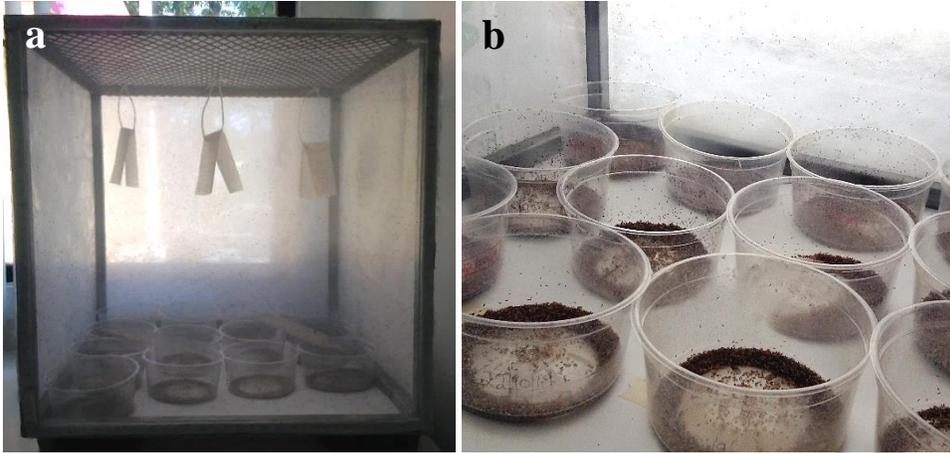
26. Anaquel con charolas de *Trichopria drosophilae* reproducida en *D. melanogaster*, en las cuales se desarrolla de huevo a adulto el parasitoide.



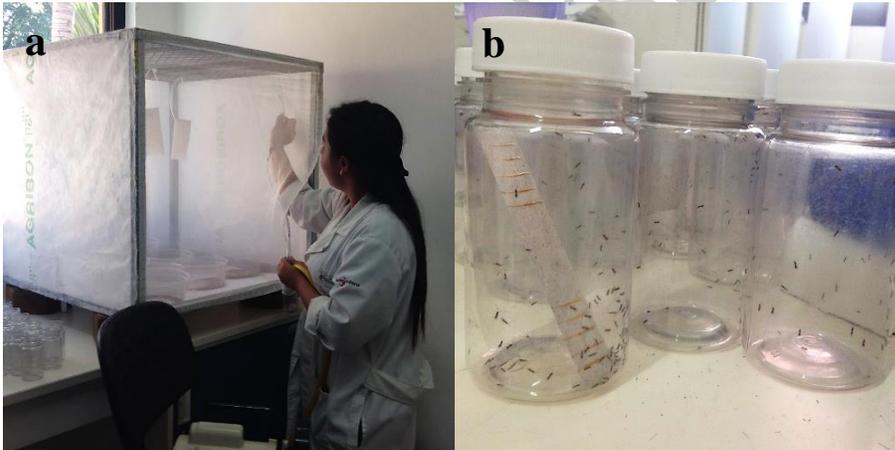
27. Charolas de *Trichopria drosophilae* reproducida en *Drosophila melanogaster*, en las cuales están emergiendo los parasitoides adultos.



28. Cubo de emergencia de *Trichopria drosophilae* reproducida en *Drosophila melanogaster*: vista (a) externa e (b) interna.



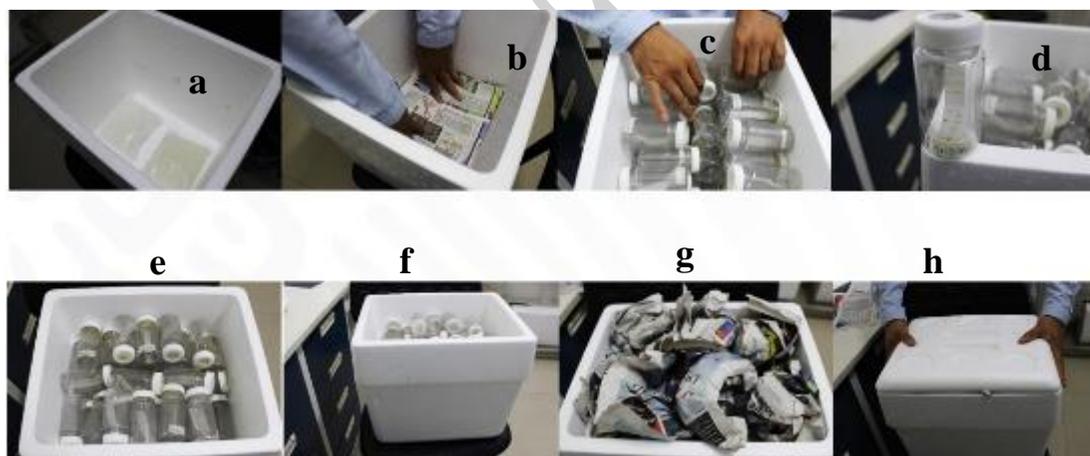
29. (a) Aspirado y (b) colecta en viales, de adultos de *Trichopria drosophilae* reproducida en *Drosophila melanogaster*.



30. Tiras de papel encerado con líneas delgadas de miel más polen, las cuales se utilizan como alimento de 100 adultos de *Trichopria drosophila*.



31. Preparación de hieleras para el envío de adultos de *Trichopria drosophila*, a través de paquetería comercial: (a) colocación de geles dentro de la hilera, (b) colocación del periódico, (c- f) colocación de los viales con 100 parasitoides adultos, (g) relleno de periódico y (h) cerrado de la hielera.



32. Liberación de *Trichopria drosophilae* en campo.



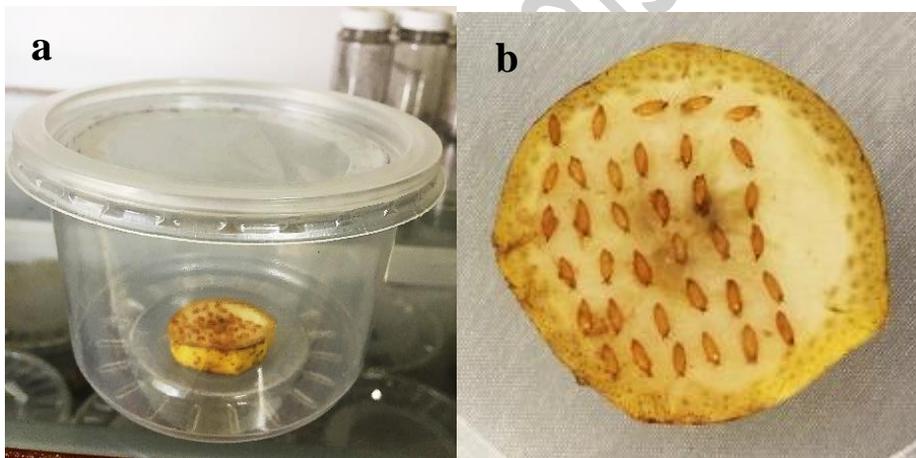
33. Sitio de liberación de *Trichopria drosophilae*: (a) vista general e (b) información geográfica generada por el GPS.



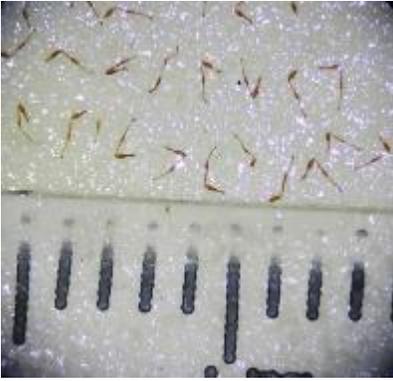
34. Adultos de *Trichopria drosophilae* en charolas R10: (a) vista general y (b) con acercamiento.



35. Pupas para medir la oviposición de *Trichopria drosophilae*: (a) vista general y (b) con acercamiento.



36. Medicion de la longitud de las patas traseras de hembras de *Trichopria drosophilae*, utilizando el ocular-40X de un microscopio de contraste de fases.



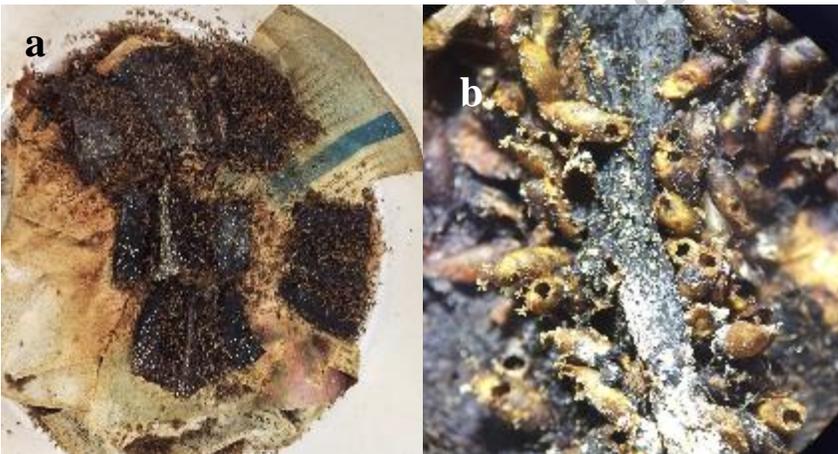
37. Medición de la proporción sexual de la progenie del parasitoide *Trichopria drosophilaae*, utilizando un microscopio estereoscópico: (a) machos y (b) hembras por charola R10.



38. Medición de anomalías morfológicas (deformes) de la progenie del parasitoide *Trichopria drosophilaae*, utilizando un microscopio estereoscópico.



39. (a) Pupas parasitadas por *Trichopria drosophilae*: (a) vista general y (b) agujeros de emergencia del parasitoide.



40. Trampas de vinagre para medir la densidad poblacional de *Drosophila suzukii* en las áreas experimentales.



41. Trampas centinelas para medir la densidad poblacional del parasitoide *Trichopria drosophila* en las áreas experimentales: (a) antes y (b) después de ser colocada en campo.



42. Pupas de *Drosophila suzukii* a diferentes días de edad.



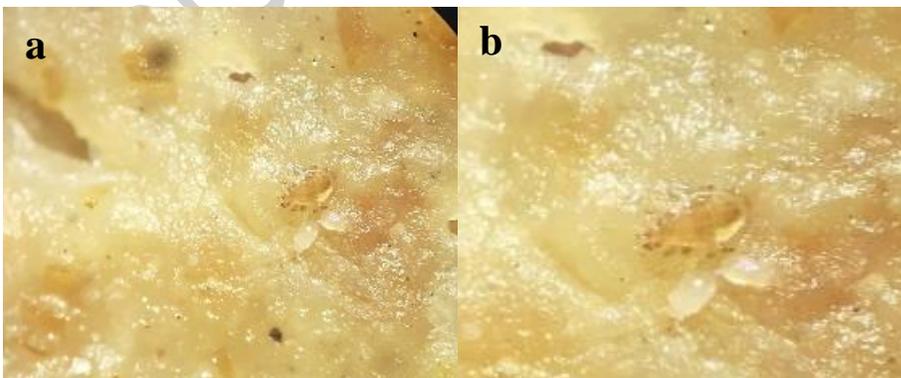
43. Revisión bajo microscopio estereoscópico de las trampas centinelas, utilizadas para medir la densidad poblacional del parasitoide *Trichopria drosophilae* en las áreas experimentales.



44. *Trichopria drosophilae* reproducida en *Drosophila suzukii*: sin (a) y con (b) contaminación por hongos (no identificado).



45. Ácaro contaminante en la reproducción de *Trichopria drosophilae*: (a) vista general y (b) con acercamiento (i.e., zoom) del patógeno (no identificado).



47. *Trichopria drosophilae* reproducida en *Drosophila melanogaster*: sin (a) y con (b) contaminación microbiana (no identificada).



Versión sin diseño gráfico