

FICHA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO DE:

Drosophila suzukii (Matsumura, 1931)



SENASICA, SALUD PARA LAS PLANTAS Y ANIMALES

"ESTE PROGRAMA ES PÚBLICO, AJENO A CUALQUIER PARTIDO POLÍTICO. QUEDA PROHIBIDO EL USO PARA FINES DISTINTOS A LOS ESTABLECIDOS EN EL PROGRAMA"



**GOBIERNO DE
MÉXICO**

AGRICULTURA
SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL



SENASICA
SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD,
INOCUIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA

© Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), [2021]

Impreso por SENASICA

Todos los derechos reservados.

Imagen de portada: Adulto (macho y hembra) de *D. sukii*, CNRF-Laboratorio de Entomología y Acarología.

ÍNDICE

Pág.

INTRODUCCIÓN	1
Información sobre la plaga	1
Información taxonómica	1
DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN	2
Detección y captura	2
IDENTIFICACIÓN MORFO-TAXONÓMICA	2
Descripción morfológica	2
Identificación de la plaga	4
Procesamiento de adultos (macho) (extracción de genital)	5
Método de montaje del genital (macho)	6
Procesamiento de larvas de Drosophilidae	6
DIAGNÓSTICO MOLECULAR	7
Extracción de DNA por el Método del CTAB 2 % (Doyle y Doyle, 1990)	7
Procedimiento:	7
Verificación de la calidad del DNA	8
Ensayo de PCR con iniciadores generales	8
Controles para las pruebas moleculares	9
Interpretación de resultados para los ensayos de PCR	9

Pág.

Identificación de la plaga	9
Consideraciones	10
Preservación	10
REGISTROS	10
REFERENCIAS	12
ANEXOS	15
AVISO	21

INTRODUCCIÓN

Información sobre la plaga

La mosca del vinagre de alas manchadas *Drosophila suzukii* puede atacar los frutos de un amplio rango de hospederos tanto cultivadas como silvestres. Entre los frutos más destacados se reportan: higo, mora, arándano, persimon, kiwi, cereza, frambuesa, zarzamora, fresa, manzana, durazno, ciruela, uva, pera, chabacano y sauco (Flores y Linding-Cisneros, 2005; FAO, 2006; Bolda, 2009; DGSV, 2011; Rubí-Arriaga *et al.*, 2014; CABI, 2018).

Los daños son ocasionados principalmente por la alimentación de las larvas, observándose frutos que presentan zonas suaves y colapsadas (**Figura 1a-c**), y dan oportunidad a que otras especies saprófitas, como diferentes especies de moscas del vinagre, hongos y bacterias provoquen pudriciones, afectando la calidad y comercialización de la fruta (Walsh *et al.*, 2011; Calabria *et al.*, 2010). Las características que la hacen particularmente una plaga peligrosa es que tiene preferencia a frutos maduros y su ovipositor aserrado causa daños físicos a los mismos (Sasaki y Sato, 1995, 1996; Douglas *et al.*, 2011).

Información taxonómica

Nombre:	<i>Drosophila suzukii</i> (Matsumura, 1931)
Sinónimos:	<i>Leucophenga suzukii</i> Matsumura, 1931 <i>Drosophila suzukii</i> Kamisawa, 1934
Nombres comunes:	Mosca del vinagre de alas manchadas (español) Mosca del vinagre de las cerezas (español) Spotted-wing drosophila (inglés) Cherry vinegar fly (inglés) Cherry fruit fly (inglés) Cherry drosophila (inglés)
Posición taxonómica:	Reino: Animalia, Filo: Arthropoda, Clase: Insecta, Orden: Diptera, Familia: Drosophilidae, Género: <i>Drosophila</i> , Especie: <i>D. suzukii</i>

(CABI, 2018)

(Markow y O'Grandy, 2006)

DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

Detección y captura

Los métodos más comunes para la captura y detección de *D. suzukii* en campo, se basan en la colocación de recipientes de plástico transparente con vinagre de manzana (aproximadamente 200 ml o hasta alcanzar la marca de 2.5 a 4 cm de altura del contenedor), y trampa pegajosa amarilla. El tamaño del recipiente deberá tener la capacidad de al menos 1 L, con las perforaciones en los costados. El sitio se debe elegir en un área con la finalidad de facilitar la entrada del insecto y la altura de colocación dependerá de la altura de fructificación de los hospedantes (DGSV, 2014; DGSV-CNRF, 2015).

Los especímenes detectados (huevos, larvas, pupas y adultos) deberán ser preservados en alcohol etílico al 70 % y debidamente etiquetados (**Figura 2**).

Las metodologías de detección e identificación morfológicas y morfométricas descritas en el presente documento de diagnóstico están basadas en las claves de Hsu (1949), Markow y O'Grandy (2006), Miller *et al.* (2017).

Para el diagnóstico molecular, se puede realizar la extracción de DNA por el Método del CTAB (Doyle y Doyle, 1990). La identificación de la especie *D. suzukii* a partir de estados inmaduros como huevo, larva y pupa se debe realizar por medio de técnicas moleculares, ya que las características morfológicas externas son muy parecidas entre especies y no permite una completa diferenciación morfo-taxonómica (Dhami y Kummarasinghe, 2014, Escudero-Colmenar, 2014).

IDENTIFICACIÓN MORFO-TAXONÓMICA

Descripción morfológica

Huevo: recién depositados son traslucidos y posteriormente se van tornando de color blanco (**Figura 3**). Son de forma oval y su tamaño varía entre 0.6 a 0.7 mm de longitud y 0.2 mm de ancho, presentan el extremo posterior redondeado y el anterior en forma de punta, con dos filamentos de 0.4 a 0.6 mm de longitud, los cuales corresponden a los tubos respiratorios por donde se lleva a cabo el intercambio gaseoso (Walsh *et al.*, 2011; Rojas *et al.* 2019).

Larva: la característica distintiva es la presencia de **sifúnculos o tubos respiratorios en la parte posterior**, los cuales se encuentran **fuertemente esclerosados** (**Figura 4**), **lóbulos**

anales poco conspicuos. La larva es apoda, de color blanco, posee además el cuerpo alargado y de forma cilíndrica. Presenta una longitud de 6 mm y 0.8 mm de ancho (Kanzawa, 1936; Walsh *et al.*, 2011; Rojas *et al.* 2019).

Pupa: es de forma cilíndrica de una longitud de 2 a 3 mm y 1.2 mm de ancho, es de color café claro o marrón (**Figura 5**) y presenta una **proyección en forma de estrella** en la parte anterior, los cuales corresponden a los espiráculos respiratorios (Kanzawa, 1936).

Adulto: presentan el tórax de color amarillo claro o pardo, abdomen con bandas negras. Una longitud de 2 a 3 mm (**Figuras 6a y 7a**), presentan dimorfismo sexual, la hembra es ligeramente más grande que el macho, ambos poseen ojos de color rojo y una arista plumosa (Kanzawa, 1936; Hsu, 1949; Rojas *et al.* 2019).

Macho: Presenta una mancha oscura en el extremo del ala, (**Figura 6b**), **dos peines sexuales (Figura 6c) con tres a seis dientes** en el **primer par de patas** (Hsu, 1949). Corroborar que el genital del macho (**Figura 6d y e**) cumpla con las siguientes características:

- **Placa anal ovalada.** Arco genital ligeramente constreñido en la parte media, con una fila irregular de sedas a lo largo del margen posterior, con punta tubular (**Figura 6e**).
- **Clasper primario.** Esta estructura es grande con punta aguda (**Figura 5d**); los dientes primarios en dos filas separadas, una recta superior de 10-11 y la inferior de 4. Las sedas marginales también se presentan en dos conjuntos, el superior de 5 y el inferior de 3-5. En otras especies el arreglo es distinto (Hsu, 1949; Markow y O'Grandy, 2006).

Hembra: Alas sin mancha (**Figura 7a**), **ovipositor evidentemente esclerosado y aserrado**, con los dientes más oscuros que el resto del ovipositor (**Figura 7b**), no presenta peines sexuales (Hsu, 1949; Markow y O'Grandy, 2006). Este tipo de ovipositor permiten rasgar el epicarpio, para ovipositar provocando una pequeña depresión o cavidad en la superficie de los frutos (Senasica, 2013; Walsh *et al.*, 2011).

Para información complementaria de la especie consultar Hsu (1949), Markow y O'Grandy (2006) y Miller *et al.*, (2017).

Identificación de la plaga

La identificación de adultos de *D. suzukii* es básicamente por observación de aquellos caracteres morfológicos de la especie, mediante microscopio estereoscópico y compuesto, para ello se debe garantizar durante el proceso de montaje del genital, que el ejemplar se encuentre en las mejores condiciones posibles (insecto completo, no desmembrado). En el caso que los ejemplares que presenten las características morfológicas externas dañadas, éstos deberán ser identificados por medio del genital, mientras que, en el caso de las larvas, la identidad de la especie sólo podrá ser determinada a través de técnicas moleculares (Dhami y Kummarasinghe, 2014, Escudero-Colmenar, 2014).

Para la identificación de adultos de *D. suzukii* se proporcionan las siguientes claves modificadas de Hsu (1949), McAlpine *et al.*, (1987) y Miller *et al.*, (2017), Yuzuki y Tidon (2020):

I. Clave para la identificación de adultos de Drosophilidae (McAlpine *et al.*, 1987)

- | | |
|---|--------------------|
| 1. Antena con tres artejos antenales..... | 2 |
| 1'. Antena con más de tres artejos antenales..... | Otras familias |
| 2. Ala con cuatro o cinco celdas posteriores..... | Otras familias |
| 2'. Ala con menos de cuatro celdas posteriores..... | 3 |
| 3. Arista plumosa..... | 4 |
| 3'. Arista simple..... | Otras familias |
| 4. Tórax de color amarillo claro o pardo, abdomen con bandas negras. Cuerpo con una longitud de 2 a 3 mm, ojos de color rojo (Figuras 6 y 7)..... | Drosophilidae (II) |
| 4'. No cumple con ninguna de las características anteriores... | Otras familias |

II. Clave para la identificación de adultos del género *Drosophila* (Miller *et al.*, 2017).

- | | |
|---|-----------------------|
| 1. Mesonoto y placa orbital de la cabeza con dos líneas blancas y negras a todo lo largo..... | <i>Zaprionus</i> |
| 1'. Mesonoto y placa orbital de la cabeza sin líneas blancas y negras a todo lo largo..... | 2 |
| 2. Ruptura subcostal presente en el ala..... | <i>Mycodrosophila</i> |
| 2'. Ruptura subcostal ausente en el ala..... | 3 |

- 3. Un par de sedas dorsocentrales en el tórax..... Otro género
- 3'. Dos pares de sedas dorsocentrales en el tórax..... *Drosophila* (III)

III. Clave para la identificación de adultos de *Drosophila suzukii* (Hsu, 1949)

- 1. Hembra (Figura 6a)..... 2
- 1'. Macho..... 3
- 2. Ovipositor aserrado, con dientes cortos, ensanchados y fuertemente esclerosados (Figura 7b)..... *D. suzukii*
- 2'. Ovipositor con dientes cortos, ensanchados, pero nunca fuertemente esclerosados o a manera de sierra..... Otras especies
- 3. Ala con una mancha oscura en el ápice presente (Figura 6b)..... 4
- 3'. Ala con una mancha oscura en el ápice ausente..... Otras especies
- 4. Primer par de patas con dos peines sexuales presentes (Figura 6c)..... 5
- 4'. Primer par de patas con un peine sexual presente..... Otras especies
- 5. Peine sexual con cuatro a seis dientes y genital con dientes primarios estrechamente cercanos entre sí, más largos que los primarios y separados unos de otros (Figura 6d y e)..... *D. suzukii*
- 5'. Peine sexual diferente a las características anteriores..... Otras especies

Procesamiento de adultos (macho) (extracción de genital)

1. El procesamiento de adultos debe considerar los materiales indicados en el Cuadro 1 y Figura 8a y b.
2. La diferenciación de las hembras respecto a los machos, se observan con las características antes mencionadas.
3. La toma de fotografías debe tener su respectiva escala del cuerpo completo, además de obtener imágenes de los peines sexuales (macho), venación alar y la presencia de la mancha en el ápice del ala, mientras que, para el caso de la hembra, se considera el ovipositor. Antes de la extracción del genital, es necesario que el adulto analizado bajo el microscopio estereoscópico cuente con al menos el primer par de patas o el abdomen completo.
4. El genital debe ser montado en portaobjetos usando el siguiente método:

Método de montaje del genital (macho) [Acevedo-Reyes *et al.* (2019), Modificado de Rodríguez (1994)]

1. El espécimen se debe colocar en posición ventral sobre una cápsula de porcelana, caja Petri o siracusa. Con ayuda de las pinzas y agujas de disección, separar el abdomen del ejemplar.
2. Colocar el abdomen en un tubo de ensayo que contenga solución de hidróxido de potasio al 40 % \pm 2 % y llevarlo a baño María por 10 min \pm 2 min cuando el agua este en ebullición.
3. Decantar el exceso de hidróxido de potasio y realizar seis lavados con 1 mL de agua destilada. Remover todo el contenido interno del abdomen en la cápsula de porcelana con ayuda de un pincel de pelos cortos y finos, o bien con alfileres entomológicos del #00.
4. Extraer el genital dispuesto en el último segmento abdominal y posteriormente transferirlo a otro tubo de ensayo y adicionar etanol al 96 % hasta cubrirlo y dejar reposar el genital por 10 min \pm 2 min. Se puede obviar los enjuagues con agua destilada y realizar los lavados directamente con etanol al 96 % (deshidratación directa) cuando el genital se encuentre libre de cualquier contenido interno.
5. Transferir el genital al aceite de clavo y dejarlo por un periodo de 10 min \pm 2 min.
6. Montar en bálsamo de Canadá el genital aclarado, extendiéndolo completamente en el portaobjetos en vista dorsal. Posteriormente colocar el cubreobjetos, cuidando de no dejar burbujas.
7. La laminilla se observará empleando el microscopio compuesto.
8. Etiquetar las laminillas, como se menciona en el **apartado 3.5**.
9. Colocar las laminillas en plancha de calentamiento, horno o estufa de secado a 40 °C \pm 2 °C durante siete días, con la finalidad de preservar la laminilla para colección o evidencia de las determinaciones realizadas.
10. Después de secar, las laminillas deben sellarse usando una doble capa de esmalte o barniz transparente.

Procesamiento de larvas de Drosophilidae

1. El material utilizado para el procesamiento debe ser: minucia™, alfileres entomológicos #00, pinzas entomológicas, vidrio de reloj, cápsula de porcelana, caja Petri o siracusa, etanol al 70 y 96 % (**Cuadro 1 y Figuras 8a y b**).
2. Las fotografías deben tomarse con escalas adecuadas. Antes de cualquier disección se debe constatar que la larva analizada bajo el microscopio estereoscópico corresponda a la familia Drosophilidae, por lo cual se debe visualizar el cuerpo completo de la larva, los sífúnculos respiratorios fuertemente esclerosados, lóbulos anales y espiráculos anteriores.

3. La larva sospechosa a *D. suzukii* tendrá como característica principal: lóbulos anales poco desarrollados y protuberantes, por lo que se enviarán para el diagnóstico molecular de acuerdo a Folmer *et al.*, 1994.

DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Extracción de DNA por el Método del CTAB 2 % (Doyle y Doyle, 1990)

Preparar solución amortiguadora CTAB 2% (buffer de extracción) de acuerdo a lo siguiente: CTAB 20.0 g, NaCl 82.0 g, Tris Base 2.42 g, EDTA 1.46 g para un volumen de 1000 mL de agua destilada.

Mezclar bien los reactivos y agregar lentamente 750 mL de agua destilada. Si permanecen grumos, calentar en microondas o en parrilla, hasta ebullición y seguir agitando. Aforar a un litro, ajustar el pH a 8.0 y esterilizar en autoclave durante 20 minutos a 15 psi.

Procedimiento:

1. Calentar la solución amortiguadora de extracción (CTAB) a 65 °C.
2. En un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL, agregar 500 µL de solución CTAB y 4 µL de proteinasa K (20 mg/mL) y colocar el espécimen larvario indicado en el inciso 3) del punto 3.2.5 de este documento.
3. Macerar con un pistilo o bien macerar en un mortero con nitrógeno líquido.
4. Mezclar por inversión, para homogenizar el tejido con la solución amortiguadora.
5. Incubar en baño María, a una temperatura de 65 °C/90 min.
6. Retirar los tubos y dejar enfriar de 5 a 10 min a temperatura ambiente (23-25°C).
7. Adicionar 500 µL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Agitar los tubos por inversión durante 10 min a temperatura ambiente.
8. Centrifugar a 1200 *rfc* a temperatura ambiente durante 5 min para formar la fase acuosa (superior) y la fase orgánica (inferior).
9. Recuperar aproximadamente 450 µL de la fase superior acuosa y depositarla en otro tubo de microcentrifuga esteril de 1.5 mL.
10. Agregar 1/2 volumen (50 % de lo recuperado) de isopropanol (2-propanol) al 100 % a -20 °C. Mezclar por inversión y dejar en reposo al menos 10 min para favorecer la precipitación del DNA.

Paso opcional: incubar las muestras toda la noche a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, sobre todo si no es visible el DNA precipitado.

11. Centrifugar a 1200 *rfc* a temperatura ambiente durante 30 min, para precipitar y formar la pastilla de DNA. Desechar el isopropanol por decantación.
12. Agregar 500 μL de etanol al 70 %, y despegar su pastilla para su lavado, después centrifugar por 5 min, a 1200 *rfc* y desechar el etanol por decantación y repetir el lavado. Dejar secar la pastilla a temperatura ambiente o utilizar un equipo para secar la pastilla de ADN (MiVac DNA concentrator).
13. Resuspender la pastilla en 50 μL de agua libre de nucleasas o algún *buffer* TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM disodium EDTA, pH 8.0).
14. Guardar las muestras a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta utilizarlas.

Nota: Cuando el DNA es congelado y descongelado, empieza a degradarse. Por eso, debe congelarse si se va a almacenar a largo plazo, y de preferencia, una vez terminados todos los análisis. Si el DNA va a utilizarse en varios proyectos, con largos intervalos entre uno y otro, conviene hacer alícuotas y colocarlas en tubos para su congelación; de esta manera, cada alícuota de ADN es descongelada una sola vez, al comienzo de cada proyecto.

Verificación de la calidad del DNA

La calidad del DNA obtenido se determina por medio de espectrofotometría y debe cumplir con una pureza de: 1.8-2.0 en la relación A260/A280 (Lehninger, 1975) y 1.8-2.0 en la relación A260/A230 (von Ahlfen y Schlumpberger, 2010).

Ensayo de PCR con *iniciadores* generales

Para la determinación de la identidad de *Drosophila suzukii* se utilizan los iniciadores propuestos por Folmer *et al.*, 1994 (**Cuadro 2**), que amplifican la región DNA mitocondrial (mtDNA) de 710 pb.

Los iniciadores se utilizan por separado, usando las concentraciones de mezcla de reacción del **Cuadro 3**. Considerar dos repeticiones por muestra, incluyendo los controles. Programar el termociclador de acuerdo a lo descrito en el **Cuadro 4**.

Controles para las pruebas moleculares

En todos los ensayos de PCR descritos en este documento, es necesario incluir los siguientes controles:

Control positivo: provee un patrón de referencia para comparar los resultados positivos. Puede ser DNA plasmídico y/o DNA de total de *D. suzukii* previamente confirmado mediante secuenciación.

Control negativo de reactivos: es la mezcla de reacción sin molde (DNA/clona). Descarta falsos positivos y contaminación de la reacción.

Interpretación de resultados para los ensayos de PCR

Los resultados serán válidos solamente bajo los siguientes criterios:

- El control positivo para el ensayo de PCR con el par de iniciadores LCO1490/HCO2198 debe de generar un amplicón de 710 pb.
- El control negativo de reactivos no debe de generar ninguna amplificación.
- Las muestras se consideran sospechosas a *D. suzukii* cuando generen el amplicón de 710 pb.

Identificación de la plaga

Para reportar una identificación positiva de *D. suzukii*, la amplificación de la prueba de PCR se debe confirmar por medio de la secuenciación.

- 1) Enviar los productos de PCR a secuenciar, atendiendo las especificaciones para el envío de muestras de la institución a la que se solicita el servicio.
- 2) Al recibir los archivos de sus secuencias en formato .ab1 con su respectivo electroferograma, estos deberán ser editados para obtener su secuencia consenso.
- 3) Obtenida la secuencia, se deberá ingresar a la herramienta de alineamiento Nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI con la finalidad de comparar con las secuencias depositadas.
- 4) Los resultados del porcentaje de cobertura e identidad (deberán tender hacia el 100 %), el valor de *E* (deberá tender a cero) con esta información se confirma el resultado por la técnica de secuenciación.

Consideraciones

La determinación positiva a *D. sukuzii* a partir adultos puede realizarse mediante el uso de claves taxonómicas y microscopía óptica. Para huevos, larvas y pupas la determinación deberá realizarse necesariamente por técnicas moleculares.

Preservación

La preparación permanente del genital de *D. sukuzii* se obtiene con el medio de montaje bálsamo de Canadá, para ello se debe colocar el portaobjetos en una estufa de secado ($35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), por treinta días aproximadamente. Posteriormente se etiquetan (etiqueta 1 y 2) de acuerdo a lo indicado en la **Figura 2** y se conservan en porta-laminillas. Los especímenes completos deben conservarse en alcohol al 70 % con sus respectivos datos de colecta, taxonómicos y geográficos.

Etiqueta 1 (izquierda): familia, género, especie, nombre del determinador, fecha de la determinación y técnica de montaje.


Etiqueta 2 (derecha): lugar de recolecta (país, estado y municipio), localidad y/o paraje, coordenadas geográficas, hospedero, fecha de recolecta y nombre del recolector.

REGISTROS

Los registros y las evidencias del proceso de diagnóstico de *D. sukuzii* deben conservarse según lo descrito en NIMF 27 (2012) y conforme al Manual del Sistema de Gestión de Calidad.

En caso de un resultado positivo se deberán cumplir los siguientes puntos:

1. Los datos de rastreabilidad de la muestra, registros y las evidencias físicas y digitales sobre el diagnóstico de *D. sukuzii*.
2. Los ejemplares preservados en alcohol al 70 %, mientras que el genital será preservado en laminilla. Todo el material debe ser resguardados por un periodo mínimo de 30 días como evidencia de la identificación morfo-taxonómica.
3. La evidencia fotográfica de los principales caracteres de identificación morfológica y morfométrica de *D. sukuzii*.
4. DNA obtenido, en congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (de ser posible a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$)
5. Registro de los resultados de las pruebas moleculares (fotografías del gel y archivos de secuencias).



Para el caso del primer diagnóstico de esta especie que realice el Laboratorio de Pruebas, deberá remitir al CNRF el Informe Técnico y el material biológico para corroboración *in vitro*, con base en las especificaciones indicadas en la Circular No. 40 con fecha 03 de mayo de 2021. Asimismo, para los casos positivos a *D. sukuzii* posteriores, se deberá remitir al CNRF lo siguiente:

- Informe técnico con descripción detallada y evidencia de las técnicas utilizadas para el diagnóstico (incluir imagen de geles).
- Montajes permanentes con las estructuras requeridas para la identificación morfo-taxonómica.
- DNA del espécimen, con soporte documental de la evaluación de la calidad (valor de absorbancia A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} , y concentración).
- Archivos generados por secuenciación Sanger con ambos iniciadores en formato. ab1 con su respectivo electroferograma.
- Evidencias del alineamiento de secuencias con el banco de datos del NCBI o árbol filogenético.

REFERENCIAS

- Acevedo-Reyes, N., D. H. Zetina, E. Blanco-Rodríguez, J. A. López-Buenfil and R. Martínez-Rosas. 2019. Mendez-Herrera Technique: New Clearing Technique Proposed for Immature stages and Internal Structures of Adult Insects, Southwestern Entomologist 44 (2): 519-522. <https://doi.org/10.3958/059.044.0218>.
- Bolda, M. 2009. Update on the Cherry Vinegar Fly, *D. suzukii*, now known as the Spotted Wing *Drosophila*. Agricultural and Natural Resources. Recuperado el 06 de diciembre de 2021 de <https://ucanr.edu/blogs/blogcore/postdetail.cfm?postnum=1483>
- Bolda, M. P., R. E. Goodhue and F. G. Zalom. 2010. Spotted wing *Drosophila*: Potential economic impact of a newly established pest. Giannini Foundation of Agricultural Economics. University of California. Agricultural Resource Economics. UPDATE, 13: 5-8.
- CABI. 2018. Invasive species Compendium. *Drosophila suzukii* (Spotted-wing drosophila). En Línea: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/109283> . Fecha de consulta: 04 de marzo de 2021.
- Calabria, G., J. Máca, G. Bächli, L. Serra and M. Pascual. 2010. First records of the potential pest species *D. suzukii* (Diptera: Drosophilidae) in Europe. Journal of Applied Entomology. 136: 139-147.
- Dhami, M.K.; Kummarasinghe, L. 2014. A HRM Real-Time PCR Assay for rapid and Specific identification of the emerging pest Spotted-wing drosophila (*Drosophila suzukii*). PlosOne 9: e98934.
- Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV). 2011. Circular 159, en seguimiento a la detección de la plaga, mosca del vinagre de alas manchadas. Anexo 2: Protocolo para la delimitación especial de la mosca del vinagre de alas manchadas (*D. suzukii* Matsumura). Servicio Nacional de Sanidad de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA).
- Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV). 2014. Manual para el manejo fitosanitario de la mosca del vinagre de alas manchadas (*Drosophila suzukii* Matsumura) Dirección del Programa Nacional de Moscas de la fruta. México.
- Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV)-Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF). 2015. Estrategias Operativas para las plagas bajo vigilancia epidemiológica fitosanitaria 2014. (SENASICA). México.
- Diario Oficial de la Federación (DOF). 2014. Acuerdo por el que se establecen las medidas fitosanitarias para el control y mitigación de la dispersión de la mosca del vinagre de las alas manchadas (*Drosophila suzukii* Matsumura).
- Douglas, B.W., M. P. Bolda, R.E. Goodhue, A. J. Dreves, J. Lee, D. J. Bruck, V. M. Walton, S. D. O'Neal and F. G. Zalom. 2011. *D. suzukii* (Diptera: Drosophilidae): Invasive Pest of Ripening Soft Fruit Expanding its Geographic Range and Damage Potential. Journal of Integrated Pest Management. 2:1-7.
- Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1990. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. Focus 12:13-15

- Escudero-Colmenar, L. A. 2014. *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931) (Diptera: Drosophila) una nueva plaga de frutales que se está extendiendo mundialmente. Distribución, biología y ecología. Revista. Agron. N. o. Argent., 34: 13-19.
- Flores, O. Ma. H. y R. Linding-Cisneros. 2005. La Lista de nombres vulgares y botánicos de árboles y arbustos propicios para repoblar los bosques de la República de Fernando Altamirano y José Ramírez a más de 110 años de su publicación. Revista Mexicana de Biodiversidad, 76:11-75.
- FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 2006. Calendario de Cultivos. América Latina y el Caribe. 1-280. Recuperado el 31 de julio del 2018 en <http://www.fao.org/3/a-a0600s.pdf>
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., and Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular Marine Biology and Biotechnology 3(5), 294-299
- Hauser, M., S. Gaimari and M. Damus. 2009. *D. suzukii* new to North America. Recuperado el 06 de julio de 2018 de <http://www.nadsdiptera.org/News/FlyTimes/issue43.pdf>.
- Hsu, T. C. 1949. The External Genital Apparatus of Male Drosophilidae in Relation to Systematics. Univ. Texas Publs., EUA, 4920: 80-142.
- IPPC. 2021a. International Standards for Phytosanitary Measures (ISPM) 5 *Glosary of phytosanitary terms*. International Plant Protection Convention (IPPC). En línea: <https://www.fao.org/3/mc891s/mc891s.pdf>. Fecha de consulta: 30 de abril de 2021.
- IPPC. 2021b. List of regulated pests. International Plant Protection Convention (IPPC). En línea: <https://www.ippc.int/en/publications/603/>. Fecha de consulta: 09 de marzo de 2021.
- Kaneshiro, K. Y. 1983. *D. (Sophophora) suzukii* (Matsumura). Proceedings of the Hawaiian Entomological Society, 24:179.
- Kanzawa, T. 1936. Studies on *D. suzukii* Mats. Journal of Plant Protection (Tokyo). 23(1/3): 66-70.
- Lehninger, A. L. 1975. Biochemistry, 2nd ed., Worth Publishers, New York, 1975.
- McAlpine, J. F. 1987. Key to Families- Adult, 89-124p. In: McAlpine, J. F., B. V. Peterson, G. E. Shewell, H. J. Teskey, J. R. Vockeroth y D. M. Wood (Eds.). 1987. Manual of Nearctic Diptera, Vol 1. Research Branch Agriculture Canada, Ottawa, Canada, 674p.
- Markow, T. A. and P. M. O'Grandy. 2006. *Drosophila*. A guide to species identification and use. Academic Press Publications, Netherlands. 258p.
- Miller, M. E., S. A. Marshall and D. A. Grimaldi. 2017. A Review of the Species of *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) and Genera of Drosophilidae of Northeastern North America, Canadian Journal of Arthropod Identification No. 31, 282p.
- Oku, T. 2003. SWD: *D. suzukii* (Matsumura). Japan Agricultural Pest Encyclopedia. Zenkoku Noson Kyoiku Kyokai, Japon. p.381.
- Rojas, E., J. Andrade, C. Concha, C.; F. Astudillo. 2019. Manual de reconocimiento. Estados de desarrollo de *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) y otras especies del género, comunes en el sur de Chile. Ministerio de Agricultura, Servicio Agrícola y Ganadero. Primera edición. 76 pp.

- Rubí-Arriaga, M., A. González-Huerta, I., Martínez de la Cruz, O., Franco-Mora, J. F., Ramírez-Dávila, J. A., López-Sandoval y G. V., Hernández-Flores. 2014. Inventario de especies frutales y aspectos etnobotánicos en Sultepec, Estado de México, México. *Revista Internacional de Botánica Experimental*, 83:203-211
- Sasaki, M. and R. Sato. 1995. Bionomics of the cherry *D. suzukii* Matsumura (Diptera: Drosophilidae) in Futeushima prefecture (Japan). *Annual Report of the Society of Plant Protection of North Japan*. 46:164-172.
- Sasaki, M. and R. Sato. 1996. Bionomics of *D. pulchrella* Tan, Hus et Sheng (Diptera: Drosophilidae) in Fukushima prefecture (Japan). *Tohoku Agriculture Research*., 49: 161-162.
- Senasica. 2013. Mosca del vinagre de alas manchadas (*Drosophila suzukii* Matsumura). Dirección General de Sanidad Vegetal-Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. México, D.F. Ficha Técnica No. 7. 22p.
- Senasica. 2015. Normas Oficiales Mexicanas en materia de Sanidad Vegetal. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agropecuaria (Senasica), Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural (Sader). México. En línea: <https://www.gob.mx/senasica/documentos/normas-oficiales-mexicanas-en-materia-de-sanidad-vegetal> . Fecha de consulta: 09 de marzo de 2020.
- Senasica. 2020. Campañas y Programas fitosanitarios. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agropecuaria (Senasica), Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural (Sader). México. En línea: <https://www.gob.mx/senasica/acciones-y-programas/campanas-fitosanitarias> . Fecha de consulta: 09 de marzo de 2020.
- Senasica. 2021. Módulo de Consulta de Requisitos Fitosanitarios para la importación de mercancías. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agropecuaria (Senasica), Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural (Sader). México. En línea: <https://www.gob.mx/senasica/documentos/modulo-de-requisitos-fitosanitario> . Fecha de consulta: 09 de marzo de 2020.
- Toda, M. J. 1987. Vertical microdistribution of Drosophilidae (Diptera) within various forests in Hokkaido. III. The Tomakomai Experiment Forest, Hokkaido University. *Research Bulletin of College Experimental Forests*. 44: 611-632.
- Von Ahlfen, S. and Schlumpberger, M. 2010. Effects of low A260/A230 ratios in RNA preparations on downstream applications. *QIAGEN Gene Expression Newsletter*, 15, 7-8.
- Walsh, B. D., M. P. Bolda, R. E. Goodhue, A. J. Dreves, J. Lee, D. J. Bruck, V. M. Walton, S. D. O'Neal and F. G. Zalom. 2011. *D. suzukii* (Diptera: Drosophilidae): Invasive Pest of Ripening Soft Fruit Expanding its Geographic Range and Damage Potential. *Journal of Integrated Pest Management* 2:1-7.
- Yuzuki and Tidon R., 2020. Identification key for drosophilid species (Diptera, Drosophilidae) exotic to the Neotropical Region and occurring in Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia* 64(1):e2019100. <https://doi.org/10.1590/1806-9665-RBENT-2019-100>

ANEXOS



Figura 1. Daños causados por *D. suzukii*. a) Pudrición del fruto (zarzamora); b) Hundimientos por oviposición; c) Pudrición del fruto (arándano), se observan pupas. CNRF-Laboratorio de Entomología y Acarología

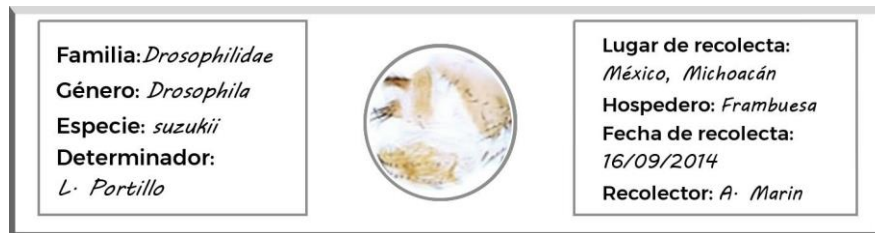


Figura 2. Etiquetado de la laminilla. CNRF-Laboratorio de Entomología y Acarología

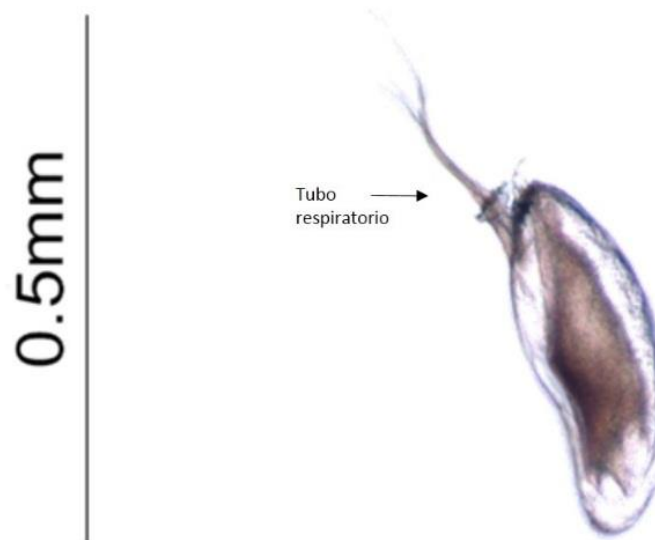


Figura 3. Huevo de *D. suzukii*. CNRF-Laboratorio de Entomología y Acarología



Figura 4. Larva de *D. sukii*. CNRF-Laboratorio de Entomología y Acarología

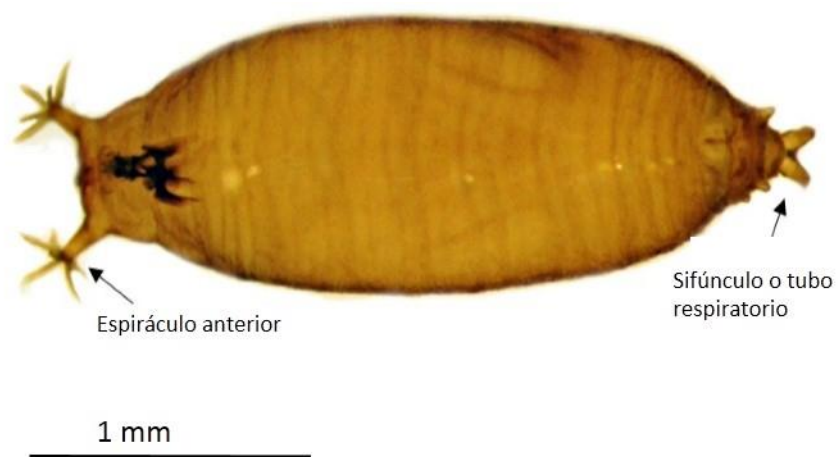


Figura 5. Pupa de *D. sukii*. CNRF-Laboratorio de Entomología y Acarología

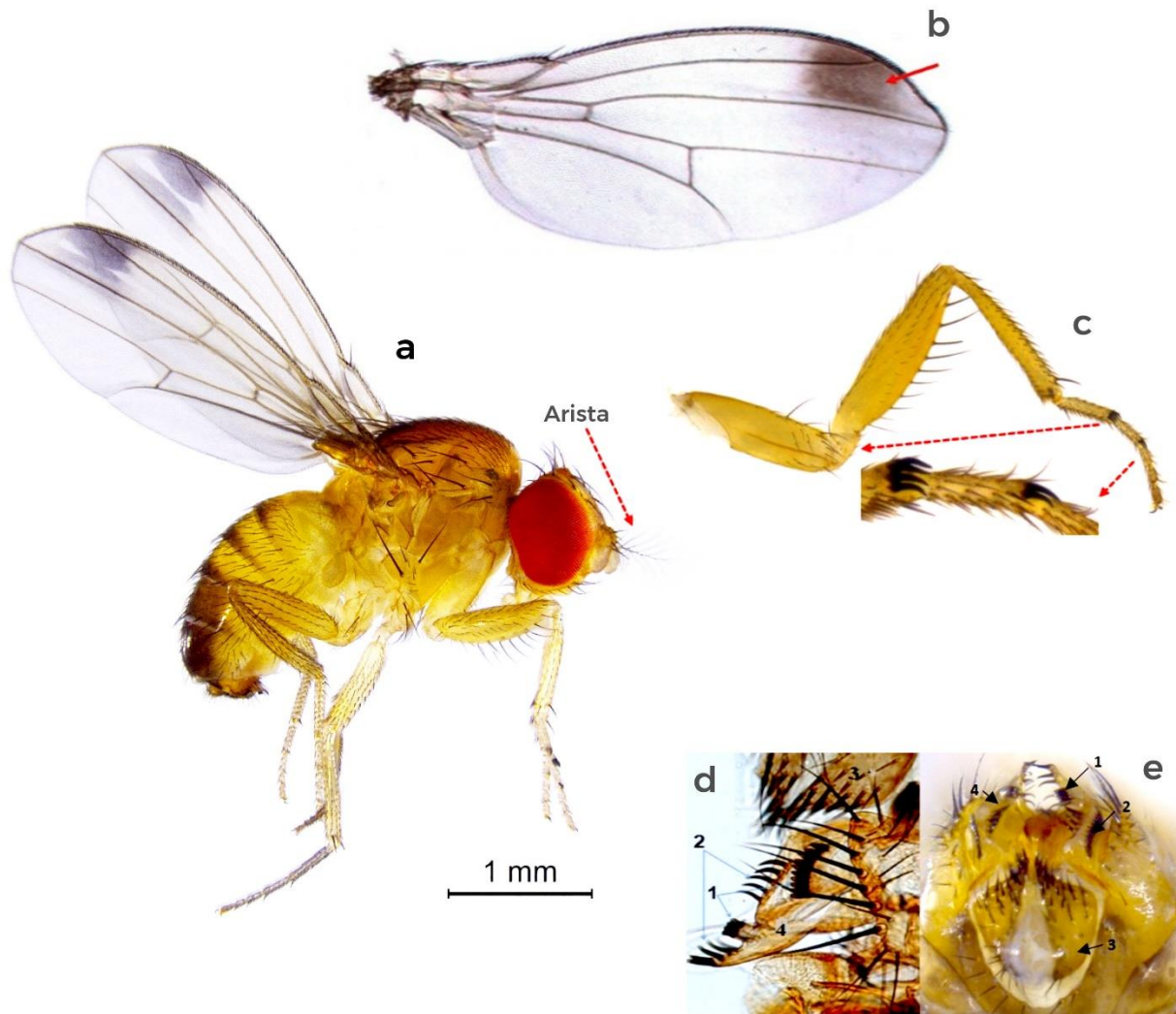


Figura 6. Adulto (macho) de *D. suzukii*. a) Vista lateral del cuerpo completo; b) Ala; c) Peine sexual en pata anterior; d) Genital vista lateral, 1: dientes primarios; 2: dientes secundarios; 3: placa anal, 4: clasper primario; e) Genital, vista frontal, 1: dientes primarios; 2: dientes secundarios; 3: placa anal, 4: clasper primario. CNRF-Laboratorio de Entomología y Acarología

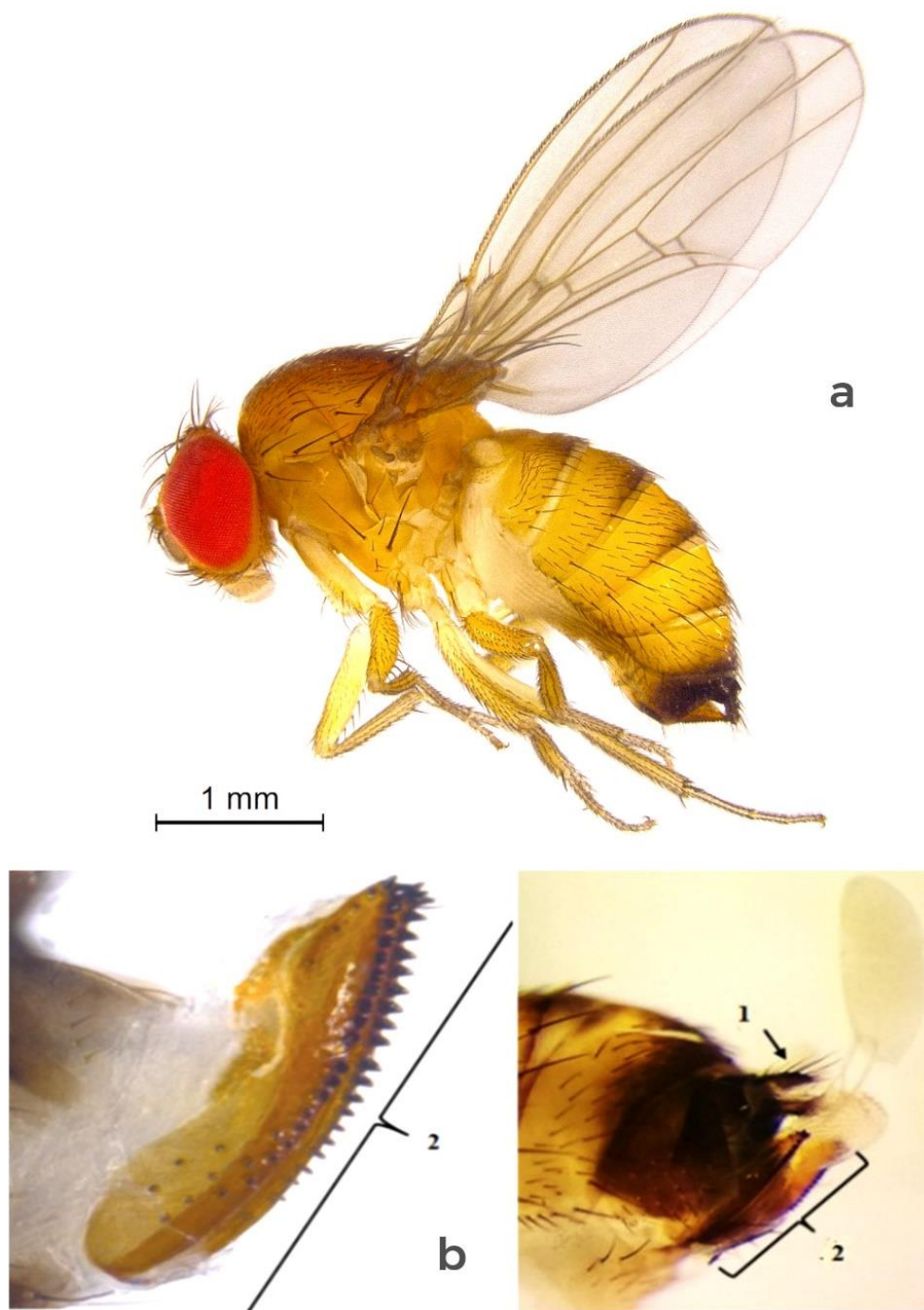


Figura 7. Adulto (hembra) de *D. sukii*. a) Vista lateral del cuerpo completo; b) Ovipositor, 1: Placa anal, 2: Ovipositor. CNRF-Laboratorio de Entomología y Acarología

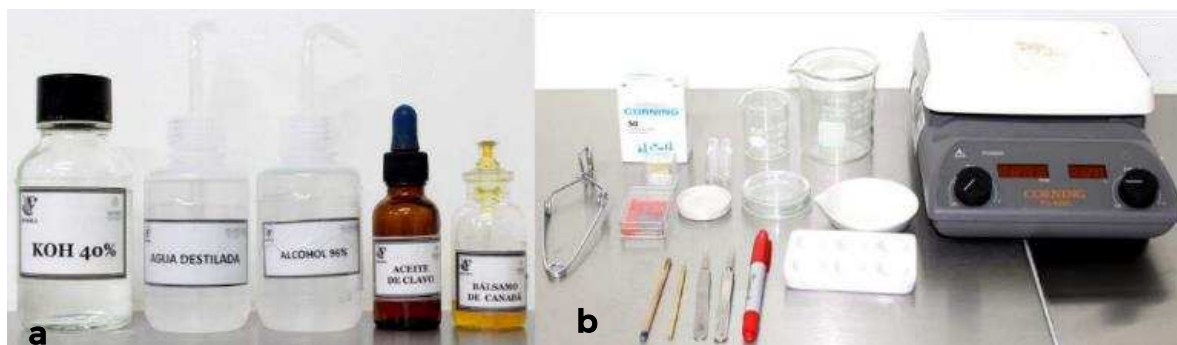


Figura 8. Reactivos y materiales utilizados en la determinación del estado adulto de *Drosophila suzukii* (genital). a) Reactivos: hidróxido de potasio al 40 %, agua destilada, etanol (70 y 96%), aceite de clavo y bálsamo de Canadá. b) Materiales. CNRF-Laboratorio de Entomología y Acarología

Cuadro 1. Materiales utilizados para la identificación de adultos de *D. suzukii*

Material	Reactivos	Equipo
Vaso de precipitado (250 mL)	Hidróxido de potasio al 40 %	Plancha de calentamiento o Estufa de secado
Tubo de ensayo (5mL)	Agua destilada	Microscopio compuesto
Pinzas para tubo de ensayo	Etanol (96 y 70%)	
Minucia™	Aceite de clavo	
Pinzas entomológicas	Bálsamo de Canadá	
Agujas de disección	Fucsina ácida	
Portaobjetos		
Cubreobjetos		
Vidrio de reloj,		
cápsula de porcelana, caja		
Petri o siracusa		
Marcador indeleble		
Alfileres entomológicos #00		

Cuadro 2. Iniciadores para la detección de *D. sukukii* (Folmer et al., 1994)

Tipo	Nombre del iniciador	Secuencia (5' → 3')	Tamaño (pb)
Forward	LCO 1490	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG -3'	710
Reverse	HCO 2198	3'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-5'	

Cuadro 3. Mezcla de reacción para la detección de *D. sukukii*

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (µL)
Buffer de PCR	10 X	1 X	2.5
MgCl ₂	50 mM	1.5 mM	0.75
dNTP	10 mM	0.2 mM	0.5
Forward	10 µM	0.4 µM	1
Reverse	10 µM	0.4 µM	1
<i>Taq</i> platinum	5 U/µL	0.05 U/µL	0.25
DNA	---	---	2
Agua grado biología molecular	---	---	17
Volumen total			25

Cuadro 4. Programa del termociclador

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	60 s	1
Desnaturalización	94	30 s	4
Anillamiento	45	90 s	
Extensión	72	60 s	
Desnaturalización inicial	94	30 s	
Desnaturalización	51	90 s	35
Anillamiento	72	60 s	1
Extensión	72	5 min	
Conservación	12	∞	

AVISO

La metodología descrita en la presente ficha técnica para el diagnóstico de *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931), tiene un sustento científico que respalda los resultados obtenidos al aplicarlo. La incorrecta implementación o variaciones en la metodología especificada pueden derivar en resultados no esperados por lo que es responsabilidad del usuario seguir y aplicar el procedimiento de forma correcta.

Forma recomendada de citar:

SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. 2021. Ficha Técnica de Diagnóstico de: *Drosophila suzukii*. Tecámac, México: Autor.

Esta ficha técnica fue elaborada, revisada y validada por el Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria.

Dr. Ángel Ramírez Suárez Subdirector Técnico	Validó
M. en C. Héctor Enrique Vega Ortíz Jefe del Departamento de Entomología y Acarología	Revisó
Ing. Mario Espinosa Mendoza Coordinador del Laboratorio de Biología Molecular	Revisó
Dra. Dulce Azucena Hernández Zetina Técnico del Laboratorio de Entomología y Acarología	Elaboró
Ing. Israel Morales González Técnico del Laboratorio de Biología Molecular	Elaboró

CONTACTO

lab.entomologia@senasica.gob.mx

Teléfono: 55 5905 1000, Ext. 51368, 51370 (Entomología y Acarología)

Dudas sobre:

- Campañas Fito o Zoonosanitarias
- Movilización de Productos Agroalimentarios y Mascotas

800 987 9879

Quejas • Denuncias
Órgano Interno de Control
en el Senasica

55 5905.1000

Ext. 51648

gob.mx/agricultura

gob.mx/senasica

