



DOCUMENTO GENERAL

Implementación Sistema prospección visual y el muestreo de fruta

La prospección visual y el muestreo de fruta hospedante tienen como propósito determinar la ausencia o presencia de individuos en estado inmaduro de DS, ya sean huevos, larvas o pupas.

La actividad será efectuada en los huertos/cultivos o plantas de fruta hospedante o potencialmente hospedante. También será efectuada en la vegetación que presente fruta en estado infestable (fruta hospedante y potencialmente hospedante) y que se encuentre inmediatamente colindante al huerto/cultivo o lugar de monitoreo.

Esta actividad permite recopilar información útil para orientar las decisiones técnicas que se deban adoptar en el Manejo Integrado de la plaga DS. Principalmente en lo referido a evaluar si las acciones de control de la plaga en un huerto están siendo efectivas.

El período de prospección visual y muestreo de fruta, corresponde al momento en el cual la fruta está susceptible de ser infestada por el insecto, es decir, desde que la fruta se encuentra en estado de pinta y hasta finalizar la cosecha.

La fruta muestreada debe ser revisada en laboratorio o zona de análisis de muestras donde se realiza el análisis de fruta y detección de estados inmaduros de la plaga.

Si a partir del análisis de fruta se determinan insectos sospechosos de DS y que se encuentran en estado vivo, deben mantenerse en cajas de crianza para que se desarrollen hasta su estado adulto y poder determinar si corresponden a *D. suzukii* en el laboratorio autorizado correspondiente.

En caso necesario, los ejemplares sospechosos detectados deben ser enviados a(los) laboratorio(s) predefinido(s) y autorizado(s) por SAG para su análisis molecular.

Tanto dentro del huerto como en las áreas de vegetación circundante que deslindan el huerto, se debe efectuar la prospección visual y muestreo de frutos de plantas hospederas preferentes (código D-ATR-AAT-75). En caso de que en estos lugares existan otro tipo de frutos, también deben ser muestreados ya que pueden ser potenciales hospedantes de la plaga y servir como fuente de infestación del huerto. Es importante mencionar que cualquier otra especie frutal no indicada en el listado (por ejemplo, una especie silvestre nativa u ornamental), y que por sus características sea susceptible de ser atacada por DS, debe ser muestreada.

1. Metodología prospección visual de la fruta

La prospección visual de fruta corresponde a la revisión de frutos en terreno, con el propósito de identificar y distinguir síntomas o signos de presencia de fruta infestada con huevos, larvas o pupas de DS. En esta modalidad, sólo se toma como muestra la fruta que presente evidencias positivas de estar infestada por DS y que deberá ser procesada de acuerdo a lo indicado en el punto 2. "Metodología de Muestreo de frutos", citado más abajo en el texto.

Para este propósito se analizará visualmente cierta cantidad de fruta dentro de cada planta hospedante, considerando los siguientes criterios:

DOCUMENTO GENERAL

Implementación Sistema prospección visual y el muestreo de fruta

1. La fruta debe estar **pintona a madura**. Si dentro del mismo árbol/planta toda la fruta presenta esta característica, entonces siempre se debe evaluar la que esté con mayor avance en su madurez.
2. Se inspecciona sólo la **fruta colgada del árbol** (no del suelo). Se evalúa aquella fruta que presenta síntomas evidentes de daño o pudrición y también aquella que aparenta estar sana, pero que mediante una observación minuciosa se verifique la presencia de leves punturas, puntos necróticos o minúsculos orificios de ovipostura. También se debe observar, en algunos casos, si al apretar la fruta con la yema de los dedos en los lugares con punturas, se observa la exudación de pequeñas gotitas de jugo interno.
3. Los frutos que han sido seleccionados por presentar las características señaladas en el punto previo, se observan con una lupa de bolsillo o cuentahílos (al menos 10X de aumento). En el caso de frutos de piel lisa, como cereza y arándano, si existen oviposturas recientes se podrán observar dos filamentos blanquecinos que sobresalen y que corresponden a los espiráculos del huevo (por donde capta el aire). Asimismo, en frutos en que se observe alguna gota de fluido interno sobre la epidermis, al removerla se podrá ver debajo de ella la larva de Drosophila. En el caso de fruta que no tiene su piel lisa, como frambuesa, mora y frutilla, el daño inicial es prácticamente imperceptible a simple vista. Se logra evidenciar el daño cuando el deterioro por las larvas está avanzado y la fruta se muestra con áreas blandas y opacas y luego con un área necrótica mayor.
4. La cantidad de frutos a observar dentro del huerto o predio es variable, pero al menos debe seleccionar 10 árboles o plantas por hectárea. Cabe señalar que no se ha definido un nivel óptimo o adecuado de prospección visual a realizar por hectárea o especie frutal, ni cuántos son los frutos a observar en cada planta o árbol seleccionado, pero sin duda que mientras más plantas/árboles sean evaluados, existe mayor grado de precisión en el diagnóstico.
5. Para seleccionar los árboles o plantas hospedantes en que se realiza esta prospección visual, será necesario considerar algunas condiciones particulares que son las siguientes:
 - Seleccionar aquellas plantas/árboles hospedantes que presenten sus frutos en un estado de madurez más avanzado.
 - Seleccionar aquellas plantas/árboles hospedantes que se ubiquen hacia los bordes del huerto. Se deberá efectuar esta prospección visual en, al menos, una planta ubicada en cada uno de los lados de los bordes del huerto.
 - Seleccionar aquellas plantas/árboles hospedantes que se ubiquen en sectores del huerto con condiciones microclimáticas más adecuadas para el desarrollo de **DS** (por ejemplo: presencia permanente de charcos de agua, abundancia de follaje, suelo enmalezado, cercanía a zonas con vegetación que puedan servir de refugio de la plaga si es que no hay fruta disponible, por ejemplo, zarzamora contigua al huerto), lugares sombríos al interior del cultivo, y todo lo que propicie una mayor humedad relativa asociada a la planta huésped.

DOCUMENTO GENERAL

Implementación Sistema prospección visual y el muestreo de fruta

- Dentro del huerto, se sugiere seleccionar las plantas/árboles para realizar esta actividad siguiendo un patrón de desplazamiento en zigzag.

2. Metodología de Muestreo de frutos

El muestreo de fruta consiste en la recolección dirigida (no al azar) de una muestra de fruta que por sus síntomas y signos puede estar infestada por DS. Una vez recolectados, los frutos deben ser guardados convenientemente en una bolsa con su respectiva etiqueta de identificación. Estas muestras luego serán trasladadas a la zona de análisis de muestras.

El muestreo se efectuará de la siguiente forma:

1. Una "muestra" de fruta consiste en una o varias unidades de fruta de una misma especie/variedad que son sospechosas de estar infestadas por DS, y que fueron colectadas en un mismo lugar.
2. Los frutos de una muestra deben ser depositados al interior de una bolsa plástica autosellable y suficientemente firme para evitar roturas y pérdidas en el trayecto al laboratorio o zona de análisis de muestras.
3. Se toman como muestras tanto los frutos que fueron evaluados a través de la prospección visual, como aquellos no evaluados previamente pero que se consideran sospechosos.
4. La fruta hospedante a muestrear debe estar pintona a madura o sobremadura. Solo se tomarán muestras en estado verde (antes de pinta) si es que existen síntomas o signos evidentes de la plaga.
5. Se recolectará sólo fruta del árbol (no del suelo, techo, etc.)
6. Se debe seleccionar dentro de la planta la fruta que presente algún tipo de sintomatología (daño) que se pueda asociar a la presencia de DS, como, por ejemplo: fruto con áreas con hundimientos anormales, presencia de microperforaciones, punturas asociadas a una necrosis inicial del tejido circundante y pudriciones.
7. Cada muestra de fruta debe ser recolectada de una única planta/árbol o de un grupo de plantas/árboles que deben ser claramente identificados respecto a su ubicación espacial (dirección) y/o punto de referencia dentro del huerto o cultivo. Para este propósito, cada muestra debe estar correctamente etiquetada por medio de una "Ficha de Identificación de muestra de fruta para *Drosophila suzukii*" (código F-ATR-AAT - 200). Se debe completar con al menos la siguiente información:
 - Fecha de recolección/colecta de la muestra.
 - Dirección: calle, predio, huerto, etc. Incluye la Región y Comuna
 - En el caso de frutos recolectados en un huerto, es preciso dar indicaciones más precisas del lugar donde se colectaron: N° de hilera del huerto, georreferencia, orientación, indicar un punto de referencia, etc.
 - Especie vegetal y variedad si está disponible.
 - Georreferencia del lugar de colecta de la muestra.

DOCUMENTO GENERAL

Implementación Sistema prospección visual y el muestreo de fruta

- Nombre de la persona que colecta la muestra (muestreador)
- 8. La cantidad de unidades de fruta a recolectar por cada muestra depende del tipo de la especie. Por ejemplo, para fruta blanda y de epidermis muy delgada (cerezas, uva, frambuesa, frutilla, mora, arándano, otros berries, caqui, damasco, higo, etc.) cada muestra debe pesar alrededor de 0,25 kg a 0,5 Kg. En el caso de muestras de frutos más firmes, como por ejemplo peras, ciruelas, duraznos, manzanas, la muestra puede ser alrededor de 0,5 a 1,0 kg.
- 9. Las muestras colectadas deben hacerse llegar en un plazo no mayor a 24 horas (dependiendo del estado de la muestra), a la zona de análisis de muestras.
- 10. Una vez en la zona de análisis de muestras de fruta se deben realizar los siguientes procedimientos:

Análisis directo de la fruta en busca de estados inmaduros de DS

- Recepción y registro de la muestra.
- Depositar unidades de muestra (fruta) sobre bandeja.
- Preocuparse de tener espacio de trabajo con luz suficiente (apoyado con luz de escritorio).
- Observar cada fruta por todo su contorno buscando posibles síntomas de daño o signos de la plaga.
- Donde se observen picaduras o síntomas de daño retirar la epidermis suavemente con la punta del cuchillo y observar. Cualquier sospechoso debe ser removido con un pincel y depositado en placa Petri correctamente identificada con los datos de la muestra de la que proviene.
- La fruta de pulpa blanda debe ser desmenuzada y la fruta de pulpa firme se debe rebanar cuidadosamente en finas rodajas de adentro hacia fuera.
- Luego de cortar la primera capa, voltear la rodaja con el mismo cuchillo para observar la presencia de sospechosos.
- Las rodajas deben ser depositadas en la bandeja para separar las celdas de la pulpa.
- Repetir estos dos últimos pasos hasta terminar de cortar toda la fruta.
- Continuar con este proceso hasta completar todas las unidades de la muestra.

Conteo de ejemplares utilizando el método de inmersión y flotación de fruta.

a) Uso solución salina o azucarada:

- Preparar solución salina (1 taza de sal) ó azucarada (2.5 tazas) en 4 litros de agua y batir para una mejor disolución. Batir siempre antes de usar. La diferencia entre usar una solución u otra para detectar presencia de larvas en general puede ser irrelevante (el azúcar mata las larvas más lento y permite detectar movimiento de estas, pero es más pegajosa y difícil de trabajar que la sal, así como también es atrayente de otros insectos).
- Aplastar ligeramente la fruta dentro de la bolsa para romper la piel.
- Agregar solución salina o azucarada y esperar 15 minutos y revisar.
- Las larvas de *Drosophila spp.* y/o DS van a flotar en el líquido haciéndolas más visibles.

Crianza de estados inmaduros sospechosos de DS (huevos, larvas, pupas) hasta su estado adulto.

Se deben obtener uno o más estados inmaduros del insecto en estado vivo a partir de

DOCUMENTO GENERAL

Implementación Sistema prospección visual y el muestreo de fruta

las muestras, con el objetivo de criar estos ejemplares hasta su estado adulto para poder efectuar la identificación por taxonomía tradicional y en caso de ser necesario por análisis molecular.

La metodología de crianza de insectos en jaulas o cajas de crianza, a partir de ejemplares en estado inmaduro que son sospechosos de ser *Drosophila suzukii* obtenidos de muestras de fruta, será efectuada estrictamente con el objetivo de obtener la identificación de la especie plaga a partir de los individuos adultos que se obtengan de la crianza, debido a que no es factible la identificación certera de los estados inmaduros a través de taxonomía tradicional.

La metodología es la siguiente:

- Se debe colocar cada uno de los frutos correspondientes a una misma muestra, en un contenedor (jaula de crianza) apropiado para la crianza.
- Las jaulas de crianza con las frutas deben mantenerse en una sala apropiada con condiciones de humedad relativa y temperatura controlada óptimas para el rápido desarrollo de la plaga en cuestión.
- La revisión de las jaulas de crianza con las frutas que contienen, debe ser efectuado aproximadamente cada 2 días para evaluar si existe emergencia de insectos adultos.
- El período en el cual deberán ser mantenidas las frutas en la sala de crianza, dependerá de la temperatura de la sala. Para ello se debe considerar que el ciclo de vida desde la eclosión de huevos hasta la emergencia de adultos oscila entre 9-10 días y 21-25 días a 25 ° C y 15 ° C, respectivamente (Kanzawa, 1939). Observaciones de laboratorio registran el desarrollo de huevo a hembras ponedoras, que oscilaron entre aproximadamente una semana y 12-15 días a 21,1°C y a 18,3°C respectivamente (Walsh et al., 2011). Por ende, se estima un promedio de 10 a 15 días de mantención de la fruta en sala de cría.

Podrán ser usados otros métodos de análisis de muestras que no se encuentren descritos en este instructivo, siempre y cuando, se trate de procedimientos aprobados con medio de respaldo como estudios científicos reconocidos y avalados. Para aquellos que decidan hacer uso de estas alternativas, deben tener disponible los documentos de respaldo tanto al momento de postular a la autorización como al momento de ser supervisados.

3. Manejo de información en muestreo de fruta

Al finalizar el análisis de una muestra, se debe completar el punto 3 de la "Ficha de identificación de muestra de fruta para *Drosophila suzukii*", (código F- ATR-AAT-200) y además completar lo correspondiente en la planilla Excel "Prospección Muestreo de fruta y Análisis DS autorizados" (código F- ATR-AAT-202).

4. Envío de ejemplares sospechosos de DS a laboratorio autorizado

Si se detectan ejemplares sospechosos a partir de la prospección visual y muestreo de fruta en campo, de una región o comuna donde aún no se ha detectado la plaga, los ejemplares sospechosos, luego de haber sido identificados como DS por taxonomía tradicional, en un laboratorio autorizado por el SAG, deben ser enviados a un laboratorio de análisis molecular autorizado por el SAG.



DOCUMENTO GENERAL

Implementación Sistema prospección visual y el muestreo de fruta

Si se detectan ejemplares sospechosos a partir de la prospección visual y muestreo de fruta en campo, de una región o comuna de Chile donde la plaga está presente, el responsable técnico debe obtener el diagnóstico por taxonomía tradicional de un laboratorio autorizado y en caso de dudas en la identificación debe hacer envío a un laboratorio de análisis molecular autorizado por el SAG.