



**Universidad Michoacana de San Nicolás de
Hidalgo**



Instituto de Investigaciones Químico Biológicas

**“Fermentados de zarzamora como atrayentes
de *Drosophila suzukii* Matsumura (Diptera:
Drosophilidae)”**

T E S I S

Que para obtener el título de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA
EXPERIMENTAL**

Presenta:

IBQ. ISRAEL CARBAJAL NÚÑEZ

Director de tesis:

D. C. JOSUÉ ALTAMIRANO HERNÁNDEZ

Co- director de tesis:

D. C. ESPERANZA LOERA ALVARADO

Morelia, Michoacán

Mayo, 2021



Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Sintética y Química Aplicada del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en colaboración con el Laboratorio de Nutrición Vegetal del Centro de Innovación y Desarrollo Agroalimentario de Michoacán, bajo la supervisión del D. C. Josué Altamirano Hernández.

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mis asesores, el doctor Josué Altamirano Hernández y la doctora Esperanza Loera Alvarado quienes confiaron en mi desde el principio y con sus conocimientos y experiencia me guiaron hasta la culminación de este proyecto de investigación.

También quiero agradecer a la UMSNH por abrirme sus puertas y convertirme en un estudiante nicolaita.

Al CIDAM por brindarme sus instalaciones, recursos y herramientas que fueron necesarios para llevar a cabo el proceso de investigación.

Al CONACYT por el otorgamiento de la beca a lo largo de mis estudios de maestría.

A todos mis compañeros de laboratorio quienes hicieron más agradable el día a día durante estos años y en especial a Daniela por su asistencia y amistad.

Por último, quiero agradecer a mi familia por apoyarme aún cuando mis ánimos decaían. En especial, quiero hacer mención de mi esposa Liliana, que siempre estuvo ahí para darme palabras de apoyo, consejos y soportar mis ausencias.

Muchas gracias a todos.

INDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	MARCO TEÓRICO.....	3
	2.1. Zarzamora.....	3
	2.2. <i>Drosophila suzukii</i> Matsumura (Díptera: Drosophilidae).....	5
	2.3. Técnicas de investigación en ecología química de insectos.....	9
	2.3.1. Técnicas electrofisiológicas.....	10
	2.3.2. Técnicas comportamentales.....	11
	2.4. Respuesta de <i>D. suzukii</i> ante volátiles de frutas y de fermentación.....	14
	2.5. Trampas y atrayentes.....	18
III.	JUSTIFICACIÓN.....	22
IV.	HIPÓTESIS.....	22
V.	OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN.....	22
	5.1. Objetivo general.....	22
	5.2. Objetivos específicos.....	22
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
	6.1. Material biológico.....	23
	6.1.1. <i>Drosophila suzukii</i>	23
	6.1.2. Zarzamora.....	24
	6.1.3. Microorganismos fermentativos.....	24
	6.2. Métodos.....	25
	6.2.1. Aislamiento de bacterias del vinagre y determinación de su capacidad fermentativa.....	25
	6.2.2. Jugo de zarzamora.....	25
	6.2.3. Pre-inóculo.....	26
	6.2.4. Fermentación de la zarzamora.....	26
	6.2.5. Ensayos con <i>D. suzukii</i>	27
	6.2.5.1. Ensayo de doble elección por olfatometría de tubo en “Y”.....	27
	6.2.5.2. Ensayo de múltiple elección en semi-campo.....	29
	6.2.6. Caracterización de volátiles por GC-MS.....	31

VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
7.1.	Aislamiento de bacterias del vinagre.....	33
7.2.	Jugo de zarzamora.....	38
7.3.	Elaboración de tratamientos fermentados.....	39
7.3.1.	Fermentación alcohólica.....	39
7.3.2.	Fermentación acética.....	40
7.4.	Ensayo de doble elección por olfatometría de tubo en “Y”.....	43
7.4.1.	Fermentado alcohólico con <i>K. marxianus</i>	45
7.4.2.	Fermentado alcohólico con <i>S. cerevisiae</i>	47
7.4.3.	Fermentado acético con C1 proveniente de <i>K. marxianus</i>	49
7.4.4.	Fermentado acético con C1 proveniente de <i>S. cerevisiae</i>	51
7.4.5.	Fermentado acético con C1 y C2 proveniente de <i>K. marxianus</i>	53
7.4.6.	Fermentado acético con C1 y C2 proveniente de <i>S. cerevisiae</i>	55
7.4.7.	Confrontación entre el vinagre de manzana y los fermentados de zarzamora.....	56
7.5.	Ensayo de múltiple elección en semi-campo.....	58
7.6.	Caracterización de volátiles por GC-MS.....	61
VIII.	CONCLUSIÓN.....	72
IX.	PERSPECTIVAS.....	73
X.	REFERENCIAS.....	74
XI.	ANEXOS.....	82

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Producción nacional (miles de toneladas) 2012-2017.	4
Figura 2.	Distribución geográfica de <i>D. suzukii</i>	6
Figura 3.	Dimorfismo de <i>Drosophila suzukii</i>	7
Figura 4.	Daños provocados por <i>D. suzukii</i> en cereza, arándano y zarzamora. 8	
Figura 5.	Esquema del montaje del insecto para electroantenodetección acoplado a cromatografía de gases (GC-EAD) en moscas de la fruta tephritid... 11	
Figura 6.	Instrumentos utilizados para evaluar la respuesta comportamental de insectos hacia volátiles.	13
Figura 7.	Evaluación de compuestos antenalmente activos de <i>Drosophila suzukii</i> en ensayo de múltiple elección.	14
Figura 8.	Representación gráfica de las diferentes opciones de alimentación y señales de olor utilizadas por la hembra <i>D. suzukii</i>	16
Figura 9.	Índice de atracción por volátiles de la fresa fresca y sobre-madura en tres especies de <i>Drosophila</i>	17
Figura 10.	Trampas usadas para el monitoreo y control de <i>Drosophila suzukii</i>	20
Figura 11.	Olfatómetro montado en el laboratorio.	28
Figura 12.	Ensayo de múltiple elección en semi-campo (esquema).	30
Figura 13.	Trampa utilizada en ensayo de semi-campo.	31
Figura 14.	Rampa de temperaturas en el análisis de volátiles.	32
Figura 15.	Biofilm de la bacteria C2 en GYE líquido con 4% de etanol.	34
Figura 16.	Curva de crecimiento del aislado C1 en medio GYE con diferentes concentraciones de etanol.	35
Figura 17.	Densidad óptica de C1 a las 72 h en medio GYE con diferentes concentraciones de etanol.	35
Figura 18.	Curva de crecimiento del aislado C2 en medio GYE con diferentes concentraciones de etanol.	36
Figura 19.	Acidez total (g/L) de C1 en GYE con diferentes concentraciones de etanol	37

Figura 20.	Acidez total (g/L) de C2 en GYE con diferentes concentraciones de etanol	38
Figura 21.	Matraz Erlenmeyer con jugos de zarzamora estéril.....	39
Figura 22.	Consumo de azúcares del jugo de zarzamora por <i>K. marxianus</i>	40
Figura 23.	Consumo de azúcares del jugo de zarzamora por <i>S. cerevisiae</i>	40
Figura 24.	Acidez total (g/L) con C1 y C2, previamente fermentado con <i>K. marxianus</i>	41
Figura 25.	Acidez total (g/L) con C1 y C2, previamente fermentado con <i>S. cerevisiae</i>	41
Figura 26.	Cambio en el pH del medio con C1 y C2, previamente fermentado con <i>K. marxianus</i>	42
Figura 27.	Cambio en el pH del medio con C1 y C2, previamente fermentado con <i>S. cerevisiae</i>	43
Figura 28.	Porcentaje de preferencia del macho <i>D. sukuzii</i> en olfatómetro de tubo “Y”	44
Figura 29.	Porcentaje de preferencia de la hembra <i>D. sukuzii</i> en olfatómetro de tubo “Y”.	45
Figura 30.	Porcentaje de preferencia del macho entre el fermentado alcohólico con <i>K. marxianus</i> y el resto de los tratamientos.	46
Figura 31.	Porcentaje de preferencia de la hembra entre el fermentado alcohólico con <i>K. marxianus</i> y el resto de los tratamientos.	47
Figura 32.	Porcentaje de preferencia del macho entre el fermentado alcohólico con <i>S. cerevisiae</i> y el resto de los tratamientos..	48
Figura 33.	Porcentaje de preferencia de la hembra entre el fermentado alcohólico con <i>S. cerevisiae</i> y el resto de los tratamientos..	49
Figura 34.	Porcentaje de preferencia del macho entre el fermentado acético de C1, previamente fermentado con <i>K. marxianus</i> y el resto de los tratamientos.....	50
Figura 35.	Porcentaje de preferencia de la hembra entre el fermentado acético de C1, previamente fermentado con <i>K. marxianus</i> y el resto de los tratamientos..	51
Figura 36.	Porcentaje de preferencia del macho entre el fermentado acético de C1, previamente fermentado con <i>S. cerevisiae</i> y el resto de los tratamientos.	52
Figura 37.	Porcentaje de preferencia de la hembra entre el fermentado acético de C1, previamente fermentado con <i>S. cerevisiae</i> y el resto de los tratamientos.	52

Figura 38. Porcentaje de preferencia del macho entre el fermentado acético de C1 y la adición de C2, previamente fermentado con <i>K. marxianus</i> y el resto de los tratamientos.....	54
Figura 39. Porcentaje de preferencia de la hembra entre el fermentado acético de C1 y la adición de C2, previamente fermentado con <i>K. marxianus</i> y el resto de los tratamientos.....	54
Figura 40. Porcentaje de preferencia del macho entre el fermentado acético de C1 y la adición de C2, previamente fermentado con <i>S. cerevisiae</i> y el resto de los tratamientos.....	55
Figura 41. Porcentaje de preferencia de la hembra entre el fermentado acético de C1 y la adición de C2, previamente fermentado con <i>S. cerevisiae</i> y el resto de los tratamientos.....	56
Figura 42. Porcentaje de preferencia del macho entre el vinagre de manzana y el resto de los tratamientos..	57
Figura 43. Porcentaje de preferencia de la hembra entre el viangre de manzana y el resto de los tratamientos.....	58
Figura 44. Capturas (porcentaje agrupado) en ensayo de semi-campo.....	59
Figura 45. Captura promedio de <i>D. sukuzii</i> en ensayo de múltiple elección en semi-campo.....	60
Figura 46. Ordenación de fermentados por su identidad química..	62
Figura 47. Mapa de calor de la concentración molecular de los fermentados. ...	63
Figura 48. Cromatograma del jugo de zarzamora.....	64
Figura 49. Cromatograma del fermentado alcohólico, acético con C1 y acético con C1 y C2 provenientes de <i>K. marxianus</i>	65
Figura 50. Cromatograma del fermentado alcohólico, acético con C1 y acético con C1 y C2 provenientes de <i>S. cerevisiae</i>	66
Figura 51. Análisis de componentes principales.....	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Compuestos activos antenales (EAD) en <i>Drosophila suzukii</i>	15
Tabla 2. Compuestos orgánicos volátiles de la zarzamora variedad Tupy.....	18
Tabla 3. Captura en campo de <i>D. suzukii</i> usando componentes individuales y mezcla de ácido acético con etanol y vino tinto con vinagre de manzana.	21
Tabla 4. Nomenclatura empleada para la identificación de tratamientos fermentados.	26
Tabla 5. Turbidez en C1 y C2 en GYE líquido con diferentes concentraciones de etanol.....	33

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Lista completa de compuestos activos antenales (EAD) en <i>Drosophila suzukii</i>	82
Anexo 2. Lista completa de compuestos orgánicos volátiles de la zarzamora.....	84

RESÚMEN

Drosophila suzukii es un díptero holometábolo que se considera una plaga exótica en México debido a que daña a las frutillas que se encuentran en un estado de madurez fenológica apta para su distribución y consumo. El Servicio Nacional de Sanidad e Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) propuso como estrategia para el control y monitoreo el uso de trampas con vinagre de manzana como líquido atrayente, sin embargo, por si sólo demuestra ser un atrayente de poca eficiencia debido a que la presencia de la mosca persiste.

En este trabajo, se exploraron atrayentes alternativos en un sistema *in vitro* mediante la elaboración de fermentados alcohólicos de zarzamora con las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces marxianus* y adicionalmente, sus correspondientes fermentaciones acéticas, para lo cual se aisló a la bacteria C1 de un vinagre casero; así mismo, se evaluó el efecto de la bacteria C2 en los fermentados acéticos (bacteria aislada del mismo vinagre que C1, pero no lleva a cabo fermentación acética).

La hembra tuvo una preferencia del 66% ($G=11.157$, $df=1$, $p=0.00083$) por el fermentado acético con C1 y C2 con la levadura *K. marxianus* (Km+C1+C2) en confrontación con el vinagre de manzana. El macho, por otro lado, tuvo una preferencia del 83% ($G=49.41$, $df=1$, $p<0.0001$) por el fermentado alcohólico con *K. marxianus* y por el fermentado acético con C1 proveniente del alcohólico con *K. marxianus* en relación al vinagre de manzana que solo logró un 16% de preferencia, sin embargo, en el ensayo en semi-campo se revela que el tratamiento acético con C1 proveniente del alcohólico con *K. marxianus* logra tener significancia estadística ($p=0.0071$). Mediante la correlacionaron entre el análisis de volátiles y la respuesta comportamental por olfatometría de tubo en "Y", se determinó que algunas moléculas como β -damascenona y ácido enántico pudieran estar implicadas en la respuesta de la hembra, mientras que el caprilato de isoamil y 3-octanona en la respuesta del macho.

Palabras clave: *Drosophila suzukii*, fermentación, olfatometría, volátiles, zarzamora.

ABSTRACT

Drosophila suzukii is a holometabolous diptera considered an exotic pest in Mexico because it damages berries that are in a phenological maturity state suitable for distribution and consumption. The Servicio Nacional de Sanidad e Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) proposed as a strategy for control and monitoring the use of traps with apple cider vinegar as a lure, however, by itself it proves to be a low-efficiency attractant because the presence of the fly persists.

In this work, alternative lures were explored in an *in vitro* system through alcoholic fermentations of blackberry with the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* and additionally, their corresponding acetic fermentations, for which the bacterium C1 was isolated from homemade vinegar; Likewise, the effect of C2 bacteria on acetic fermentations was evaluated (bacteria isolated from the same vinegar as C1, but it does not carry out acetic fermentation).

The female had a 66% of preference for acetic fermentation with C1 and C2 with the yeast *K. marxianus* (Km+C1+C2) in comparison with the apple cider vinegar. The male, on the other hand, had a percentage of preference of 83% for the alcoholic fermentation with *K. marxianus* and for the acetic fermentation with C1 from the alcoholic with *K. marxianus* in relation to apple cider vinegar that only reached a 16% of preference, however, in the semi-field test it is revealed that the acetic treatment with C1 from the alcoholic fermentation with *K. marxianus* achieves statistical significance under the conditions in which it was carried out. Through the correlation between the volatiles analysis and the behavioral response by "Y" tube olfactometry, it was determined that some molecules such as β -damascenone and enanthic acid could be involved in the female response meanwhile isoamyl caprylate and 3-octanone in the male response.

Keywords: *Drosophila suzukii*, fermentation, olfactometry, volatiles, blackberry.

I. INTRODUCCIÓN

El manejo integrado de plagas (MIP) se define como "el sistema de manejo de plagas, que en el contexto de la asociación del medio y la dinámica poblacional de las plagas, utiliza todas las técnicas y métodos adecuados de forma compatible, manteniendo las poblaciones nocivas a niveles por debajo de aquéllos causantes de daño económico". Es un concepto que la FAO utiliza desde los años 80s (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) y como tal, permite a los agricultores vigilar y controlar las plagas en sus campos, y reducir al mínimo absoluto la utilización de plaguicidas químicos costosos y potencialmente dañinos y peligrosos (FAO, 1998; Labrada & Parker, 1996). Además de las diferentes medidas de control de plagas, existen otras herramientas de monitoreo de densidad de población como el uso de trampas y atrayentes. Estas trampas son objetos físicos con geometrías y colores distintos en función del insecto objetivo, pero todas tienen en común que deben tener un atrayente, que por lo regular, se trata de un semioquímico (principalmente kairomona, con fines alimenticios; o feromonas, que pueden ser sexuales o de agregación) (Martinez, 2013). Estos atrayentes se emplean en forma líquida junto a una solución de ahogamiento, que consiste en una mezcla de agua y jabón, o mediante un septo de caucho de liberación prolongada el cual se impregna con una feromona y junto a él, una solución de ahogamiento. La trampa atrae al insecto y eventualmente cae en la solución de ahogamiento en donde muere. Con ello, el agricultor o el responsable técnico del cultivo determina la presencia de una determinada plaga, su densidad de población o también es una estrategia de control de plagas al realizar trampeo masivo (DGSV, 2014).

El estudio de los insectos (principalmente aquellos que se consideran plagas) y su respuesta comportamental frente a estímulos químicos o visuales, se llama ecología química de insectos. A través de diferentes técnicas de ecología química, se desarrollan una gran cantidad de atrayentes y repelentes que se emplean hoy en día como "cebos" para el trampeo de plagas agrícolas. Estas moléculas son elaboradas sintéticamente o pueden provenir de la naturaleza, mediante procesos

biotecnológicos de extracción de metabolitos secundarios vegetales o como subproductos del metabolismo microbiano. Además, es posible descartar aquellas moléculas que no tienen efecto sobre el insecto de estudio y generar una base de datos con dicha información que permita al investigador ahorrar recursos (Caridad, 2019).

Las interacciones multitróficas entre el insecto, la planta y el microorganismo parecen tener un rol preponderante en el estudio de la ecología química, ya que a través de esta es posible recrear escenarios y comprender la etología que rige al insecto en su toma de decisiones y la comunicación que se da entre los sistemas vegetales que lo involucran. Por ejemplo, Hernández et al., (2019) encontraron que *Tamarixia triozae* identifica plantas de chile y jitomate que fueron dañadas con anterioridad por *Bactericera cockerelli* mediante la emisión de volátiles por herbivoría. Otro ejemplo de estas interacciones se lleva a cabo al cambiar la concentración de antocianinas en *Arabidopsis thaliana* mientras detecta estímulos acústicos por herbivoría (Kollasch et al., 2020). Hay levaduras y bacterias que se encuentran asociadas a *Drosophila suzukii* y a frutos atacados por ésta mosca, algunos de esos microorganismos son las levaduras *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia kluyveri*, *Pichia terricola*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Saccharomyces cerevisiae* y las bacterias *Curtobacterium sp.*, *Gluconobacter cerinus* y *Gluconobacter oxydans* (Bueno et al., 2019; Scheidler et al., 2015), estas asociaciones son mediadas por la emisión de volátiles donde el beneficio para *D. suzukii* es por alimentación y ubicación de hospederos para oviposición, mientras que, el beneficio para los microorganismos se asocia a su dispersión al utilizar a la mosca como vector. Por otro lado, la planta no obtiene ningún beneficio en este escenario, sin embargo, al detectar un posible ataque por herbívora emite volátiles específicos de defensa, así como de comunicación con plantas adyacentes (Holopainen & Blande, 2012; Scheidler et al., 2015).

En este trabajo se llevan a cabo fermentaciones alcohólicas del jugo de zarzamora con las levaduras *Kluyveromyces marxianus* y *Saccharomyces cerevisiae*, así

como fermentaciones acéticas con bacterias aisladas de un vinagre casero con el objetivo de evaluarlos como atrayentes de *D. suzukii*.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Zarzamora

La zarzamora es uno de los cuatro cultivos que comercialmente integran el grupo de las “berries” o frutillas. Entre ellos, se encuentran la fresa (strawberry), el arándano (blueberry), la frambuesa (raspberry) y la zarzamora (blackberry), que se caracterizan por su alto valor nutritivo y comercial (Rivas, 2016); esas características se deben principalmente a la presencia de sus pigmentos naturales, como las antocianinas y otros compuestos fenólicos. Las frutillas por naturaleza son una fuente abundante de antioxidantes, que interactúan con moléculas inestables (como los radicales libres) cediéndoles un protón y de esa forma disminuir el daño por estrés oxidativo (Del Bo’ et al., 2015; Skrovankova et al., 2015). Debido a eso, la zarzamora y demás frutillas son consideradas alimentos funcionales y ahí radica su importancia en la alimentación humana y su éxito en el mercado internacional (Skrovankova et al., 2015).

En México se tienen variedades como Cherokee, Comanche, Cheyene, Shawnee, Choctaw y Brazos, originarias del programa de mejoramiento genético de la Universidad de Arkansas en E.U.A. Sin embargo, en Michoacán actualmente más del 90% de la producción es de la variedad Tupy originada en Brasil. En los últimos años, la demanda de los mercados favoreció a Tupy por lo que sustituyó a Brazos de manera rápida debido a mayores atributos de firmeza que le da una mejor calidad de fruto, básicamente en cuanto a vida poscosecha, lo que la hace más atractiva para exportación (Zavala, 2006).

La zarzamora se ubica como uno de los productos con mayor potencial en el sector agrícola mexicano. Con una producción de 270,399 toneladas en el 2017, México se posicionó en el primer lugar como productor mundial de esta frutilla (SIAP, 2018). Michoacán aportó el 97.7% de la producción nacional de zarzamora,

con un valor de 10 mil 310 millones de pesos. Se estima que la producción de zarzamora aumentará en los próximos años, así como en el 2016 y 2017 que superó la producción estimada (Figura 1) debido a la gran demanda de esas frutillas (SIAP, 2018).

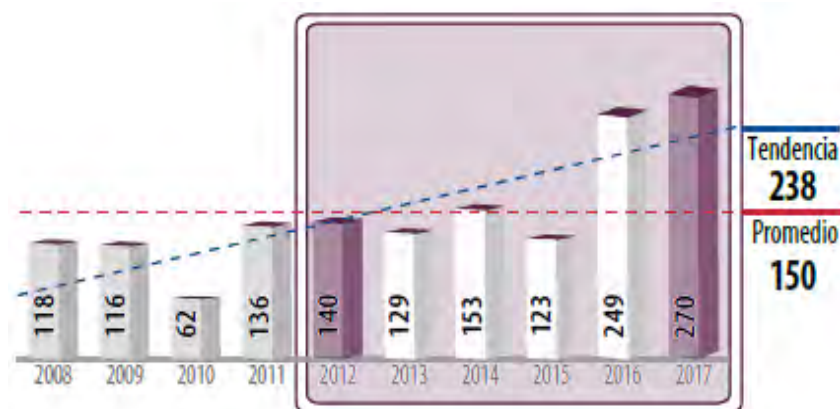


Figura 1. Producción nacional (miles de toneladas) 2012-2017. Tomada de SIAP, (2018).

Las importaciones mundiales aumentaron en 117.86% en la última década, en este mismo sentido, se incrementaron las exportaciones mexicanas (hasta 31 países), principalmente con destino a Estados Unidos, Canadá y Países Bajos (SAGARPA, 2017).

La zarzamora, es un cultivo susceptible al ataque por plagas y enfermedades. La FAO (2016) define el término *plaga* como “cualquier especie, raza o biotipo vegetal o animal o agente patógeno dañino para las plantas o productos vegetales” en el contexto en el que la plaga afecta a los intereses del hombre en la agricultura, principalmente.

Algunos de los principales insectos plaga del cultivo son: la “araña de dos puntos” *Tetranychus urticae*, el “trips” *Frankliniella occidentalis*, diferentes especies de coleópteros, entre los que destaca el “mayate calabacero” *Euphoria basalis* (Nájera et al., 2012) y recientemente, algunos dípteros como “la mosca del vinagre” *Drosophila suzukii* (Walsh et al., 2011). Estas plagas afectan la rentabilidad de la producción, principalmente si la frutilla tiene destino para comercializarse como producto fresco y para el mercado de exportación. Es

ligeramente menos relevante su presencia para producto congelado y producto que se categoriza como “fruta de proceso”, el cual puede ser sometida a algún tratamiento de transformación tecnológica para lograr su comercialización en una presentación con mayor vida de anaquel.

2.2. *Drosophila suzukii* Matsumura (Díptera: Drosophilidae)

Drosophila suzukii es comúnmente conocida como mosca del vinagre, mosca de alas manchadas o Spotted Wings Drosophila (SWD, por sus siglas en inglés), es un díptero holometábolo o de metamorfosis completa, esto quiere decir que pasa por todos los estados de desarrollo a lo largo de su ciclo biológico: huevo, larva, pupa y adulto (E. Loera, comunicación personal, 2019). Su ciclo de vida es de poco más de 30 días en total. La etapa de huevo tiene una duración de 12 a 72 horas, posteriormente se desarrolla una larva que pasa por tres estadios larvarios que van de 5 a 7 días en total, acto seguido da lugar a una pupa, con una duración de 4 a 5 días y finalmente, emerge el adulto que puede vivir entre 20 y 30 días (SAGARPA, 2016). Es importante remarcar que los factores ambientales como la temperatura y la humedad relativa pueden acelerar o retardar este ciclo biológico, los escenarios más favorables para su desarrollo se encuentran en un intervalo de 20 a 28 °C y HR de 50 a 70 % (Winkler et al., 2020).

D. suzukii es una plaga endémica del sudeste asiático. Descrita por primera vez en 1931 en cultivos de cerezas (Revadi et al., 2015). La presencia de esta mosca se reportó en el continente europeo alrededor del año 2008, posteriormente en Norte América en el 2012. Específicamente en México se detectó su presencia en el municipio de Los Reyes, Michoacán (una de las regiones con gran relevancia para la producción de frutillas) y posteriormente se reportó su presencia en América del Sur. Actualmente, se encuentra distribuida en los cinco continentes y en más de 50 países (Figura 2), incluso, el reporte más reciente de su presencia fue en Jerusalén, Israel en agosto del 2019 (EPPO, 2020) esto indica que es una plaga bastante dinámica y que presenta una gran plasticidad en cuanto a las condiciones ambientales que puede llegar a soportar, lo que probablemente facilitó su establecimiento mundial.

D. suzukii es considerada una plaga exótica en nuestro país y según reportes de la European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO, por sus siglas en inglés) es polífaga, ya que ataca a una amplia gama de cultivos frutales, como fresas, frambuesas, cerezas, arándanos, zarzamoras y uvas como hospedantes de riesgo alto. Aunque, también tiene hospedantes de riesgo medio como lo son duraznos, manzanas, peras, ciruelas y chabacanos (SAG, 2017; SAGARPA, 2016).

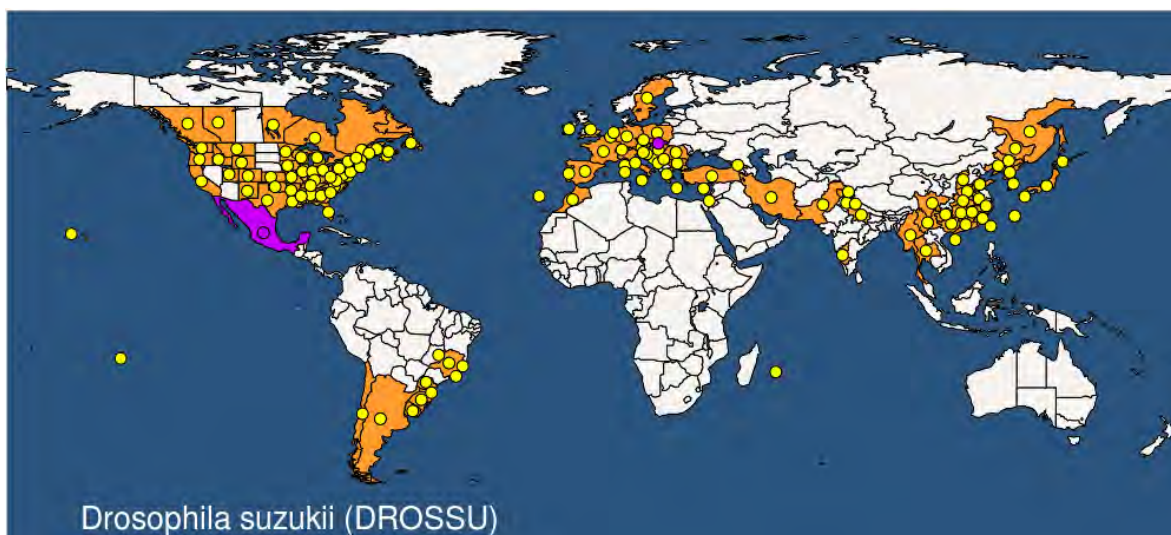


Figura 2. Distribución geográfica de *D. suzukii*. Tomado de EPPO, 2020.

Algunas de las características morfológicas de *D. suzukii*, son los característicos ojos rojos y tórax marrón pálido o marrón amarillento, y bandas transversales negras en el abdomen y en particular su dimorfismo sexual evidente. El macho tiene una mancha oscura entre la primera y segunda vena de las alas, lo cual es un distintivo peculiar (Figura 3a). Las patas delanteras del macho tienen uno o más peines con tres a seis dientes paralelos a la longitud de la pata, el tamaño del macho suele ser de 2-3 mm de longitud, mientras que el de la hembra es de 3-4 mm (DGSV, 2016). Las hembras de esta especie poseen un ovipositor esclerotizado o con forma de sierra, (Figura 3b) con el que ovipositan en fruta sana que se encuentra en estado de maduración comercial y que preferentemente poseen epicarpio suave y delgado y eventualmente realizan una perforación en ellos. Sus larvas se desarrollan y se alimentan del endocarpio de la fruta, lo cual

provoca que ésta pierda su valor comercial (SAG, 2017), una vez que la frutilla se encuentra dañada por oviposición y por la emergencia de la larva al alimentarse de ella, ésta queda expuesta a microorganismos que provocan daños subsecuentes causados por hongos y bacterias que contribuyen a un mayor deterioro del fruto. Las levaduras responsables de la fermentación en este proceso de deterioro del fruto, atraen a otros Drosophilidae, como por ejemplo, *Drosophila melanogaster* y *Zaprionus indianus*, que ovipositan solamente en frutos con daño previo (Funes et al., 2018). *D. suzukii* es pieza clave para la generación de daños directos e indirectos, además, otra característica relevante para esta especie consiste en que las hembras llegan a ovipositar desde 100 hasta 300 huevos durante toda su vida (SAGARPA, 2016). Debido a esto, *D. suzukii* es considerada una potencial amenaza económica en los cultivos de frutillas. Algunos de los daños directos que provoca sobre la frutilla como cereza, arándano y zarzamora se muestran en la Figura 4, donde es posible apreciar perforaciones por oviposición, huevecillos, fruta sin firmeza y pupas (Funes et al., 2018).



Figura 3. Dimorfismo de *Drosophila suzukii*. a) macho (izquierda) y hembra (derecha). Fotografía de McEvey, 2017. b) Ovipositor de la hembra visto en estereoscopio.

La presencia de esta mosca afecta a la industria de la fruta fresca al causar pérdidas económicas tanto en el mercado local, como de exportación y también puede implicar restricciones fitosanitarias en el envío de fruta fresca a países sin la plaga, lo que aumenta los costos de exportación y disminuye la oportunidad de comercio en los distintos mercados (SAG, 2017). Esta plaga se convirtió en una

sería amenaza para los cultivos de frutas a nivel mundial. Walsh et al., (2011) consideran como base de cálculo una pérdida del rendimiento del 20% en fresa, zarzamora, frambuesa, cereza y arándanos sobre la producción del 2008 en Óregon, Washington y California con datos oficiales de la USDA y estiman que la pérdida económica potencial es de 511 millones de dólares anuales. Además, en Europa se incurre a gastos adicionales debido a esta plaga que podrían superar los 70,000 dólares/ha, al considerar horas extra laborales, costos extra por transporte, clasificación, disposición y por cosechas de alta calidad pero de la cual no se obtienen ingresos (Mazzi et al., 2017).



Figura 4. Daños provocados por *D. suzukii* en cereza, arándano y zarzamora.

Para entender los elementos que contribuyen a la atracción de *D. suzukii* por este tipo de frutillas, es necesario apoyarse de herramientas como la ecología química

y así establecer nuevas estrategias de control y monitoreo de plagas. Algunas de estas herramientas se detallan a continuación.

2.3. Técnicas de investigación en ecología química de insectos

Los insectos tienen órganos sensoriales que les permiten interactuar con su entorno, estos órganos reciben sus nombres de acuerdo con el estímulo al cual son sometidos, se distinguen tres tipos: quimiorreceptores, mecanorreceptores y fotorreceptores. Los quimiorreceptores son aquellos que responden a un estímulo olfativo o gustativo, es decir, a moléculas gaseosas que se encuentran en el aire o moléculas de líquidos y sólidos y que van a determinar si el insecto se encuentra atraído (ya sea por alimentación o agregación) o sin efecto alguno. Así, los machos detectan las feromonas emitidas por las hembras para localizarlas. De igual forma, las hembras se guían por aromas para determinar dónde depositarán sus huevos. Estos receptores se encuentran en las sensillas o sénsulos (unidad básica neuronal en insectos) principalmente de las antenas y en los palpos maxilares. De esta manera las señales olfativas tienen importancia como moduladores del comportamiento de los insectos (Rojas et al., 2012).

Los mecanorreceptores, se asocian a la percepción de las superficies como la firmeza (por ejemplo, para la elección de un fruto hospedero para oviposición por parte de *D. sukikii*) o incluso en la detección de vibraciones y estos se encuentran en los pelos de las patas de los insectos (Karageorgi et al., 2017). Por último, los fotorreceptores se encuentran en los ojos simples y compuestos de los insectos y estos responden a cambios en la radiación electromagnética de su entorno, lo cual coadyuva con su fotoperiodo e indirectamente a que tengan momentos durante el día de alta actividad, incluso la mayoría de Drosophilidae presenta fototaxia positiva y son atraídos por unos cuantos colores, lo cual es un comportamiento que, *a priori* puede resultar útil para el desarrollo de estrategias innovadoras de control de plagas.

De acuerdo con el nivel de profundidad de estudio, se puede hacer una distinción entre las técnicas electrofisiológicas de las comportamentales; las primeras involucran a una neurona o el conjunto de neuronas en una antena, las cuales

pueden o no responder a una molécula en particular y generar una diferencia de potencial eléctrico, lo cual es perfectamente cuantificable. El inconveniente radica en que estos registros de actividad antenal no arrojan información sobre la preferencia o repulsión, se trata entonces, sólo de una señal eléctrica la cual debe ser interpretada según el contexto de la investigación. Es considerada, por lo tanto, una técnica complementaria a las comportamentales, las cuales no usan una parte del insecto, usan al insecto entero y la respuesta evaluada es la elección o la no elección hacia una molécula o grupo de moléculas (Rojas et al., 2012).

2.3.1. Técnicas electrofisiológicas

La electroantenografía (EAG) es una técnica desarrollada a finales de los 50's que consiste en el registro de la diferencia de potencial entre un electrodo de registro (el cual se coloca en la parte distal de la antena) y el electrodo indiferente, en la base de la antena. El EAG es la suma de potenciales de los receptores olfativos presentes a lo largo de la antena ante compuestos que pueden ser biológicamente relevantes para el insecto de estudio, se obtiene una señal de despolarización de la membrana lo que revela si un compuesto es o no importante para el insecto. Para los años 70's, se logró acoplar un GC a un EAG y funcionar éste último como un segundo detector. A este sistema (Figura 5) se le conoce como Cromatógrafo de Gases Acoplado a un Electroantenodetector (GC-EAD) y la principal ventaja que ofrece este equipo es que discrimina selectivamente aquellas señales del extracto o muestra que no tienen actividad antenal, lo que facilita la selección de moléculas candidatas a ser evaluadas en ensayos comportamentales y de campo (olfatometría). Un paso posterior es la identificación química de aquellos picos cromatográficos, se puede realizar mediante espectrometría de masas, con ayuda de una base de datos o mediante el cálculo del índice de Kovats (Rojas et al., 2012).

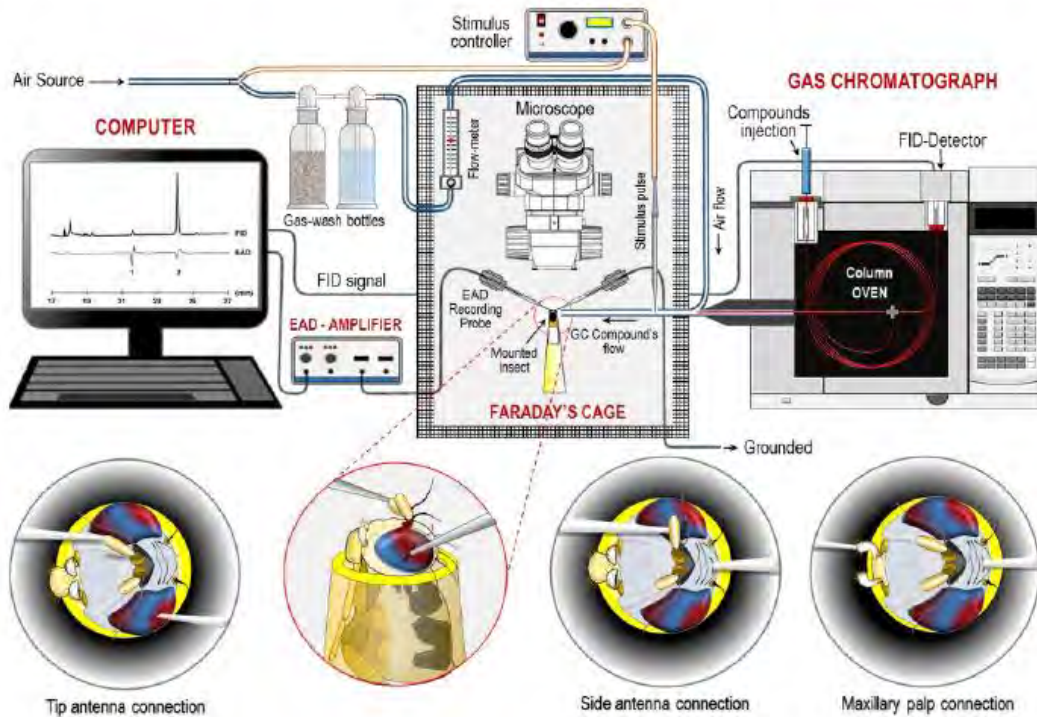


Figura 5. Esquema del montaje del insecto para electroantenodetección acoplado a cromatografía de gases (GC-EAD) en moscas de la fruta tephritid. Los primeros planos muestran la mosca montada con la cabeza extruida fuera de la punta de una pipeta, y el detalle de conexión hecho para la punta de la antena, la antena lateral (EAD) y el palpo maxilar (EPD). Tomado de Figueroa, 2019.

2.3.2. Técnicas comportamentales

Éstos ensayos pueden categorizarse en aquellos de elección (en los que se evalúan simultáneamente dos o más tratamientos) o de no elección (donde sólo se evalúa un tratamiento por vez). El túnel de viento consiste en una cámara rectangular o cilíndrica en la cual se coloca al insecto en un extremo y el tratamiento o fuente de aroma en el otro extremo. Debe existir una corriente de aire la cual cumple con la función de arrastrar los volátiles en dirección al insecto, de tal forma, que éste vuele a contraflujo y elija o no el tratamiento. Se llaman de no elección debido a que el insecto sólo tiene una fuente de aroma durante el ensayo. La variable de respuesta puede ser interpretada como atracción o no atracción (importante hacer distinción entre atracción y preferencia), a menos que

se evalúen dos tratamientos en el túnel simultáneamente, en este caso, sería de doble elección y se puede evaluar la preferencia.

Otro tipo de sistemas que se categorizan como de elección pueden subcategorizarse según el número de tratamientos que se evalúan simultáneamente o si éstos son cuentan con un flujo de aire o no. Algunos de los más comunes son de dos vías, cuatro vías o múltiple elección (Hernández, 2019).

El olfatómetro de tubo de “Y” (dos vías) consiste en un dispositivo en forma de resortera donde en cada uno de los brazos laterales se coloca una fuente de aroma y en el brazo principal al insecto. El aire se introduce a cada brazo lateral con flujo laminar (para evitar turbulencia y mezcla de los volátiles de ambos brazos). La cual arrastra los volátiles hacia el insecto, lo cual provoca que éste se desplace a contraflujo y tome una decisión. La respuesta se puede interpretar como preferencia al elegir a uno de los dos tratamientos que se evalúan simultáneamente (Hernández, 2019).

Para aquellos que son de múltiple elección, éste término hace referencia a que se pueden colocar más de tres tratamientos simultáneamente y el insecto ha de tomar una elección en función de aquél que le resulte más atractivo o de mayor preferencia. En la Figura 6 A-C se muestran algunos de ellos.

Este tipo de ensayos no son exclusivos de laboratorio, también se pueden realizar en condiciones de semi-campo; donde las fuentes de aroma y el sistema en general se encuentran expuestos a condiciones ambientales (en una jaula entomológica) lo más parecidas a su ambiente natural, es decir, el ensayo puede tener fuentes de variación externas como velocidad y dirección del viento, temperatura ambiental y posición del sol, precipitaciones y humedad relativa (Hernández, 2019).

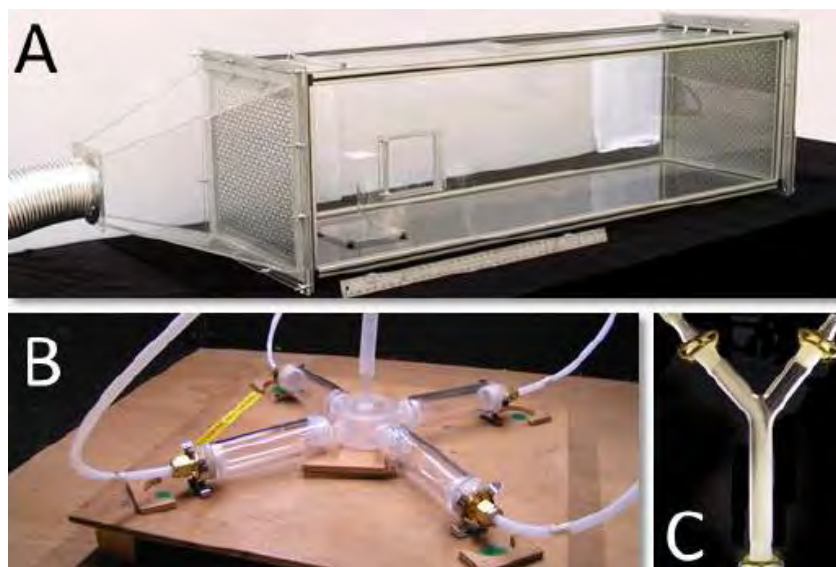


Figura 6. Instrumentos utilizados para evaluar la respuesta comportamental de insectos hacia volátiles. (A) Túnel de vuelo (Analytical Research Systems, Inc). (B) Olfatómetro de 4 vías. (C) Olfatómetro en “Y”. Tomada de Martínez, 2013.

Gracias al avance que la tecnología tiene, existen técnicas que ayudan a entender cómo se llevan a cabo estos procesos de reconocimiento por parte de los insectos ante moléculas volátiles y así, sintetizarlas para que puedan ser empleadas en beneficio del agricultor, como por ejemplo en el desarrollo de trampas selectivas y eficientes (Martinez, 2013).

En estudios sobre la respuesta electrofisiológica a los volátiles del vino Merlot y vinagre de manzana, se observó que algunos compuestos; ácido acético, etanol, acetoina, metionol y 2-feniletanol presentan respuesta, entre otros (Cha et al., 2012). Además, en estudios comportamentales de múltiple elección (Cha et al., 2018) se utilizó una mezcla de ácido acético y etanol como medio basal con la adición de una molécula con actividad antenal y se encontró que aquella mezcla que tenía acetoina o metionol logra tener mayor número de capturas de *D. sukii* en el bioensayo (Figura 7).

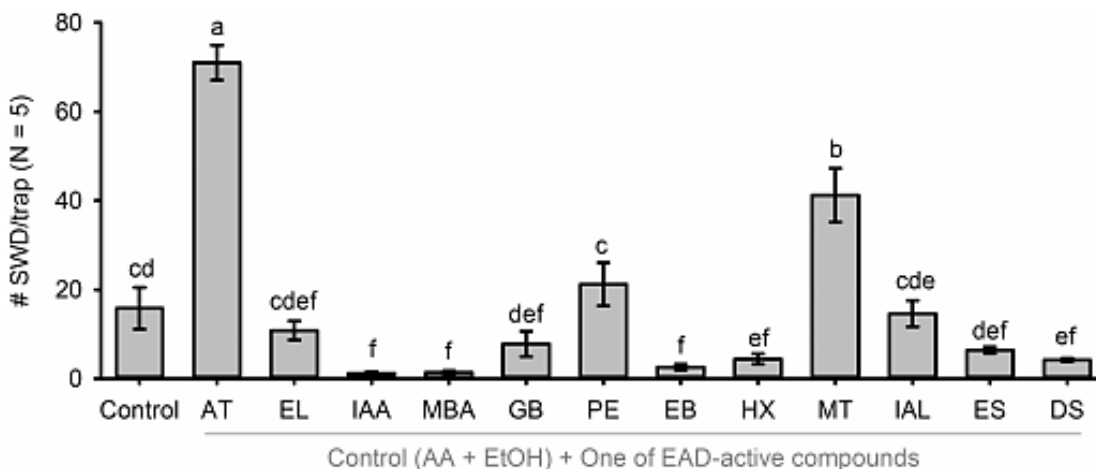


Figura 7. Evaluación de compuestos antenalmente activos de *Drosophila suzukii* en ensayo de múltiple elección. Control (mezcla de 1.6% ácido acético y 7.2% etanol; AA + EtOH) y 12 diferentes mezclas adicionales (AA+ EtOH + un compuesto antenal). AT: Acetoina, EL: Lactato de etilo, IAA: Acetato de isoamilo, MBA: Acetato 2-metilbutil, GB: 3-Hidroxibutirato de etilo, PE: 2-Feniletanol, EB: Butirato de etilo, HX: 1-Hexanol, MT: Metionol, IAL: Lactato de isoamilo, ES: Sorbato de etilo, DS: Dietil succinato. Las letras diferentes en las barras indican diferencias significativas en la prueba de Tukey-Kramer $p < 0.05$. Las pruebas estadísticas fueron basadas con los datos transformados de la raíz cuadrada. Se muestran las medias de los datos sin transformar. (Tomada de Cha et al., 2018).

2.4. Respuesta de *D. suzukii* ante volátiles de frutas y de fermentación

Revadi et al., (2015) en su trabajo sobre la respuesta electrofisiológica de la hembra *D. suzukii* ante 29 compuestos procedentes de frutillas como la fresa, zarzamora, arándano, cereza y frambuesa; determinaron que 20 compuestos provocaron una respuesta antenal clara y que los mismos pertenecen al grupo de los ésteres, alcoholes, monoterpenos, ácidos, aldehídos, cetonas, aromáticos, terpenoides irregulares y sesquiterpenos; los ésteres y alcoholes mostraron la mayor actividad.

Cloonan et al., (2018) realizaron un compendio bibliográfico sobre las moléculas antenalmente activas para *D. suzukii* provenientes de distintas fuentes. Por ejemplo, productos de fermentación, fuentes naturales como frutillas, follaje, entre otras y las agruparon por su naturaleza química. En la Tabla 1 se muestran algunas de ellas. En el Anexo 1 se muestra la lista completa.

Tabla 1. Compuestos activos antenales (EAD) en *Drosophila suzukii*.

Compuesto				
<u>Alcoholes</u>	<u>Ésteres</u>	<u>Ácidos</u>	<u>Aldehídos</u>	<u>Cetonas</u>
Etanol ^{1,2}	Acetato de etilo ^{1,2}	Ácido acético ^{1,2}	Benzaldehído ²	Acetoína ²
Hexanol ^{1,2,3}	Acetato de isoamilo ^{1,2}	Ác. 2-Metilpropanoico ²	Nonanal ¹	2-Propanona ²
Metionol ²	Butirato de etilo ²	Ác. 2-Metilbutanoico ²		
2-Feniletanol ²	Acetato de 2-Metilbutilo ²	Ác. 3-Metilbutanoico ²		
2-Propanol ²	3-Hidroxibutirato de etilo ²			
1-Octen-3-ol ^{1,4}	Hexanoato de etilo ¹			
Eugenol ⁴				

Nota. El número indica la fuente. 1 (fruta), 2 (producto de fermentación), 3 (extracto de fruta), 4 (follaje de fruta). (Tomado y modificado de Cloonan et al., 2018).

De la lista completa, se observa que son 60 compuestos reportados como antenalmente activos en *D. suzukii*. En orden de abundancia el 35% corresponde a ésteres, 28% alcoholes, 8% ácidos, 8% monoterpenos, 6% aldehídos, 5% cetonas, 3% norisoprenoides, 1% aromáticos, 1% isoprenoides y 1% sesquiterpenos.

Además, éste mismo autor menciona que el estado sexual de la hembra afecta en el comportamiento que tiene sobre la preferencia ante los volátiles de fruta fresca o en estado de descomposición. Si la hembra aún es virgen, buscará una fuente de alimentación que está mediada por los aromas característicos a fermentación de la fruta podrida y posiblemente encuentre machos para su reproducción, no obstante, cuando ya compuló entonces buscará el fruto fresco (atraída por aromas esteroides), con el objetivo de oviponer y que éstos puedan alimentarse y tener éxito al emerger. De la Figura 8 se pueden distinguir varios escenarios: a) Las moscas hembras emergidas buscan fruta podrida, b) para buscar fuentes de azúcar y proteína, c) probablemente usa volátiles de fermentación (i: etanol, ii: ácido acético, iii: acetoina, y iv: metionol) para localizar áreas que contienen fruta podrida. También puede ser que las moscas hembras usen los olores de las hojas (v: β -ciclocitral) para localizar áreas donde puedan estar las moscas macho, d) las hembras apareadas buscan fruta fresca intacta, e) para poner huevos, f)

probablemente utilizan un conjunto de olores de frutas y levadura (vi: trans-2-hexanal, vii: hexanol, viii: 3-metil-2-butenil-acetato, ix: 3-metil-2-butanona, x: 2-heptanona, xi: acetato de butilo, xii: acetato de isoamilo y xiii: acetato de isobutilo) para localizar tales frutas frescas intactas.

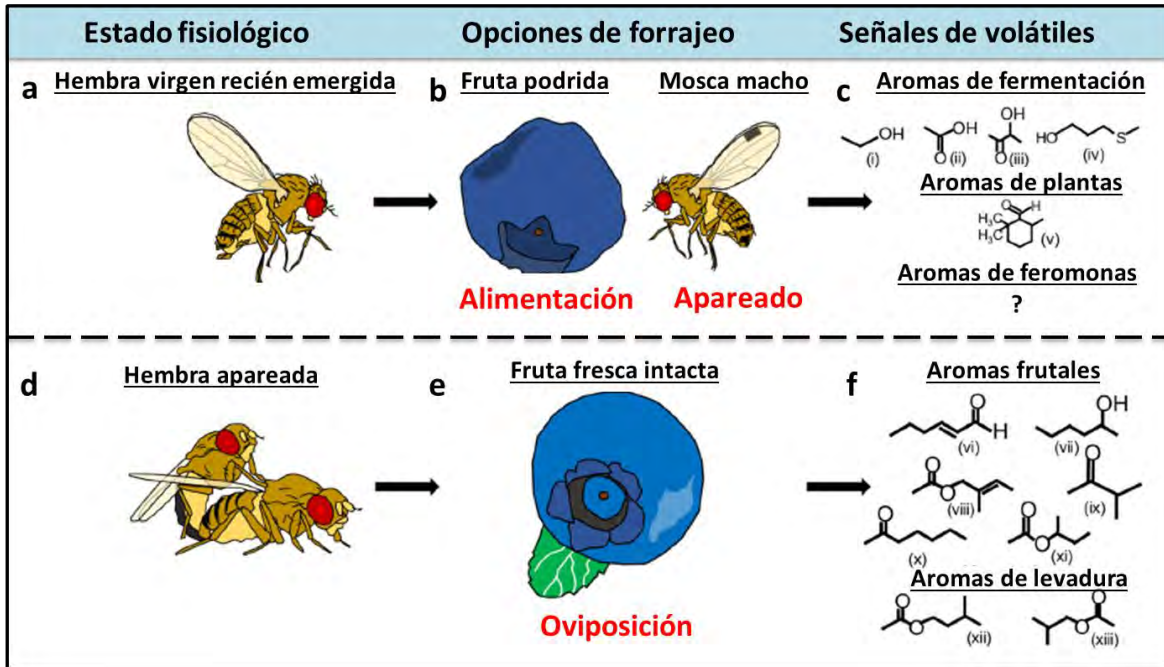


Figura 8. Representación gráfica de las diferentes opciones de alimentación y señales de olor utilizadas por la hembra *D. sukii*. (Tomado y modificado de Cloonan et al., 2018).

En este sentido, Karageorgi et al., (2017) encuentran relevante que en condiciones de laboratorio, *D. sukii* tiene un mayor índice de atracción (Figura 9) por los aromas de la fresa sobre madurada que por los de la fresa fresca (aunque no tanto como *D. melanogaster*), en contraste con los resultados del ensayo de oviposición, donde el índice de preferencia de oviposición fue mayor en fresa fresca que por la sobre madurada (datos sin mostrar). Esto refuerza la hipótesis de que el comportamiento de *D. sukii* en la elección de un hospedero es una función de las necesidades que tenga en el momento por alimentarse u oviponer.

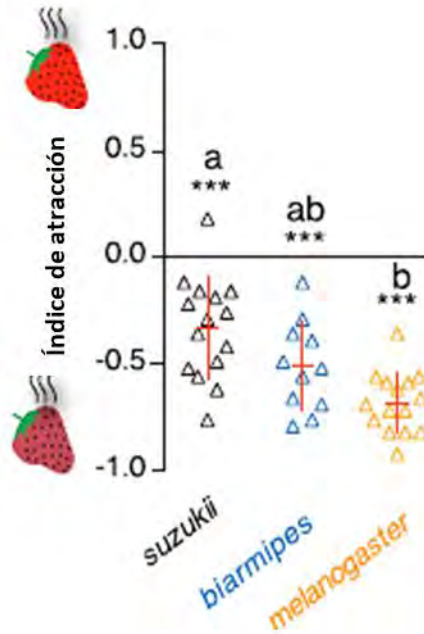


Figura 9. Índice de atracción por volátiles de la fresa fresca y sobre-madura en tres especies de *Drosophila*. Eje negativo corresponde a fresa sobre madurada y eje positivo a fresa fresca. La comparación se realiza entre *D. suzukii*, *Drosophila biarmipes* y *D. melanogaster*. (Tomado de Karageorgi et al., 2017).

Algunos de los compuestos volátiles que se encuentran de forma natural en frutillas (específicamente en zarzamora) son los que reportan Jacques et al., (2014) en un estudio de identificación de volátiles de la zarzamora variedad Tupy mediante Microextracción en Fase Sólida (SPME) y Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS) y llegaron a identificar 45 volátiles de los cuales el 75.38% son terpenoides, 4.35% hidrocarburos, 4.23% cetonas, 4.06 alcoholes, 0.76% ésteres y 0.53% aldehídos. En la Tabla 2 se muestran algunos de ellos, así como su clasificación y datos relevantes sobre su identificación. En el Anexo 2 se muestra la lista completa.

Tabla 2. Compuestos orgánicos volátiles de la zarzamora variedad Tupy. Compuestos extraídos por SPME. (Tomado y modificado de Jacques et al., 2014).

Pico	RT (min)	% área	Nombre	MW	S	Clasificación
11	2.81	2.05	Hexanal	100	91	Aldehído
12	3.45	1.52	2-Hexenal	98	97	Aldehído
13	3.65	4.55	Heptanal	114	98	Aldehído
14	3.98	0.17	2-Heptanona	114	98	Cetona
15	4.13	3.24	2-Heptanol	116	98	Alcohol
22	5.36	0.3	Benzaldehído	106	90	Aldehído
23	5.47	0.22	1-Heptanol	116	91	Alcohol
29	6.07	0.47	Hexanoato de etilo	144	98	Éster
30	6.16	0.22	Octanal	128	96	Aldehído
34	6.95	63.26	Limoneno	136	94	Terpenoide
39	7.83	0.6	1-Octanol	130	92	Alcohol
42	8.32	0.96	o-Cimeno	136	91	Terpenoide
44	8.58	0.79	Linalool	154	96	Terpenoide
45	8.66	0.47	Nonanal	142	95	Aldehído
55	10.45	0.36	Isoborneol	154	90	Terpenoide
57	10.73	1.12	Terpinen-4-ol	154	91	Terpenoide
59	10.96	1.13	p-Cimen-8-ol	150	93	Terpenoide
60	11.11	0.78	α -Terpineol	154	95	Terpenoide
61	11.24	0.76	Salicilato de metilo	152	96	Éster
72	12.82	0.37	Geraniol	154	95	Terpenoide
90	16.4	0.18	Damascenona	190	92	Cetona

Nota. MW = masa molecular; S = similitud con el espectro de masas; % Área = porcentaje de área relativo al área total de los picos.

2.5. Trampas y atrayentes

Una medida de monitoreo y control de plagas, es mediante el uso de trampas y atrayentes (DGSV, 2014). El sector agrario opta por el uso de trampas debido al bajo costo que representan y de acuerdo con el apego a las normatividades de agricultura orgánica en cualquier entidad geográfica, es una técnica dispensable

del uso de pesticidas, por lo que es seguro para cualquier cultivo (Terrile, 2010). Las trampas funcionan con atrayentes como el vinagre de manzana y vino de uvas, ya que *Drosophila spp.* se siente atraída por este tipo de aromas de fermentación (Landolt et al., 2012; Lee et al., 2012). Las especificaciones para el tipo de trampa más común y económica, consisten en utilizar un recipiente de plástico transparente de 1 L de capacidad, al cual se le realizan perforaciones de 3.5 a 5 mm de diámetro a lo largo del perímetro del recipiente, para que la mosca pueda ingresar. Se le colocan aproximadamente 200 mL de vinagre de manzana o el equivalente a 2 cm de altura del líquido y esta se coloca a un lado del área foliar del cultivo en cuestión (DGSV, 2014). Sin embargo, también existen en el mercado una gran variedad de trampas. En la Figura 10 se muestran algunas de ellas como la a) trampa deli-cup de plástico transparente de 20 oz. con cebo de vinagre de sidra de manzana con cobertura de malla roja en las dos aberturas laterales, b) una trampa de plástico transparente similar a la deli-cup que contiene vinagre de manzana y una tarjeta adhesiva para capturar moscas. c) Otra trampa casera, excepto que esta trampa utiliza un vaso rojo de 12 oz. trampa con numerosos agujeros alrededor de la tapa como puntos de entrada, d) trampa Pherocon (Trécé Inc.), e) trampa Drosal Pro (Andermatt Biocontrol), f) trampa ISCA (ISCA Technologies), g) Droso-Trap (Biobest Inc., Wésterlo, Bélgica) y h) Contech trap (Contech Enterprises Inc . Británica Columbia, Canadá) que también pueden ser de diferentes colores como amarillas, rojas, verdes, rojo con franjas negras, diferentes tamaños y formas como las trampas McPhail, Drosotrap, vasos o botellas pet, etc. y que pueden usar feromonas para la atracción o que usan un atrayente alimenticio a base de proteína hidrolizada, o el vinagre de manzana y una mezcla de levadura con azúcar para promover la producción de CO₂ (Lasa et al., 2017) y de esa manera generar una señal de atracción en *D. suzukii*.

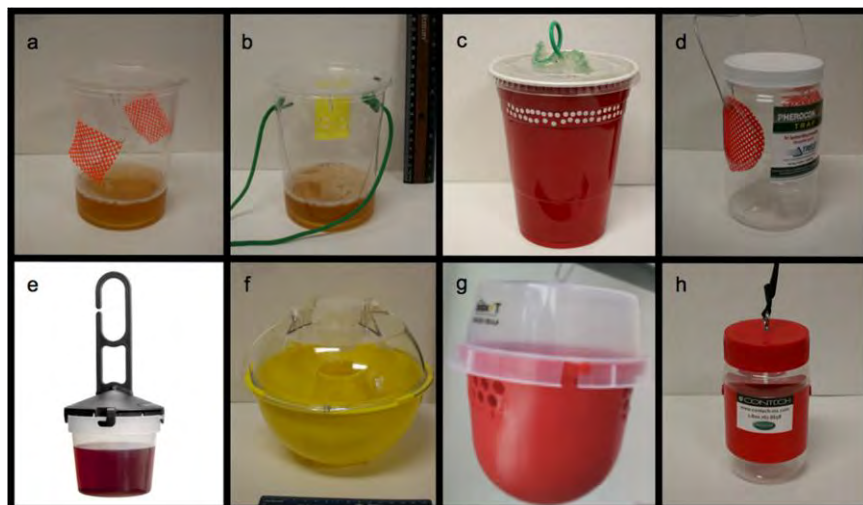


Figura 10. Trampas usadas para el monitoreo y control de *Drosophila suzukii*. (Tomado de Cloonan et al., 2018).

Los primeros estudios al inicio de la invasión de esta plaga en Estados Unidos y Europa, se realizaron con vinagre de manzana como cebo (Lee et al., 2012), razón por la cual se convirtió en el atrayente con más uso desde entonces, además de que es económico. México es un país que promueve el uso del vinagre de manzana de manera oficial para el monitoreo y captura de esta plaga en el “manual para el manejo fitosanitario de *D. suzukii*” del SENASICA.

A partir de la investigación de Cha et al., (2012), se desarrolló un atrayente sintético al combinar los volátiles reportados. Más del 50 % de las Drosophilidae capturadas por el atrayente sintético fueron *D. suzukii*, y dado que el vinagre de sidra de manzana que se usó como control capturó entre un 26-31 % de esta especie, es claro que el atrayente sintético resultó más selectivo (Burrack et al., 2015; Colomar, 2016). No obstante, en ensayos que se desarrollaron en campo se encontró que dicha mezcla sintética, era menos atractiva que los estándares utilizados (Colomar, 2016). Los productos comerciales de atrayentes y trampas existentes para el monitoreo de *D. suzukii* ofrecen un bajo nivel de selectividad (Burrack et al., 2015), por lo cual es necesario continuar el estudio de los atrayentes de *D. suzukii* para su adecuada detección en etapas tempranas.

Landolt et al., (2012) realizaron múltiples ensayos de trampeo en campo de *D. suzukii* y evaluaron la capacidad de atracción del etanol, ácido acético, una mezcla

de ambos, vino tinto, vinagre de sidra de manzana y una mezcla de ambos. Encontraron un efecto sinérgico con las combinaciones, en comparación con los compuestos individuales, esto indica que el éxito en la captura no es exclusivo de los compuestos mayoritarios en un atrayente, también influye la presencia y concentración de los compuestos minoritarios y desempeñan una función importante como atrayentes, en muchos casos se trata de subproductos de fermentación (Tabla 3).

Tabla 3. Captura en campo de *D. sukuii* usando componentes individuales y mezcla de ácido acético con etanol y vino tinto con vinagre de manzana.

	Machos	Hembras
Control	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.2
AA	16.2 ± 9.4	13.8 ± 7.5
ETH	0.8 ± 0.4	1.8 ± 0.9
AA + ETH	54.2 ± 11.3	42.2 ± 7.9
Control	2.4 ± 1.1	2.3 ± 1.1
Vinagre	1141.8 ± 598.2	906.5 ± 498.0
Vino	486.4 ± 195.2	401.8 ± 185.0
Vinagre + Vino	2120.3 ± 811.4	1319.3 ± 575.3

Nota. Medias (±EE). Número de machos y hembras capturados en trampas con 2 %AA (ácido acético) y 10 %ETH (Etanol) o una mezcla de ambos utilizados como solución de ahogamiento. N=6 (parte superior)
 Medias (±EE). Número de machos y hembras capturados en trampas con vinagre y vino o una mezcla de ambos utilizados como solución de ahogamiento. N=12 (parte inferior). El control no contenía ninguna de estas sustancias. (Tomado y modificado de Landolt et al., 2012).

III. JUSTIFICACIÓN

De acuerdo con el protocolo de manejo y diagnóstico de *D. suzukii* en los cultivos de frutillas, establecido por el SENASICA, se recomienda la utilización del vinagre de manzana como atrayente. Sin embargo, este presenta el inconveniente de tener una baja especificidad, capturando incluso insectos benéficos en las trampas que contienen este atrayente. Dada la relevancia económica que representa esta plaga y las tendencias actuales sobre el uso de compuestos que tengan un menor impacto en las poblaciones de insectos nativos, se tiene la necesidad de desarrollar nuevas alternativas que ofrezcan mayor eficiencia que los estándares actuales con base en diferentes estudios en *D. suzukii* en los cuales se reporta que moléculas provenientes de fermentación como etanol, acetoína, entre otras, tienen un efecto antenal claro sobre esta plaga. En el presente proyecto se propone utilizar zarzamora como medio basal para ser fermentado mediante levaduras y bacterias de la región de Michoacán y así lograr un nivel de captura más efectivo y selectivo en *D. suzukii* en comparación al vinagre de manzana, al mismo tiempo que se pretende aprovechar la zarzamora que se encuentra dañada como materia prima principal. De manera adicional, esto ofrecería mejorar las condiciones de sanidad en los cultivos.

IV. HIPÓTESIS

El jugo fermentado de zarzamora (*Rubus fruticosus*) var. Tupy tiene mayor capacidad de atracción de *D. suzukii* en comparación con el vinagre de manzana.

V. OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN

5.1. Objetivo general

Evaluar la capacidad de distintos fermentados de zarzamora para atraer a *D. suzukii*.

5.2. Objetivos específicos

- Realizar distintas fermentaciones del jugo de zarzamora.

- Evaluar la respuesta comportamental de hembras y machos de *D. suzukii* ante distintas fermentaciones del jugo de zarzamora en condiciones de laboratorio.
- Determinar la relación entre los compuestos volátiles y la respuesta comportamental de *D. suzukii*.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Material biológico

6.1.1. *Drosophila suzukii*

Para establecer el pie de cría de *D. suzukii* necesario para esta investigación, se recolectó fruta de zarzamora en agosto de 2019, en la localidad El Fresno perteneciente al municipio de Ziracuaretiro, Michoacán (19°24'31.9"N 101°55'17.5"O), de la cual se sospechaba tenía huevos de *D. suzukii* debido a que se encontraban en un estado de madurez fenológico para consumo y con algunas perforaciones (indicativo de oviposición). La frutilla fue colocada en frascos individuales, con una tela de organza en la boca del frasco y sujeta con una liga para permitir el intercambio de gases con el exterior. Los frascos se mantuvieron por 15 días a temperatura ambiente hasta que emergieron los adultos. Posteriormente, se realizó la identificación de la especie mediante inspección visual con estereoscopio al localizar el ovipositor característico de la hembra de *D. suzukii*, así como las manchas oscuras en las alas del macho. Los individuos que se identificaron plenamente se conservaron para iniciar la cría de *D. suzukii* y los que no correspondieron a la especie de interés se desecharon.

Las moscas se mantuvieron en frascos de vidrio dentro de una jaula entomológica en un cuarto a 24 °C con dieta artificial elaborada a base de 1 L de agua filtrada por ósmosis inversa, 84 g de harina de maíz nixtamalizado, 56 g de azúcar morena, 22 g de levadura de panificación, 6 g de agar bacteriológico, 2 mL de ácido propiónico y 2 mL de fluconazol a una concentración de 5 mg/mL. Se mezclan todos los ingredientes con excepción del fluconazol y ácido propiónico y

se afora a un litro de volumen en un frasco con tapa, posteriormente se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a 121 °C y una presión de 15 psi. Al retirar el frasco del autoclave se coloca cerca del mechero bunsen y se abre la tapa en condiciones estériles para adicionar el fluconazol y el ácido propiónico. Se mezcla y se reparte en frascos individuales limpios y estériles tapándolos con aluminio hasta que solidifique el alimento. Si los frascos no se usan en el momento, se pueden guardar bajo refrigeración para prolongar su vida útil.

6.1.2. Zarzamora

Para la elaboración de los jugos fermentados de zarzamora, se dispuso de fruta de “proceso”, lo que quiere decir que es aquella que no cumple con los estándares de calidad para ser comercializada en fresco y por lo tanto su destino es procesarla para su consumo en otra presentación, aunque en el peor de los casos puede llegar a considerarse un desecho para el productor. Es por eso que se eligió este tipo de fruta en este proyecto y poder aprovecharla. Se recolectó de la misma localidad de El Fresno perteneciente al municipio de Ziracuaretiro, Michoacán (19°24'31.9"N 101°55'17.5"O) y la variedad elegida fue Tupy debido a que es la más común en la zona.

6.1.3. Microorganismos fermentativos

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* fue proporcionada por el Laboratorio de Biología Sintética (IIQB, UMSNH) aislada de pulque (bebida alcohólica) del municipio de Tarímbaro, Michoacán. Mientras que la levadura *Kluyveromyces marxianus* fue proporcionada por el Laboratorio de Biotecnología Microbiana (IIQB, UMSNH) aislada de mosto de mezcal, proveniente del municipio de Etúcuaro, Michoacán.

Estas levaduras fueron mantenidas en medio YPD líquido (1% extracto de levadura, 2% peptona de caseína, 2% glucosa) hasta su utilización.

Además, se aislaron dos bacterias de un vinagre casero (con madre del vinagre) de la ciudad de Morelia, Michoacán y se incubaron a 25 °C en medio GYE sin etanol (2% glucosa, 1% extracto de levadura, 1.5% agar bacteriológico, 0% etanol, 0.5% ácido acético) hasta su utilización.

6.2. Métodos

6.2.1. Aislamiento de bacterias del vinagre y determinación de su capacidad fermentativa

Se prepararon placas de Petri con medio de cultivo GYE sin etanol y se inoculó 1 mL de vinagre casero, previa dilución en relación 1:1000. Después de 48 horas a 25 °C en incubación, se apreciaron dos morfologías coloniales distintas (nombradas C1 y C2 a partir de ahora), ambas fueron resembradas por estriado en GYE para obtener el cultivo puro.

Se tomó una asada de cada colonia y se suspendieron en 20 mL de medio GYE sin etanol. Se dejaron en incubación a 29 ± 2 °C por 24 horas a 85 rpm. Al día siguiente se tomó una alícuota y se midió su densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro photoLab® 6600 UV-VIS y se realizaron las diluciones correspondientes para ajustar a un valor de 0.6 de densidad óptica y así inocularlas en tubos de ensayo con GYE líquido a distintas concentraciones de etanol (0%, 4%, 8%, 10% y 20% v/v) a 20 °C durante 72 horas con el objetivo de determinar la concentración óptima de etanol como sustrato. Se tomaron lecturas de densidad óptica cada 24 horas y acidez total por titulación volumétrica con NaOH 0.5 N, de acuerdo al método 930.35J de la AOAC International, (1990).

6.2.2. Jugo de zarzamora

Para la obtención del jugo de zarzamora, se pesaron 3 Kg de frutilla y se lavaron con agua corriente superficialmente para eliminar residuos de tierra y hojas. Se colocaron en una licuadora convencional para realizar la molienda y debido a que el jugo tenía una consistencia muy espesa (principalmente por las semillas y el epicarpio) el volumen final de jugo de zarzamora se diluyó con agua hasta un 50% del volumen y se realizó una filtración con colador de acero inoxidable de 2 mm de apertura de malla. El jugo se mezcló adecuadamente y se tomó lectura de sólidos solubles en °Brix para determinar la concentración de azúcares. Se colocaron 150 mL de jugo en matraces Erlenmeyer de 250 mL y se esterilizaron en autoclave durante 15 minutos a 121 °C y 15 psi.

6.2.3. Pre-inóculo

Se activaron las levaduras *K. marxianus* y *S. cerevisiae* en 50 mL de YPD líquido durante 48 horas a 20 °C y las bacterias C1 y C2 en 50 mL de GYE líquido por 48 horas a 30 °C. Posteriormente se tomó lectura de densidad óptica a 600 nm en el espectrofotómetro y el blanco fue YPD y GYE sin inocular, respectivamente. Se realizaron las diluciones correspondientes para ajustar el inóculo en un intervalo entre 0.677 - 0.685. El volumen que se inoculó al jugo de zarzamora fue en relación 1:100.

6.2.4. Fermentación de la zarzamora

Se midieron los sólidos solubles cada 24 horas con el refractómetro portátil CVQ-4012, desde un tiempo cero hasta 96 horas (tiempo donde se vuelve constante la curva de consumo de azúcares) para los tratamientos con las levaduras *K. marxianus* y *S. cerevisiae*. La fermentaciones alcohólicas del jugo de zarzamora se llevaron a cabo durante 4 días a 20 °C y 80 rpm. Posteriormente se inoculó la bacteria C1 en ambos tratamientos y se dejó fermentar por 2 días a 20 °C a 80 rpm y 2 días a 30 °C sin agitación. En seguida se inoculó la bacteria C2 y se mantuvieron las mismas condiciones de fermentación que para C1. Los parámetros fisicoquímicos que se midieron en la fermentación acética y la fermentación final (con C2) fueron: pH con el potenciómetro Thermo Scientific Orion Star A111 y acidez total por titulación volumétrica con NaOH 0.5 N, en concordancia con el método 930.35J de la AOAC International, (1990).

La nomenclatura usada para identificar cada tratamiento fermentado se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Nomenclatura empleada para la identificación de tratamientos fermentados.

Nomenclatura	Tratamiento
Jugo	Jugo de zarzamora sin fermentar.
Km	Fermentado alcohólico con <i>K. marxianus</i> .
Km+C1	Fermentado acético con C1 y con levadura de origen <i>K. marxianus</i> .

Km+C1+C2	Fermentado acético con C1 y además inoculado con C2 con levadura de origen <i>K. marxianus</i> .
Sc	Fermentado alcohólico con <i>S. cerevisiae</i> .
Sc+C1	Fermentado acético con C1 y con levadura de origen <i>S. cerevisiae</i> .
Sc+C1+C2	Fermentado acético con C1 y además inoculado con C2 con levadura de origen <i>S. cerevisiae</i> .

6.2.5. Ensayos con *D. suzukii*

Para demostrar si hay mayor preferencia por algún tratamiento fermentado que por el vinagre de manzana, se sometió al insecto a un bioensayo con dos o más alternativas (una de ellas el vinagre) hasta responder de manera congruente. La respuesta de *D. suzukii* se evaluó en dos sistemas diferentes para establecer una conclusión. Uno de ellos fue en condiciones controladas de laboratorio por olfatometría de tubo en “Y” y se evaluó la respuesta de hembras y machos individualmente. En el otro sistema se consideró un ambiente más próximo a las condiciones naturales donde comúnmente se podría encontrar *D. suzukii*, mediante el ensayo de múltiple elección en semi-campo y se colocaron hembras y machos simultáneamente.

6.2.5.1. Ensayo de doble elección por olfatometría de tubo en “Y”

Se utilizó un olfatómetro de vidrio de borosilicato marca Glasstech (Figura 11), con 14 cm de longitud del brazo principal, 8 cm de longitud de los brazos laterales y 2.5 cm de diámetro, el ángulo entre el brazo principal y el lateral es de 135° y el ángulo entre ambos brazos laterales es de 90°. En este dispositivo se hizo circular un flujo de aire que pasa a través de una trampa de agua para evitar aromas ambientales y que aumente la humedad del mismo. El aire se introduce en los extremos del olfatómetro, así como cada tratamiento para que el aire húmedo arrastre los compuestos volátiles, con un flujo laminar y evitar que se mezclen. De esta manera los volátiles se detectan por el insecto. El criterio que se consideró para registrar una respuesta positiva fue cuando el insecto entró a cualquiera de los brazos laterales y pasó por más de la mitad de la distancia del mismo.



Figura 11. Olfatómetro montado en el laboratorio.

El ensayo se realizó en el momento del día cuando el insecto mostró mayor actividad (previa observación); además, la iluminación recomendada puede ser de 800 a 1000 luxes para este insecto (Hernández, 2019) y un flujo de aire de 200 a 300 mL/min (Espindola, 2017). Se utilizó un volumen de 200 μ L de cada uno de los tratamientos y controles.

Con el objeto de mantener las condiciones ambientales externas lo más uniforme posible, el ensayo comenzó diariamente a las 10:00 A.M., la iluminación se mantuvo entre 900 y 1050 luxes y el flujo de aire que se empleó fue de 300 mL/min; además, la temperatura del área de trabajo se encontraba a 25 ± 1 °C. Al momento del ensayo, las moscas tenían una edad de 3 a 5 días como adulto, se encontraban copuladas y permanecieron 15 horas en inanición (sólo mantenidas con agua).

Para lograr independencia de los datos, entraba una mosca a la vez al olfactómetro para que la respuesta no estuviera condicionada por la presencia de otra (s) mosca (s) y cada tratamiento se invirtió de posición entre el brazo derecho e izquierdo para evitar sesgo de posición. Las moscas que no mostraron una respuesta clara en un tiempo máximo de 5 minutos, fueron descartadas y remplazadas con otra. El ensayo se realizó con el número de moscas necesarias para obtener 6 respuestas para cada par de tratamientos que se confrontaron.

El olfatómetro se limpió cada día con un enjuague de agua y posteriormente un enjuague con etanol-cetona 50:50 hasta sequedad por 15 horas para usarlo nuevamente. Antes de comenzar cada ensayo, el sistema se alimentaba con aire blanco (sin tratamientos) por 5 minutos y las moscas fueron expuestas a la luminosidad del ensayo durante 15 minutos para evitar estrés por cambio de entorno.

Se realizaron 36 ensayos en total correspondientes a las múltiples combinaciones de los nueve tratamientos de la lista siguiente:

- Km
- Km+c1
- Km+c1+c2
- Sc
- Sc+c1
- Sc+c1+c2
- Jugo de zarzamora
- Agua (**control negativo**)
- Vinagre de sidra de manzana (**control positivo**)

El análisis estadístico se realizó en el programa RStudio con la prueba G de bondad de ajuste, bajo la hipótesis nula de preferencia para cada tratamiento del 50% y se consideró la corrección de Williams.

De manera adicional, se realizó el ensayo de múltiple elección en condiciones de semi-campo para escalar el ensayo de nivel laboratorio a uno donde la mosca estuviese en contacto factores bióticos y abióticos con menos control.

6.2.5.2. Ensayo de múltiple elección en semi-campo

Se construyeron 3 jaulas entomológicas de 60 x 60 x 100 cm forradas con tela de organza y se colocó al interior en la parte central una maceta con la planta hospedera (planta de zarzamora sin fruto ni en floración) para simular el entorno natural en el que se encuentra *D. suzukii*, las jaulas fueron colocadas en el jardín trasero del laboratorio donde estuvieron expuestas a los rayos del sol, corrientes

de viento en dirección aleatoria, aumento y descenso de temperatura conforme la posición del sol y la hora, aromas a tierra, follaje, etc. (Figura 12).

Se colocaron 15 mL de cada tratamiento en tubos cónicos Falcon™ de centrífuga con capacidad de 50 mL. Se realizaron 6 perforaciones de 3 mm de diámetro para permitir la entrada de *D. suzukii* y se ubicaron a una distancia de 3 cm respecto del nivel del tratamiento para permitir la saturación de volátiles en el espacio de cabeza del tubo. A cada jaula se le colocaron 4 tubos trampa, uno con jugo de zarzamora, dos testigos (vinagre de manzana y agua) y otro con un fermentado, los cuales se colgaron con un hilo hasta la altura del follaje de la planta como se muestra en la Figura 13. Entre cada repetición se rotó la posición de los tubos en sentido horario para evitar sesgo por posición.

Se colocaron 20 Hembras y 20 Machos de tres a cinco días de edad y mantenidas durante 17.5 horas sin alimentación a excepción de agua en un tubo Eppendorf™ con un algodón. El tiempo de exposición de las moscas fue de 23.5 horas y se realizaron 3 réplicas con una separación entre jaula y jaula de 2 m, se usó la metodología empleada por Cha et al. (2018) con algunas modificaciones.

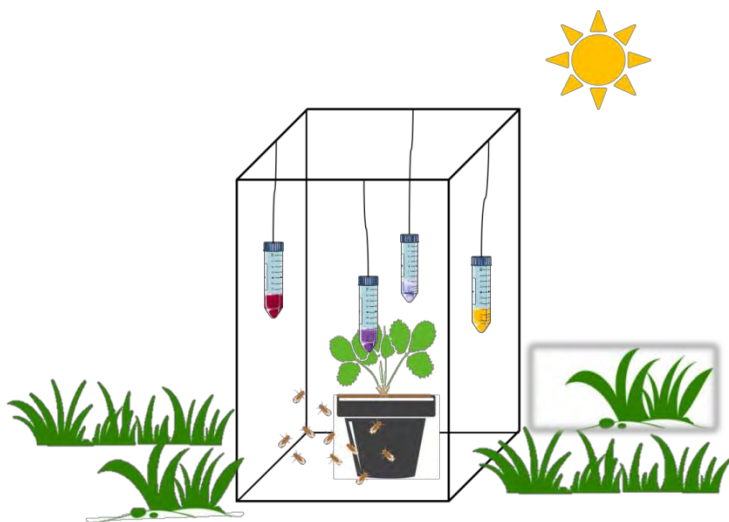


Figura 12. Ensayo de múltiple elección en semi-campo (esquema). Cuatro trampas colgadas simultáneamente correspondientes al agua (incoloro), vinagre de manzana (amarillo), morado (jugo de zarzamora) y guinda (fermentado). En el centro una maceta de zarzamora sin flor ni fruto.

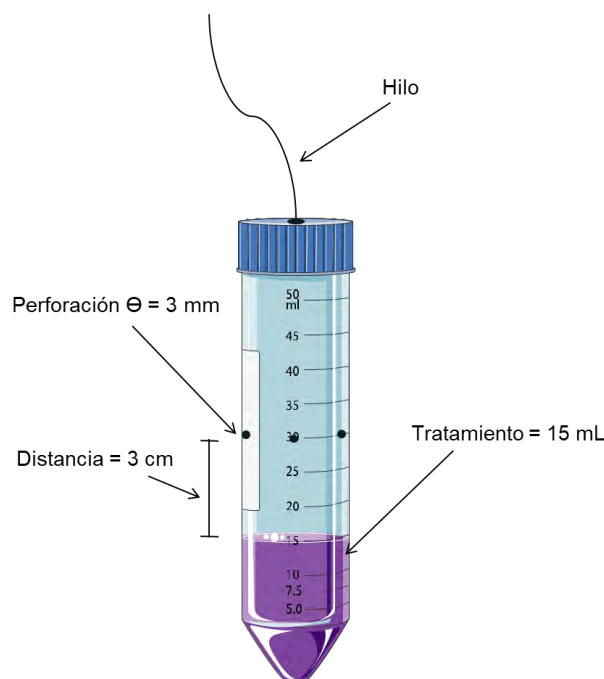


Figura 13. Trampa utilizada en ensayo de semi-campo. Tubo Falcon™ de centrifuga de 50 mL de capacidad. Para este diseño se realizaron 6 perforaciones en todo el perímetro para facilitar la entrada. En la parte superior de la tapa se colocó un hilo de tela para colgarlo.

Se usó un ANOVA de una vía y el test de Fisher con un 95% de confianza luego de transformar los datos con la raíz cuadrada más 0.5 para cumplir con los supuestos de normalidad y homocedasticidad. El análisis estadístico se realizó en el software STATISTICA 7.

De acuerdo con los objetivos que se plantearon, un paso fundamental en esta investigación fue la elucidación de los compuestos volátiles que se implican en la atracción de *D. sukii*, por lo que se recurrió al análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas el cual se presenta en la siguiente sección.

6.2.6. Caracterización de volátiles por GC-MS

El método que se empleó para la extracción de los volátiles fue por microextracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés) (Pawliszyn, 2000), para lo cual se tomó una alícuota de 1 mL de cada tratamiento (de acuerdo con la Tabla 4) y se colocó el volumen en viales individuales de SPME de 4 mL. Cada vial se calentó sobre una parrilla térmica durante 30 minutos de tal forma que la

muestra tuviera una temperatura interna de aproximadamente 30 °C para lograr el primer equilibrio termodinámico entre la fase líquida y gaseosa. En seguida, se apagó la parrilla y se insertó una fibra PDMS/DVB Azul SUPELCO® en el vial atravesando el septo para permanecer en exposición a los volátiles y lograr una adecuada adsorción durante 30 minutos y así lograr el segundo equilibrio termodinámico entre la fase gaseosa y el adsorbente de la fibra. El siguiente paso consistió en la desorción de los volátiles para su análisis en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas Agilent Technologies 7890B, para lo cual la fibra se expuso durante 30 segundos en el puerto de inyección que se encontraba a una temperatura de 180 °C, una presión de 7.0699 psi y el flujo de 6 mL/min con una inyección en modo splitless, la columna utilizada fue la Agilent HPFFAP 30 m/250 µm/0.25 µm (No. catálogo 19091F-433), con un flujo de 1 mL/min, una presión de 7.0699 psi y la post corrida de 3 mL/min durante 3 minutos. El gas acarreador fue Helio con una pureza mínima del 99,9995 %. La rampa de temperatura empleada fue de 40 °C por 5 minutos e incrementos de 3 °C por minuto durante 46.6 minutos hasta alcanzar 180 °C donde se mantuvo constante por 5 minutos, como se muestra en la Figura 14. Todas las muestras analizadas fueron realizadas por triplicado, al usar tres unidades experimentales independientes. El control que se usó para este ensayo fue el jugo de zarzamora sin fermentar. Se realizó una identificación de segundo nivel (Schymanski et al., 2014) de los picos cromatográficos mediante el uso de la librería NIST-MS 2.0 por comparación del espectro fragmentado de masas. El tratamiento estadístico de los datos se realizó en el programa Rstudio y STATISTICA 7.

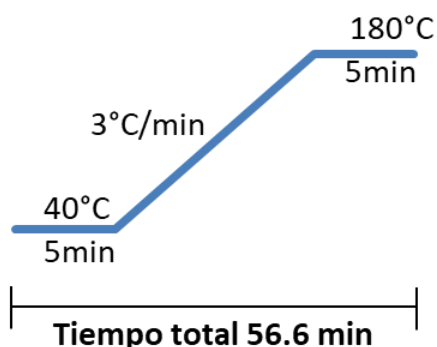


Figura 14. Rampa de temperaturas en el análisis de volátiles.

Los cromatogramas que se generaron por el MassHunter se procesaron en el software RStudio con el uso de las librerías “xcms”, “faahKO”, “pander”, “magrittr” para el análisis y visualización de espectros; donde se les realizó un ajuste de la línea base para minimizar la relación signal-to-noise (S/N), también se realizó un alineamiento de picos en el tiempo de retención donde coincidían la mayoría de los cromatogramas con la librería “GCalignR” y una deconvolución manual para los picos que no se encontraban con un nivel de resolución óptimo. Para llevar a cabo la cuantificación se procedió a realizar una matriz de áreas en función del tiempo de retención con la integración del área de los picos cromatográficos con la librería “pracma”.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Aislamiento de bacterias del vinagre

Al obtener dos aislados bacterianos (C1 y C2) del vinagre casero, ambos fueron puestos a prueba para encontrar la concentración óptima de etanol a la cual era posible que lo toleraran y al mismo tiempo, que pudieran ser capaces de realizar la fermentación acética al usarlo como sustrato. En la Tabla 5 se indica de manera cualitativa la apreciación de turbidez después de 72 horas de incubación en el medio GYE a diferentes concentraciones de etanol.

Tabla 5. Turbidez en C1 y C2 en GYE líquido con diferentes concentraciones de etanol.

Conc. etanol	Turbidez				
	<u>0%</u>	<u>4%</u>	<u>8%</u>	<u>10%</u>	<u>20%</u>
C1	+	+	-	-	-
C2	+	+	-	-	-

Debido a que no se observó crecimiento en los medios con etanol al 8%, 10% y 20%, se repitió el ensayo y se determinó la producción de ácido acético en GYE líquido, en un rango de concentración de etanol del 0% al 4%. Además, cabe

destacar que el aislado C2 produjo un biofilm color blanco en la parte superior del medio de cultivo como se muestra en la Figura 15, lo cual puede ser un indicativo de la producción de un hexopolisacárido lo cual es típico de algunas bacterias del ácido acético (Deppenmeier & Ehrenreich, 2009). Además de que se percibía un olor similar a queso añejo. En la Figura 16 se muestra la curva de crecimiento de C1 desde un tiempo 0 hasta las 72 horas, donde podemos observar que tiene un crecimiento bastante rápido para los medios con etanol al 1%, 2% y 3%. Por otro lado, la curva de crecimiento con etanol al 4% fue muy lenta. La curva correspondiente al medio sin etanol (0%) tuvo la fase Lag más larga que el resto, sin embargo, a partir de las 48 horas incrementó considerablemente la velocidad de crecimiento.

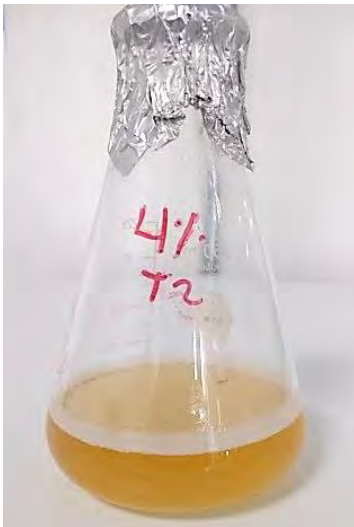


Figura 15. Biofilm de la bacteria C2 en GYE líquido con 4% de etanol.

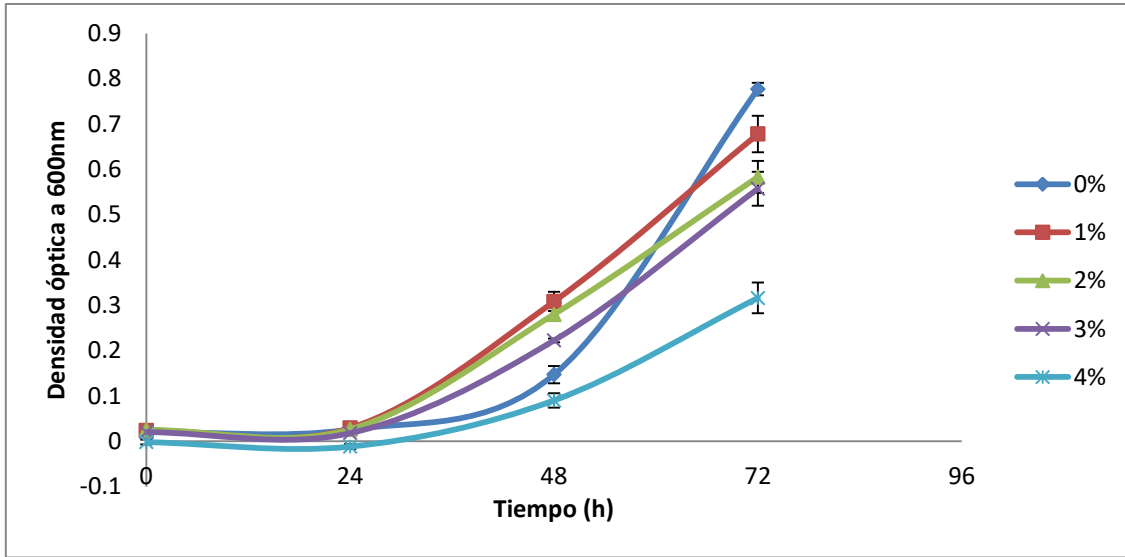


Figura 16. Curva de crecimiento del aislado C1 en medio GYE con diferentes concentraciones de etanol. Promedio de tres réplicas \pm error estándar.

En la Figura 17 se muestra la densidad óptica a las 72 horas y como era de esperarse, conforme aumenta la concentración de etanol en el medio, el crecimiento de la bacteria se compromete, esto es un aspecto importante porque a la fermentación acética la precede la fermentación alcohólica y era necesario conocer si existía un efecto citotóxico por el etanol. La densidad óptica para los medios al 2% y 3% de etanol no muestra diferencias significativas entre sí.

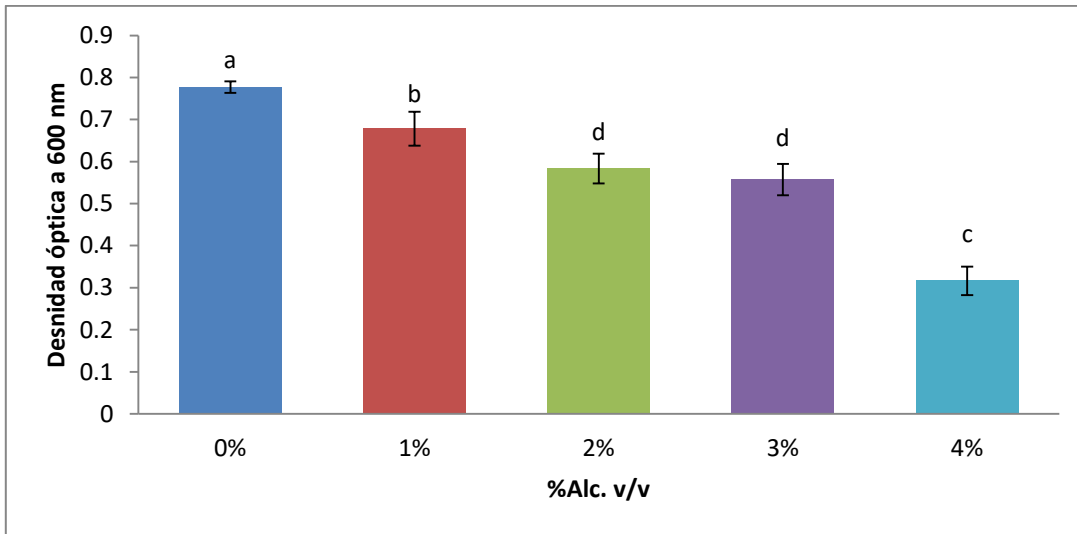


Figura 17. Densidad óptica de C1 a las 72 h en medio GYE con diferentes concentraciones de etanol. Promedio de tres réplicas \pm error estándar. Tukey $\alpha=0.05$.

En la Figura 18 se muestra la cinética de crecimiento para C2 durante 72 horas, es importante notar que el orden de magnitud de densidad óptica incrementó casi el doble que con C1 no necesariamente por la concentración celular, es decir, el biofilm que se observó contribuyó al aumento en la densidad óptica, sin embargo, el comportamiento de las curvas parece ser el típico de cualquier cinética de crecimiento microbiana.

En el medio al 0%, 2% y 3%, se pueden observar muy similares las tres curvas, termina la fase de crecimiento exponencialmente desacelerada y entra a la fase estacionaria a las 48 horas, así mismo, la velocidad de crecimiento es equivalente para los tres casos, por el contrario, las curvas al 1% y 4% de etanol tuvieron el crecimiento más lento, también llama la atención que con el medio al 1% de etanol le afectó drásticamente a esta bacteria, mientras que al 2% y 3% se vio favorecida.

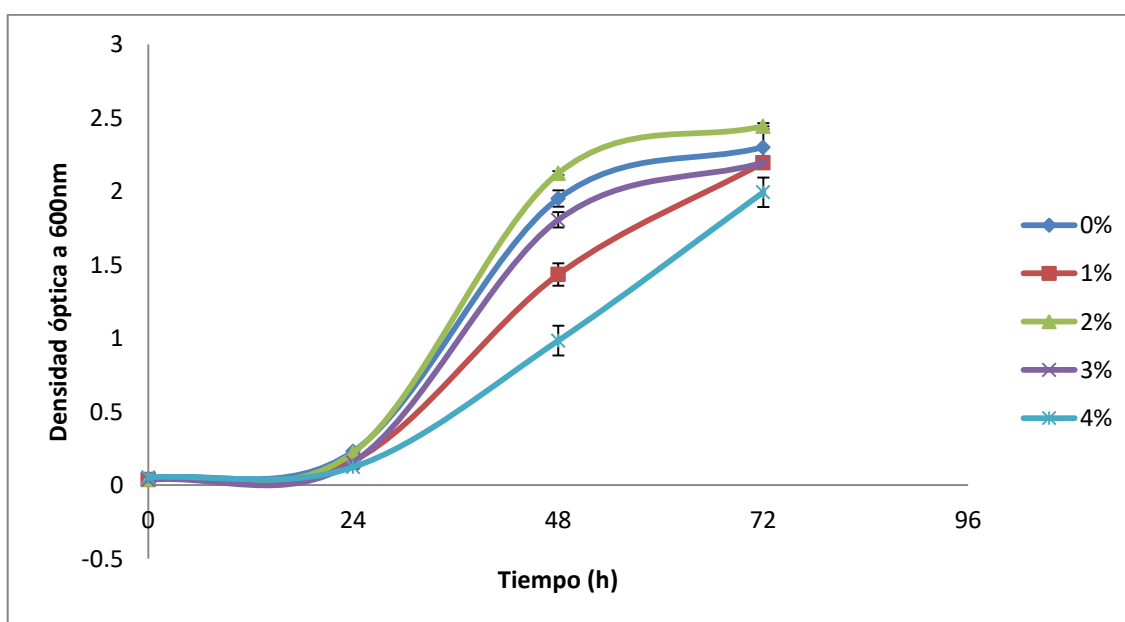


Figura 18. Curva de crecimiento del aislado C2 en medio GYE con diferentes concentraciones de etanol. Promedio de tres réplicas \pm error estándar.

En la Figura 19 se muestra la acidez total, expresada como gramos de ácido acético por litro de muestra analizada, se realizó el cálculo a partir de los datos que se obtuvieron por valoración ácido-base con NaOH y fenolftaleína. Como se observa, la bacteria C1 con el medio al 0% no lleva a cabo la fermentación acética

al no tener etanol como sustrato para ser oxidado. En el resto de los medios, muestra un incremento en la concentración de ácido acético e incluso son comparables los medios al 2%, 3% y 4% de etanol, al llegar a una concentración de alrededor de 10 g/L al cabo de 72 horas. La concentración inicial de acidez se debe a que el medio GYE se suplementa con 0.5% de ácido acético

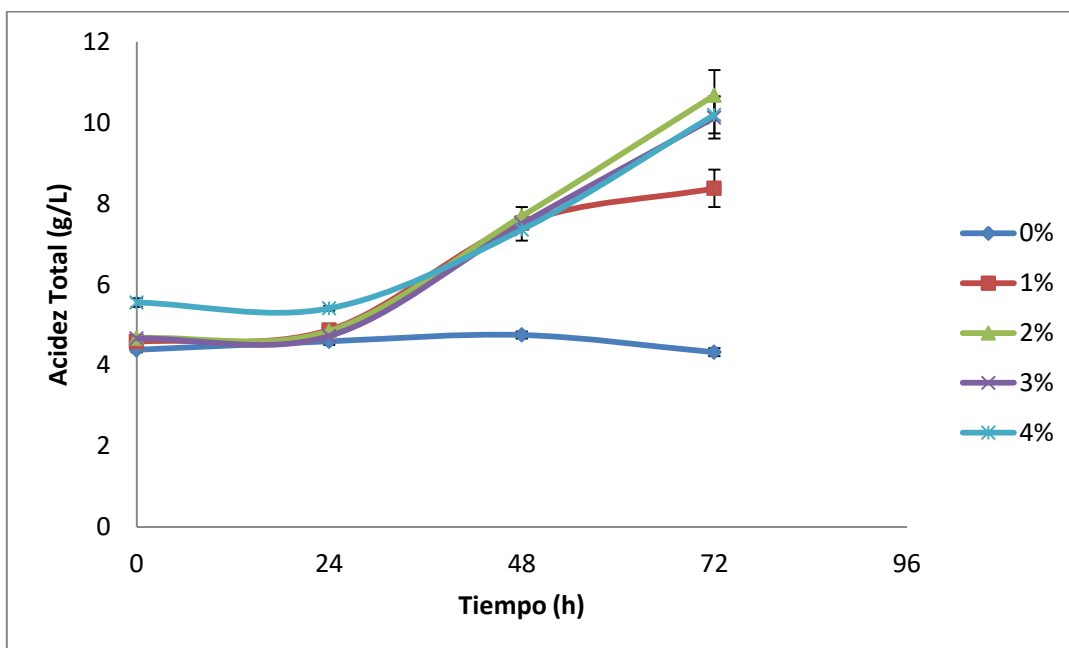


Figura 19. Acidez total (g/L) de C1 en GYE con diferentes concentraciones de etanol. Promedio de tres réplicas \pm error estándar.

En la Figura 20 se puede observar la acidez total en el medio al usar diferentes concentraciones de etanol con la bacteria C2 inoculada. Las curvas muestran una disminución en todos los casos, esta bacteria fue aislada del vinagre casero, no lleva a cabo dicha fermentación. También resulta interesante que esa ligera disminución de la acidez pudiera estar relacionada con la excreción de algún metabolito que neutralice la acidez del medio, o quizá usa los ácidos orgánicos como posible fuente de carbono para llevar a cabo otros procesos metabólicos.

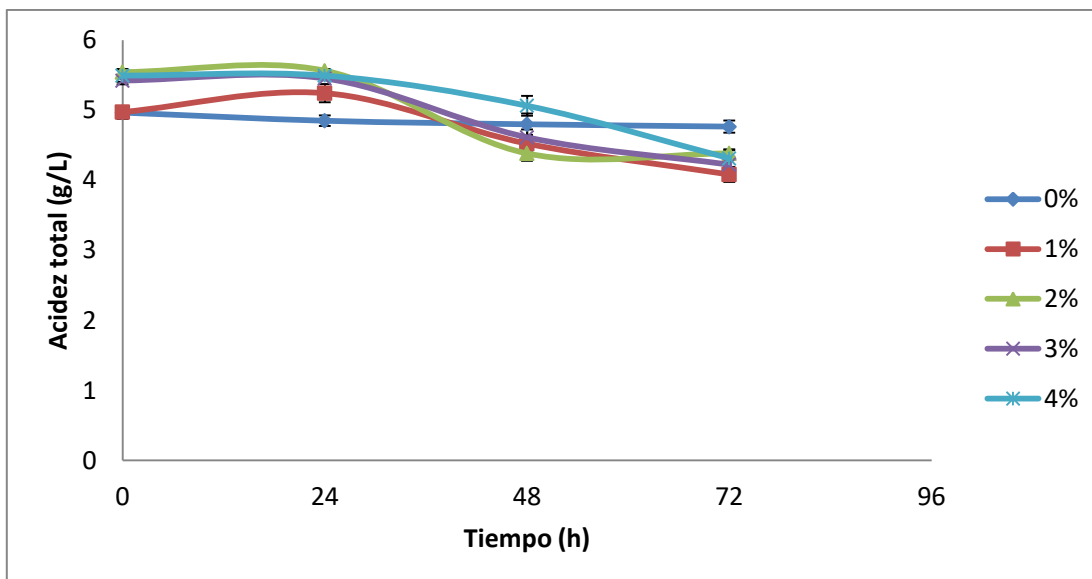


Figura 20. Acidez total (g/L) de C2 en GYE con diferentes concentraciones de etanol. Promedio de tres réplicas \pm error estándar.

Ambas bacterias mostraron un crecimiento aceptable en el medio GYE líquido con 2% de etanol, además, con respecto a la producción de ácido acético, C1 se vio favorecida con ese mismo medio, parámetro que fue indistinto en C2, al no llevar a cabo fermentación acética, sin embargo, se decidió conservarla y emplearla en este proyecto, precisamente por el aroma particular que emitía similar a queso añejo, el cual podría involucrarse con la producción de compuestos volátiles de interés.

7.2. Jugo de zarzamora

Luego de obtener el zumo y filtrarlo, este presentaba una consistencia muy espesa, propiedad reológica que dificultaba su manipulación, razón por la cual se realizó una dilución en volumen al 50% con agua; el contenido de sólidos solubles que se midió con refractómetro fue de 7.3 °Brix, valor de arranque para iniciar con la fermentación alcohólica (Figura 21).



Figura 21. Matraz Erlenmeyer con jugos de zarzamora estéril.

7.3. Elaboración de tratamientos fermentados

7.3.1. Fermentación alcohólica

A partir del jugo de zarzamora estéril y en dilución al 50%, con una concentración de azúcares de 7.3 °Brix, se realizó la inoculación del mismo con la levadura *K. marxianus*, así como la levadura *S. cerevisiae* en matraces independientes, con tres repeticiones cada uno para iniciar con las fermentaciones alcohólicas, en las Figuras 22 y 23 se observa que para cada tratamiento fermentado el consumo de azúcares desciende casi por completo dentro de las primeras 24 horas. Aún así se dejó que continuara hasta que el consumo de azúcares fuera constante, y así asegurar que los procesos de biotransformación que ocurren con los compuestos de la zarzamora se llevaran a cabo. Ambas cinéticas tienen un comportamiento muy similar en el tiempo, al llegar a un mínimo de 3 °Brix al final de la fermentación, presentaron un aroma *sui generis* a fermentado alcohólico y fue posible apreciar la producción de gas (CO₂) por descarboxilación del piruvato a acetaldehído mediante la enzima piruvato descarboxilasa.

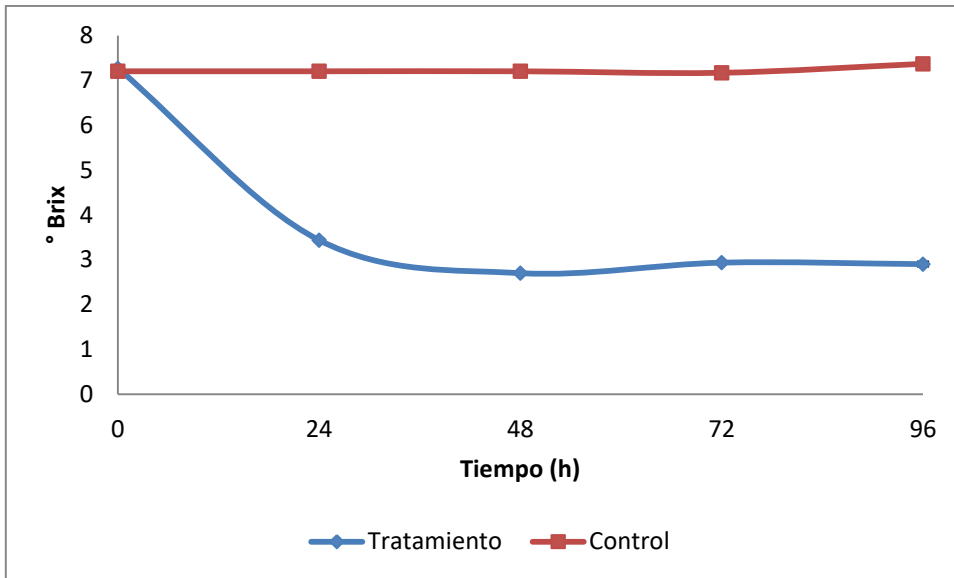


Figura 22. Consumo de azúcares del jugo de zarzamora por *K. marxianus*. Promedio de tres réplicas \pm error estándar.

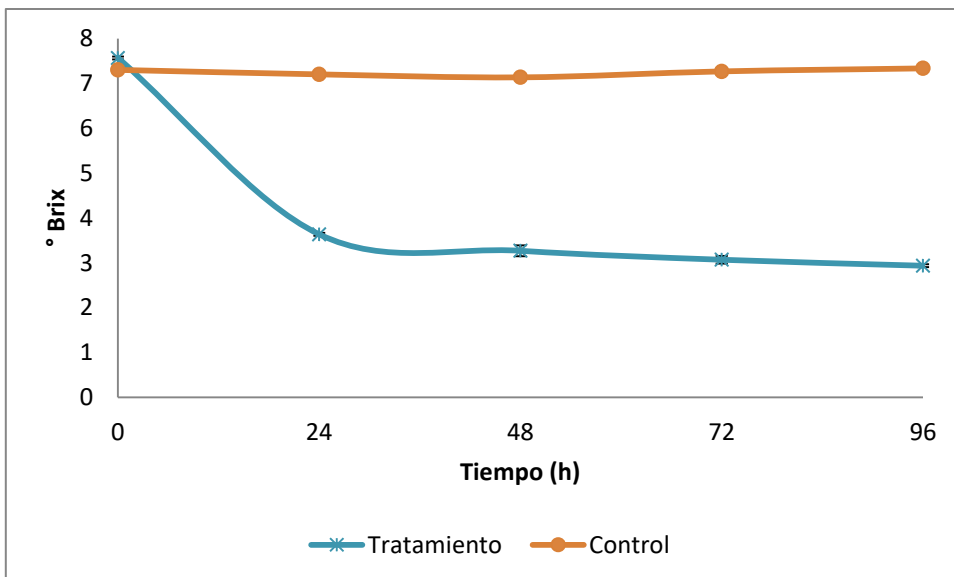


Figura 23. Consumo de azúcares del jugo de zarzamora por *S. cerevisiae*. Promedio de tres réplicas \pm error estándar.

7.3.2. Fermentación acética

Al finalizar la fermentación alcohólica, el etanol que se produjo se usó como sustrato por la bacteria acética C1 al inocularla en ambos tratamientos fermentados, como se observa en las Figuras 24 y 25 el nivel de acidez comienza

alrededor de 5 g/L debido a que la zarzamora por naturaleza es un fruto ácido. Se muestra que conforme avanza el tiempo, la acidez total incrementa hasta alcanzar un máximo a las 96 horas al producir alrededor de 25 g ácido acético/L, a partir de ese momento se consideró terminada la fermentación acética y se procedió a inocular la bacteria C2. Como se observa en ambas figuras, la concentración de ácido tiende a disminuir con la presencia de esta bacteria, lo cual también se vió en los ensayos preliminares con medio de cultivo en la Figura 20.

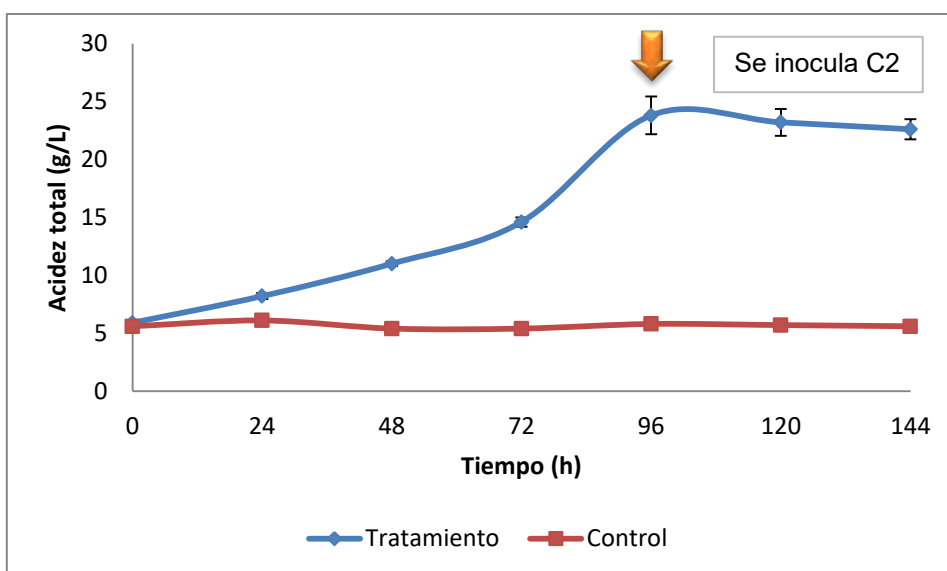


Figura 24. Acidez total (g/L) con C1 y C2, previamente fermentado con *K. marxianus*. Promedio de tres réplicas \pm error estándar.

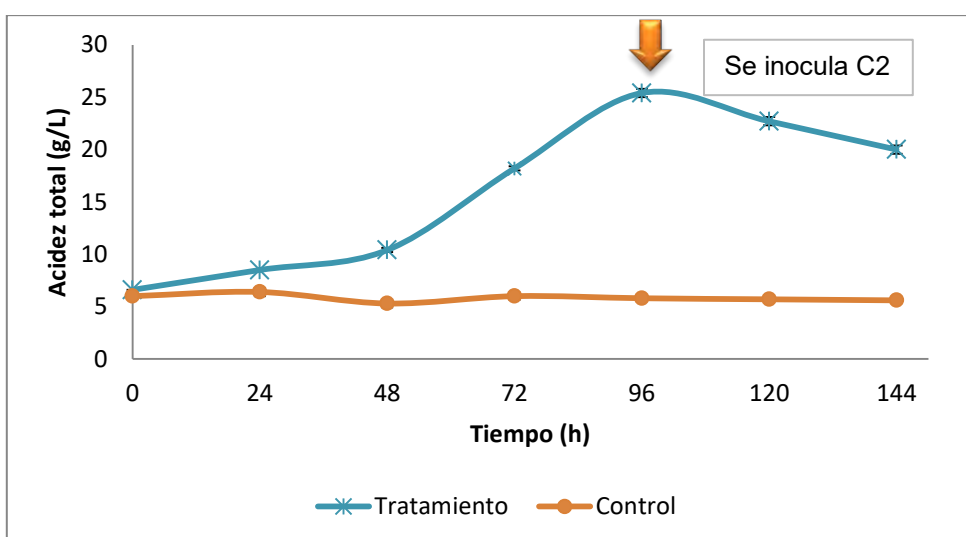


Figura 25. Acidez total (g/L) con C1 y C2, previamente fermentado con *S. cerevisiae*. Promedio de tres réplicas \pm error estándar.

Al igual que la acidez total, se monitorearon los cambios en el pH y como se observa en las Figuras 26 y 27, el pH del medio tiene una tendencia a disminuir con la bacteria C1 al llevar a cabo la fermentación acética, lo cual no es sorprendente. Por el contrario, con la bacteria C2 el pH incrementó en ambos casos, lo que posiblemente se deba a un metabolismo catabólico sobre ciertos ácidos orgánicos o incluso se podría tratar de un efecto sintrófico, en el que se da una colaboración entre diferentes especies microbianas; mientras una genera productos finales de fermentación primaria como etanol, acetato y butirato, entre otros, la otra se encarga de degradarlos para producir CO₂ y otros compuestos de bajo peso molecular, de tal forma que la reacción global sea favorable energéticamente. Esto tiene sentido al recordar que ambas bacterias (C1 y C2) pertenecen a una misma comunidad (aisladas del mismo vinagre casero) y que posiblemente C2 disminuye gradualmente el nivel de acidez del vinagre y así, asegurar el crecimiento de C1.

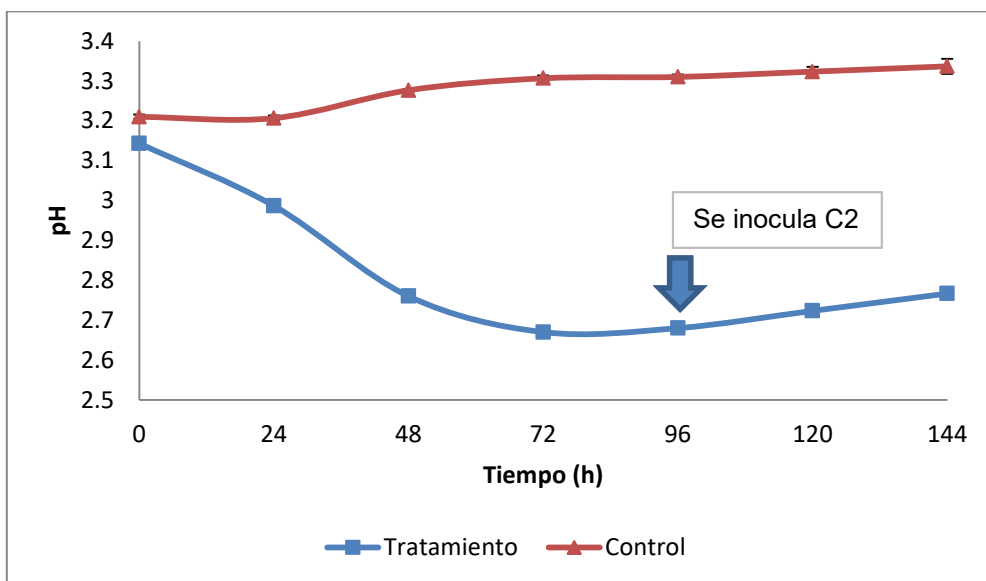


Figura 26. Cambio en el pH del medio con C1 y C2, previamente fermentado con *K. marxianus*. Promedio de tres réplicas ± error estándar.

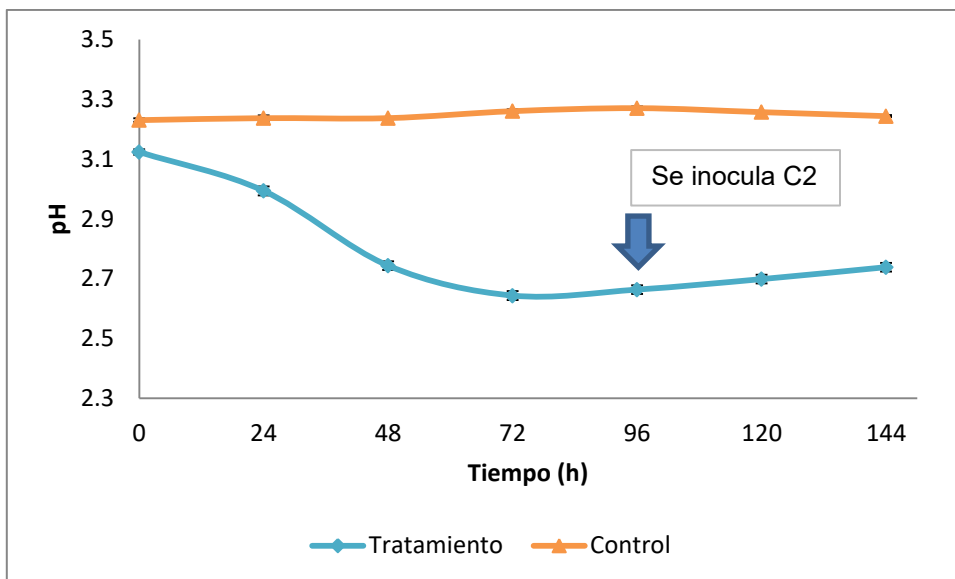


Figura 27. Cambio en el pH del medio con C1 y C2, previamente fermentado con *S. cerevisiae*. Promedio de tres réplicas \pm error estándar.

En total se obtuvieron seis fermentados de zarzamora: dos de ellos alcohólicos, dos acéticos y dos acéticos con la adición de C2 de los cuales se evaluó su capacidad de atracción en ensayos de comportamiento con *D. suzukii*.

7.4. Ensayo de doble elección por olfatometría de tubo en “Y”

D. suzukii fue sometida al ensayo de olfatometría de dos vías mediante las 36 combinaciones correspondientes al jugo sin fermentar, seis fermentados y dos controles (agua y vinagre de manzana) de dos en dos; para determinar aquellos que lograron tener un mejor desempeño contra el vinagre de manzana, además, evaluar la preferencia entre tratamientos, para así obtener mayor información sobre la presencia de un microorganismo y sus productos de fermentación. Debido a que existía la posibilidad de que *D. suzukii* prefiriera el jugo de zarzamora, por su contenido de azúcares *per se* y no por los volátiles que contenía y también respecto a que este se esterilizó por calor húmedo en autoclave, lo cual puede repercutir en la pérdida del perfil aromático, se realizaron ensayos al confrontar al jugo de zarzamora (7.3 °Brix) contra una solución de sacarosa (7.3 °Brix) y jugo de zarzamora fresco sin esterilizar contra jugo que se esterilizó en autoclave, el control fue agua para ámbos casos. En la Figura 28 se observan los resultados para la respuesta de los machos y en la Figura 29 la respuesta de las hembras. En

ambos casos podemos apreciar que las moscas tuvieron mayor preferencia (83%, 83% y 66% respectivamente) por el jugo de zarzamora que se esterilizó, el jugo sin esterilizar y a la solución azucarada con respecto al agua (control). Aunque se trata de una respuesta relativa, ya que cuando se confrontaron contra el jugo que se esterilizó, este último fue el tratamiento que prefirieron. Esto refleja una desventaja al momento de interpretar los resultados del ensayo, ya que el insecto se fuerza a tomar una decisión entre dos opciones disponibles y no sobre un universo de posibilidades, motivo por el cual puede resultar desalentador si se lleva a condiciones de campo y se obtienen resultados distintos a los de laboratorio.

Por los resultados en este ensayo preliminar, se puede decir que la preferencia por el jugo de zarzamora se debe a las moléculas volátiles que emite y no por el contenido de azúcar presente en él. Además, el jugo que se esterilizó tiene mayor preferencia hasta en un 83% ($G=49.41$, $df=1$, $p<0.0001$) en machos y hembras en comparación con el jugo sin esterilizar, razón por la cual se eligió éste tratamiento para continuar con los ensayos subsiguientes y se descartaron el jugo sin esterilizar y el agua azucarada. Es importante mencionar que a partir de aquí, al mencionar al jugo de zarzamora querrá decir jugo que se esterilizó.

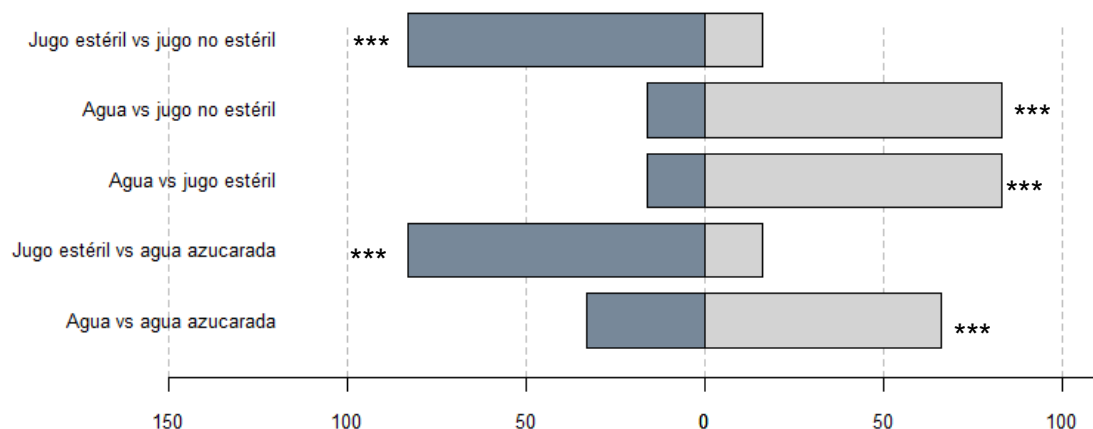


Figura 28. Porcentaje de preferencia del macho *D. suzukii* en olfatómetro de tubo “Y”. Agua (agua destilada), agua azucarada (disolución de sacarosa en agua 7.3°Brix), jugo estéril (jugo de zarzamora 50% v/v en autoclave), jugo no estéril (jugo de zarzamora 50% v/v sin esterilizar). Datos de 30 machos y 30 hembras en total; se utilizaron 6 individuos para cada par de

tratamientos. Los asteriscos denotan diferencia significativa en la prueba G con la corrección de Williams (***) ($P < 0.001$).

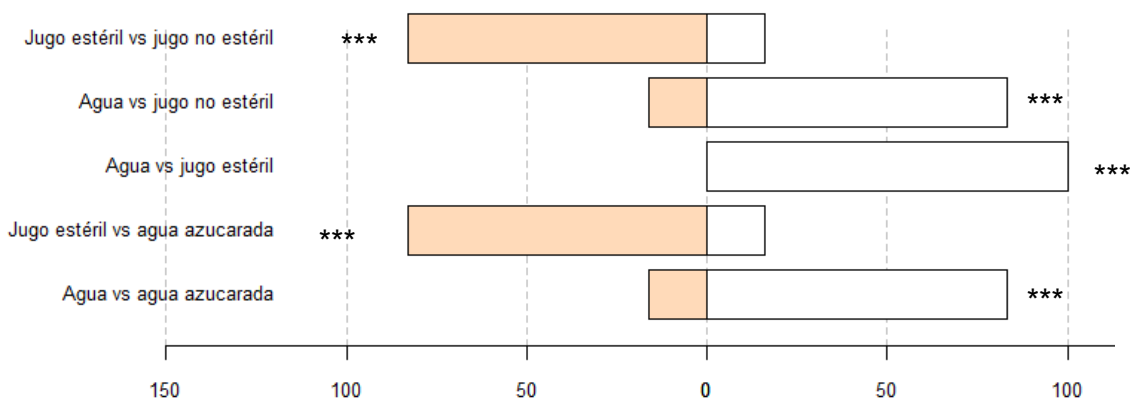


Figura 29. Porcentaje de preferencia de la hembra *D. sukukii* en olfatómetro de tubo “Y”. Agua (agua destilada), agua azucarada (disolución de sacarosa en agua 7.3°Brix), jugo estéril (jugo de zarzamora 50% v/v en autoclave), jugo no estéril (jugo de zarzamora 50% v/v sin esterilizar). Datos de 30 machos y 30 hembras en total; se utilizaron 6 individuos para cada par de tratamientos. Los asteriscos denotan diferencia significativa en la prueba G con la corrección de Williams (***) ($P < 0.001$).

7.4.1. Fermentado alcohólico con *K. marxianus*

A continuación se presentan los resultados de los ensayos de confrontación entre los diferentes fermentados, en primer lugar se muestra la Figura 30 para los machos y la Figura 31 para las hembras correspondientes al fermentado alcohólico con *K. marxianus*. Los valores del cero hacia la izquierda corresponden al porcentaje de preferencia por el tratamiento alcohólico en cuestión, mientras que los valores del cero hacia la derecha corresponden al porcentaje de preferencia para cada tratamiento alternativo con que se confrontó, incluidos los controles.

En la Figura 30 se puede observar que el macho tuvo mayor preferencia por el tratamiento alcohólico con *K. marxianus* en la mayoría de los ensayos donde se evaluó, incluso contra el vinagre de manzana en un 83% ($G=49.41$, $df=1$, $p < 0.0001$) y a su homólogo con *S. cerevisiae* en un 66% ($G=11.57$, $df=1$,

p=0.00083). Para la Figura 31 la respuesta de las hembras fue distinta al tener la mayor preferencia en el tratamiento alcohólico únicamente con respecto al control negativo (agua) en un 100% (G=137.94, df=1, p<0.0001) y con respecto al tratamiento sin fermentar (jugo) en un 83%, para el resto de los ensayos, no le resultó atractivo el fermentado alcohólico con *K. marxianus*. Sin duda, esto representa una brecha muy marcada en la preferencia que hay de hembras y machos por los volátiles a los cuales fueron expuestas, esta brecha puede estar dada por necesidades fisiológicas como la nutrición, la oviposición (Cloonan et al., 2018) o por marcaje epigenético a nivel de receptores olfativos, ya sea por activación de los receptores olfativos de aversión o de atracción (Clark & Ray, 2016).

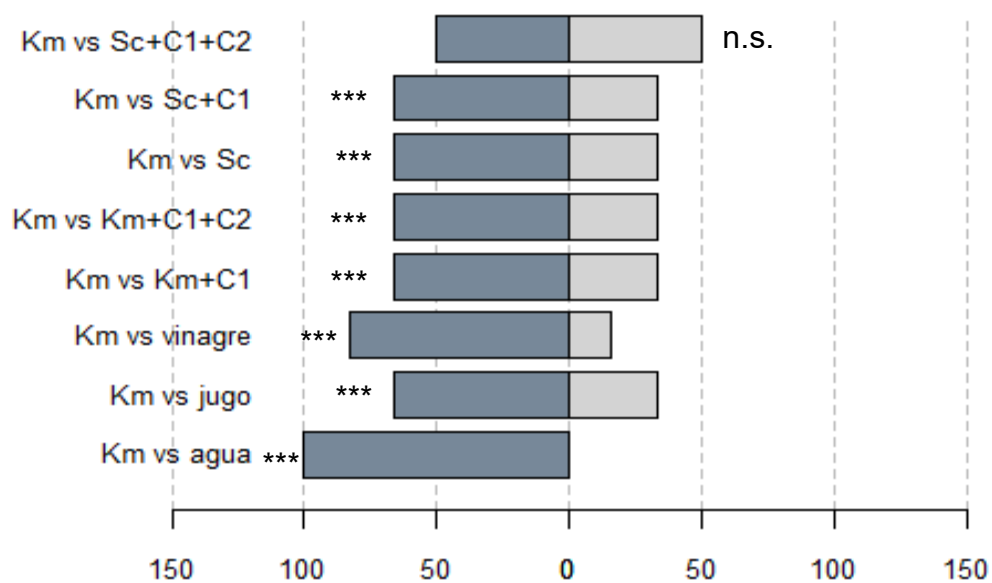


Figura 30. Porcentaje de preferencia del macho entre el fermentado alcohólico con *K. marxianus* y el resto de los tratamientos. Vinagre (vinagre de manzana), agua (agua destilada), jugo (jugo de zarzamora), Sc (fermentado alcohólico con *S. cerevisiae*), Sc+C1 (fermentado acético de C1, previamente fermentado con *S. cerevisiae*), Sc+C1+C2 (fermentado acético de C1 y la adición de C2, previamente fermentado con *S. cerevisiae*), Km (fermentado alcohólico con *K. marxianus*), Km+C1 (fermentado acético de C1, previamente fermentado con *K. marxianus*), Km+C1+C2 (fermentado acético de C1 y la adición de C2, previamente fermentado con *K. marxianus*). Datos de 48 machos y 48 hembras en total; se utilizaron 6 individuos para cada par de tratamientos. Los asteriscos denotan diferencia significativa en la prueba G con la corrección de Williams (***) $P < 0.001$, n.s. = no significativo).

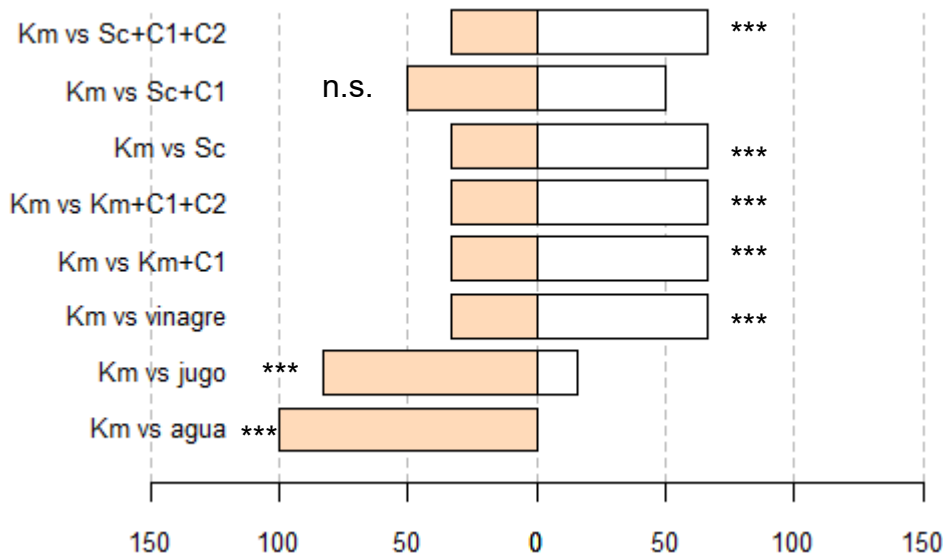


Figura 31. Porcentaje de preferencia de la hembra entre el fermentado alcohólico con *K. marxianus* y el resto de los tratamientos. Vinagre (vinagre de manzana), agua (agua destilada), jugo (jugo de zarzamora), Sc (fermentado alcohólico con *S. cerevisiae*), Sc+C1 (fermentado acético de C1, previamente fermentado con *S. cerevisiae*), Sc+C1+C2 (fermentado acético de C1 y la adición de C2, previamente fermentado con *S. cerevisiae*), Km (fermentado alcohólico con *K. marxianus*), Km+C1 (fermentado acético de C1, previamente fermentado con *K. marxianus*), Km+C1+C2 (fermentado acético de C1 y la adición de C2, previamente fermentado con *K. marxianus*). Datos de 48 machos y 48 hembras en total; se utilizaron 6 individuos para cada par de tratamientos. Los asteriscos denotan diferencia significativa en la prueba G con la corrección de Williams (***) $P < 0.001$, n.s. = no significativo).

7.4.2. Fermentado alcohólico con *S. cerevisiae*

Al comparar el fermentado alcohólico (Figura 32) con *S. cerevisiae* contra los demás tratamientos, resulta no ser atractivo para el macho ya que prefirieron al resto de los tratamientos, a excepción de cuando se confrontó contra el jugo de zarzamora y el fermentado acético Sc+C1, donde Sc tuvo una respuesta del 83% ($G=49.41$, $df=1$, $p < 0.0001$) y contra el control (agua) en un 100%. Al comparar estos resultados con los de la Figura 30, se puede decir que el fermentado alcohólico con *S. cerevisiae* no representa una opción viable para atraer al macho *D. sukuzii* y por el contrario, el fermentado alcohólico con *K. marxianus* obtuvo un mejor desempeño contra el vinagre de manzana y contra el resto de los tratamientos.

Para evaluar la respuesta de las hembras, podemos observar en la Figura 33 que en general hubo una respuesta prometedoras para este tratamiento que por el resto, el inconveniente se presentó al no ser suficiente (16% de preferencia) en comparación al vinagre de manzana, incluso contra el fermentado Km+C1 (33%).

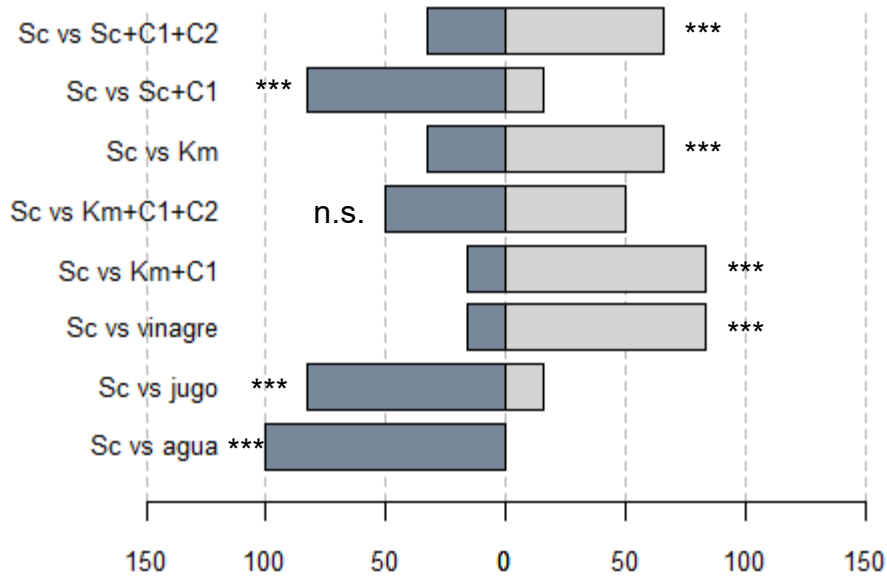


Figura 32. Porcentaje de preferencia del macho entre el fermentado alcohólico con *S. cerevisiae* y el resto de los tratamientos. Vinagre (vinagre de manzana), agua (agua destilada), jugo (jugo de zarzamora), Sc (fermentado alcohólico con *S. cerevisiae*), Sc+C1 (fermentado acético de C1, previamente fermentado con *S. cerevisiae*), Sc+C1+C2 (fermentado acético de C1 y la adición de C2, previamente fermentado con *S. cerevisiae*), Km (fermentado alcohólico con *K. marxianus*), Km+C1 (fermentado acético de C1, previamente fermentado con *K. marxianus*), Km+C1+C2 (fermentado acético de C1 y la adición de C2, previamente fermentado con *K. marxianus*). Datos de 48 machos y 48 hembras en total; se utilizaron 6 individuos para cada par de tratamientos. Los asteriscos denotan diferencia significativa en la prueba G con la corrección de Williams (***) $P < 0.001$, n.s. = no significativo).

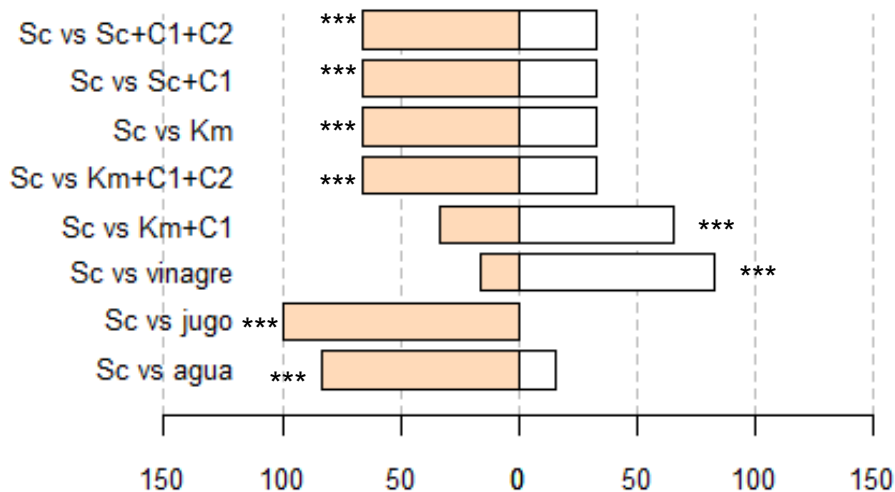


Figura 33. Porcentaje de preferencia de la hembra entre el fermentado alcohólico con *S. cerevisiae* y el resto de los tratamientos. Vinagre (vinagre de manzana), agua (agua destilada), jugo (jugo de zarzamora), Sc (fermentado alcohólico con *S. cerevisiae*), Sc+C1 (fermentado acético de C1, previamente fermentado con *S. cerevisiae*), Sc+C1+C2 (fermentado acético de C1 y la adición de C2, previamente fermentado con *S. cerevisiae*), Km (fermentado alcohólico con *K. marxianus*), Km+C1 (fermentado acético de C1, previamente fermentado con *K. marxianus*), Km+C1+C2 (fermentado acético de C1 y la adición de C2, previamente fermentado con *K. marxianus*). Datos de 48 machos y 48 hembras en total; se utilizaron 6 individuos para cada par de tratamientos. Los asteriscos denotan diferencia significativa en la prueba G con la corrección de Williams (***) $P < 0.001$.

7.4.3. Fermentado acético con C1 proveniente de *K. marxianus*

En la Figura 34 se observa la respuesta de los machos por el tratamiento acético proveniente de la fermentación alcohólica con *K. marxianus*. Este fermentado resulta más atractivo que su homólogo *S. cerevisiae*+C1 mientras que cuando se confrontó contra Km+C1+C2, este último tiene mayor efecto de atracción hasta en un 100% ($G=137.94$, $df=1$, $p < 0.0001$), lo cual probablemente indica que la bacteria C2 mejora el bouquet aromático del fermentado. Al revisar la barra del vinagre de manzana, se puede observar que Km+C1 resulta más atractivo, hasta en un 83% para el macho ($G=49.41$, $df=1$, $p < 0.0001$).

En la Figura 35 se observa la respuesta de las hembras, donde los tratamientos acéticos se muestran con mayor atracción al compararlos con los alcohólicos Km y Sc, pero cuando se contrasta con Km+C1+C2 y Sc+C1+C2 estos últimos resultaron con mayor efecto de atracción. Comparando Km+C1 con el vinagre de

manzana, se puede ver que no logró ser suficientemente atractivo (16%) para considerarlo una opción elegible como atrayente para la hembra.

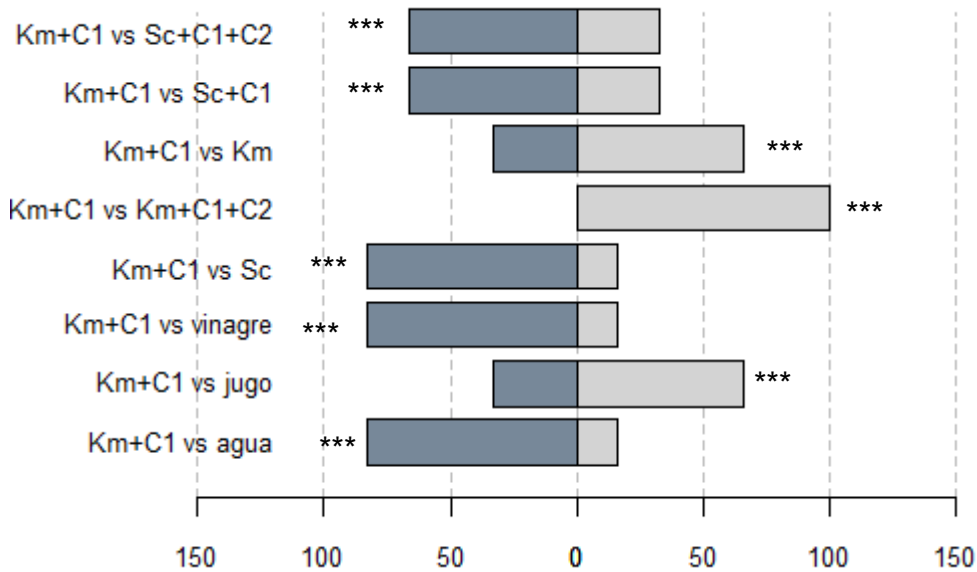


Figura 34. Porcentaje de preferencia del macho entre el fermentado acético de C1, previamente fermentado con *K. marxianus* y el resto de los tratamientos. Vinagre (vinagre de manzana), agua (agua destilada), jugo (jugo de zarzamora), Sc (fermentado alcohólico con *S. cerevisiae*), Sc+C1 (fermentado acético de C1, previamente fermentado con *S. cerevisiae*), Sc+C1+C2 (fermentado acético de C1 y la adición de C2, previamente fermentado con *S. cerevisiae*), Km (fermentado alcohólico con *K. marxianus*), Km+C1 (fermentado acético de C1, previamente fermentado con *K. marxianus*), Km+C1+C2 (fermentado acético de C1 y la adición de C2, previamente fermentado con *K. marxianus*). Datos de 48 machos y 48 hembras en total; se utilizaron 6 individuos para cada par de tratamientos. Los asteriscos denotan diferencia significativa en la prueba G con la corrección de Williams (*** $P < 0.001$).

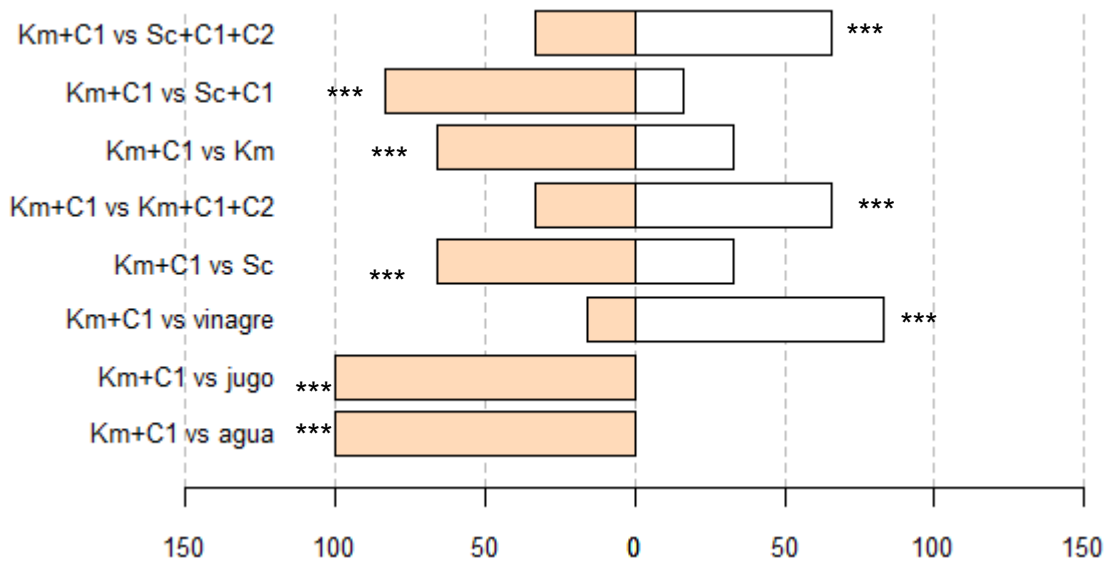


Figura 35. Porcentaje de preferencia de la hembra entre el fermentado acético de C1, previamente fermentado con *K. marxianus* y el resto de los tratamientos. Vinagre (vinagre de manzana), agua (agua destilada), jugo (jugo de zarzamora), Sc (fermentado alcohólico con *S. cerevisiae*), Sc+C1 (fermentado acético de C1, previamente fermentado con *S. cerevisiae*), Sc+C1+C2 (fermentado acético de C1 y la adición de C2, previamente fermentado con *S. cerevisiae*), Km (fermentado alcohólico con *K. marxianus*), Km+C1 (fermentado acético de C1, previamente fermentado con *K. marxianus*), Km+C1+C2 (fermentado acético de C1 y la adición de C2, previamente fermentado con *K. marxianus*). Datos de 48 machos y 48 hembras en total; se utilizaron 6 individuos para cada par de tratamientos. Los asteriscos denotan diferencia significativa en la prueba G con la corrección de Williams (***) $P < 0.001$.

7.4.4. Fermentado acético con C1 proveniente de *S. cerevisiae*

En la Figura 36 se observa que el fermentado acético Sc+C1 le resulta poco atractivo al macho, al no ser significativo en cuatro ocasiones, es decir, con una elección del 50% ($G=0$, $df=1$, $p=1$) por el tratamiento (incluida la respuesta por el vinagre de manzana), mientras que las tres barras restantes que se encuentran desplazadas a la derecha hacen notar que no es el tratamiento más adecuado. Sólo fue atractivo cuando se confrontó contra el agua al ser este último un control negativo.

Lo mismo sucedió con las hembras (Figura 37), donde se observan cuatro no significativos ($G=0$, $df=1$, $p=1$) inclusive el vinagre de manzana y el agua. De aquellos donde sí hubo diferencias significativas, sólo Sc+C1+C2 logró una atracción del 100% con respecto a Sc+C1 ($G=137.94$, $df=1$, $p < 0.0001$), esto denota que este fermentado tampoco es una opción elegible.

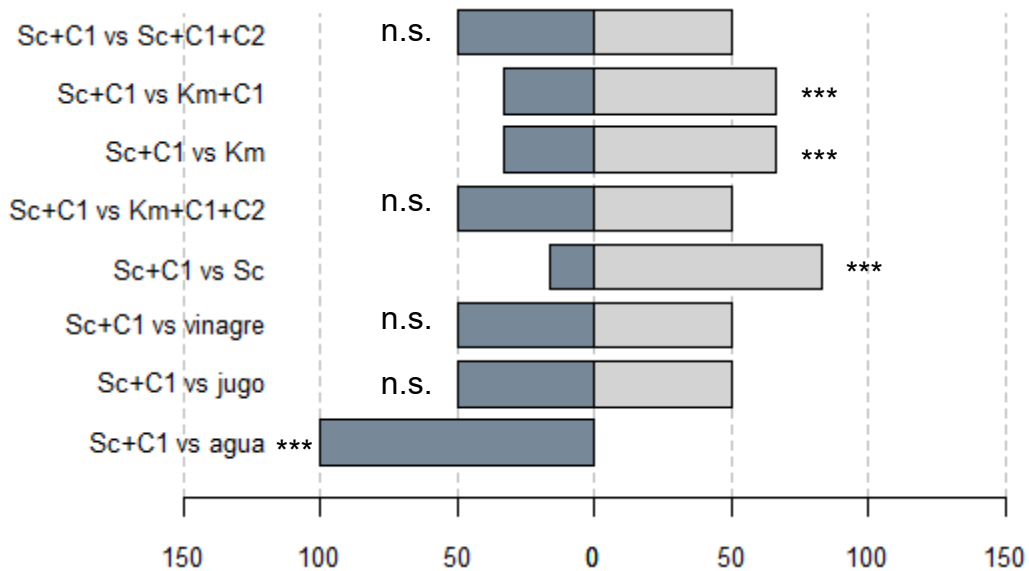


Figura 36. Porcentaje de preferencia del macho entre el fermentado acético de C1, previamente fermentado con *S. cerevisiae* y el resto de los tratamientos. Vinagre (vinagre de manzana), agua (agua destilada), jugo (jugo de zarzamora), Sc (fermentado alcohólico con *S. cerevisiae*), Sc+C1 (fermentado acético de C1, previamente fermentado con *S. cerevisiae*), Sc+C1+C2 (fermentado acético de C1 y la adición de C2, previamente fermentado con *S. cerevisiae*), Km (fermentado alcohólico con *K. marxianus*), Km+C1 (fermentado acético de C1, previamente fermentado con *K. marxianus*), Km+C1+C2 (fermentado acético de C1 y la adición de C2, previamente fermentado con *K. marxianus*). Datos de 48 machos y 48 hembras en total; se utilizaron 6 individuos para cada par de tratamientos. Los asteriscos denotan diferencia significativa en la prueba G con la corrección de Williams (*** $P < 0.001$, n.s. = no significativo).

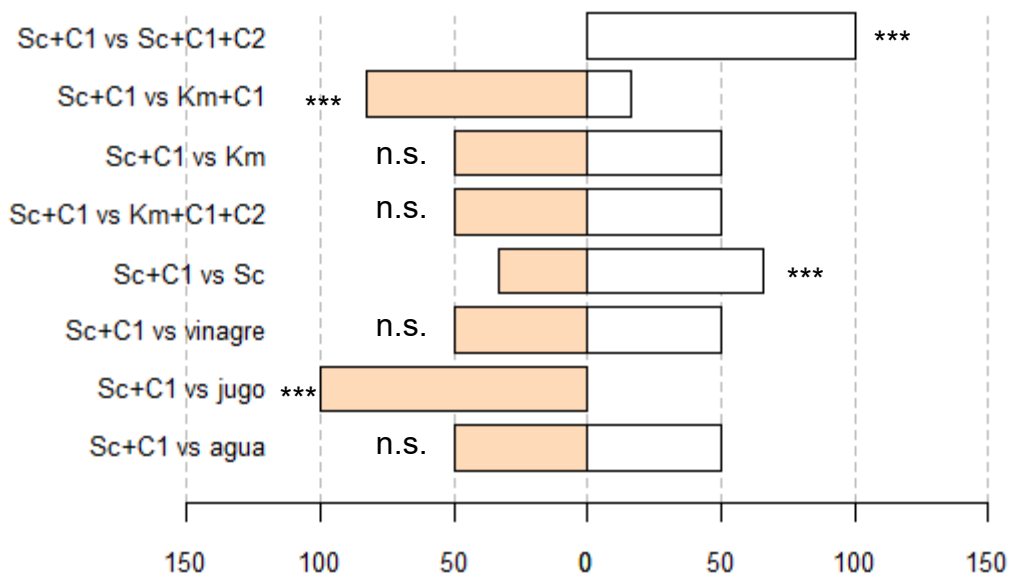


Figura 37. Porcentaje de preferencia de la hembra entre el fermentado acético de C1, previamente fermentado con *S. cerevisiae* y el resto de los tratamientos. Vinagre (vinagre de manzana), agua (agua destilada), jugo (jugo de zarzamora), Sc (fermentado alcohólico con *S.*

cerevisiae), Sc+C1 (fermentado acético de C1, previamente fermentado con *S. cerevisiae*), Sc+C1+C2 (fermentado acético de C1 y la adición de C2, previamente fermentado con *S. cerevisiae*), Km (fermentado alcohólico con *K. marxianus*), Km+C1 (fermentado acético de C1, previamente fermentado con *K. marxianus*), Km+C1+C2 (fermentado acético de C1 y la adición de C2, previamente fermentado con *K. marxianus*). Datos de 48 machos y 48 hembras en total; se utilizaron 6 individuos para cada par de tratamientos. Los asteriscos denotan diferencia significativa en la prueba G con la corrección de Williams (** $P < 0.001$, n.s. = no significativo).

7.4.5. Fermentado acético con C1 y C2 proveniente de *K. marxianus*

En la Figura 38 se aprecia que el tratamiento Km+C1+C2 obtuvo un nivel de preferencia del 33% ($G=11.157$, $df=1$, $p=0.00083$) para el ensayo contra el vinagre de manzana, por lo que no cumple con la hipótesis planteada a pesar de que *D. suzukii* mostró una preferencia del 100% por Km+C1+C2 cuando se comparó con el fermentado acético Km+C1, por lo que no cumple con el criterio para seleccionarlo como atrayente debido a su bajo nivel de atracción cuando se evaluó junto al vinagre de manzana.

En la Figura 39 se muestran los resultados de las hembras, se observa que *D. suzukii* tuvo una preferencia del 66% ($G=11.157$, $df=1$, $p=0.00083$) por Km+C1+C2 con respecto al vinagre de manzana, por lo que este fermentado cumple con el criterio para seleccionarlo como atrayente para la hembra. Debido a eso, este fermentado se considera un tratamiento prometedor para la atracción de la hembra. Otro aspecto interesante es que aparentemente el tratamiento alcohólico con Sc le llamó la atención, sin embargo, disminuyó conforme la fermentación cambió a la acética Sc+C1 y su homólogo acética final Sc+C1+C2, donde no hubo respuesta. Además, respecto a los tratamientos con *K. marxianus*, es posible observar que éste tratamiento tuvo mayor porcentaje de preferencia con respecto al alcohólico Km y al acético Km+C1. Por lo que, posiblemente la presencia de esta levadura y sus volátiles en conjunto con los de la bacteria C2, resultan en un aumento en la preferencia de la hembra que cuando se contaba sólo con el fermentado acético Km+C1.

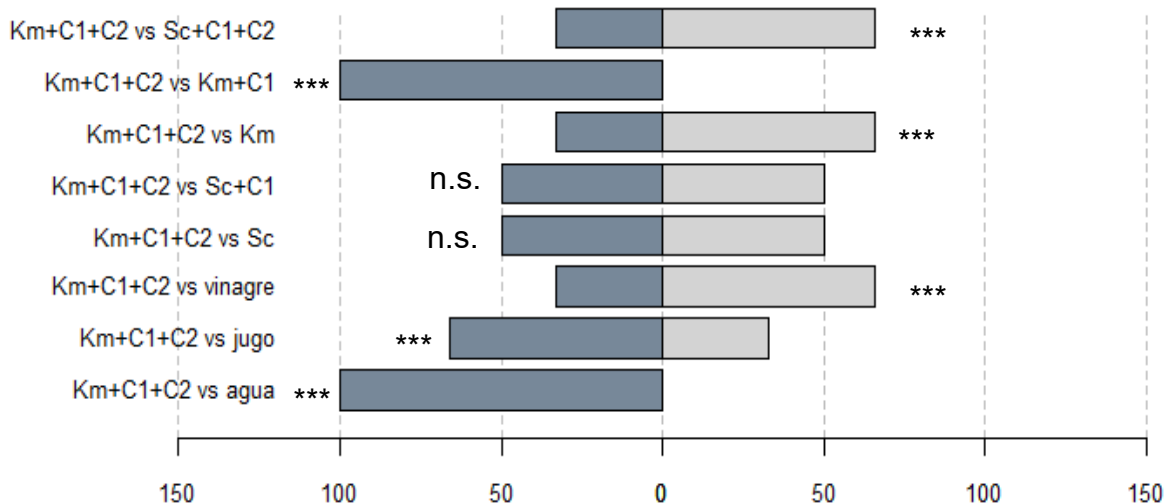


Figura 38. Porcentaje de preferencia del macho entre el fermentado acético de C1 y la adición de C2, previamente fermentado con *K. marxianus* y el resto de los tratamientos. Vinagre (vinagre de manzana), agua (agua destilada), jugo (jugo de zarzamora), Sc (fermentado alcohólico con *S. cerevisiae*), Sc+C1 (fermentado acético de C1, previamente fermentado con *S. cerevisiae*), Sc+C1+C2 (fermentado acético de C1 y la adición de C2, previamente fermentado con *S. cerevisiae*), Km (fermentado alcohólico con *K. marxianus*), Km+C1 (fermentado acético de C1, previamente fermentado con *K. marxianus*), Km+C1+C2 (fermentado acético de C1 y la adición de C2, previamente fermentado con *K. marxianus*). Datos de 48 machos y 48 hembras en total; se utilizaron 6 individuos para cada par de tratamientos. Los asteriscos denotan diferencia significativa en la prueba G con la corrección de Williams (***) $P < 0.001$, n.s. = no significativo).

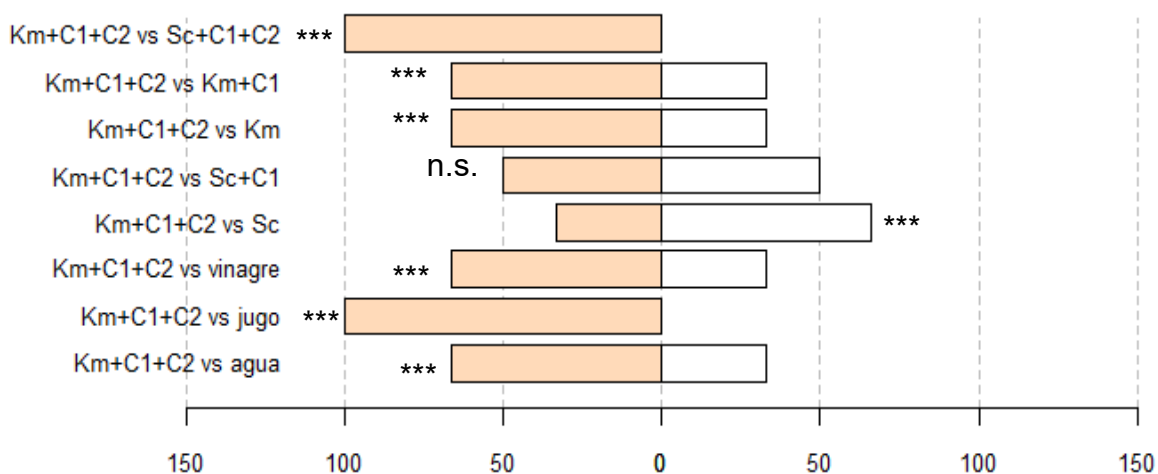


Figura 39. Porcentaje de preferencia de la hembra entre el fermentado acético de C1 y la adición de C2, previamente fermentado con *K. marxianus* y el resto de los tratamientos. Vinagre (vinagre de manzana), agua (agua destilada), jugo (jugo de zarzamora), Sc (fermentado alcohólico con *S. cerevisiae*), Sc+C1 (fermentado acético de C1, previamente fermentado con *S. cerevisiae*), Sc+C1+C2 (fermentado acético de C1 y la adición de C2, previamente fermentado con *S. cerevisiae*), Km (fermentado alcohólico con *K. marxianus*), Km+C1 (fermentado acético de C1, previamente fermentado con *K. marxianus*), Km+C1+C2 (fermentado acético de C1 y la adición de C2, previamente fermentado con *K. marxianus*). Datos de 48 machos y 48 hembras en total; se utilizaron 6 individuos para cada par de tratamientos. Los asteriscos denotan

diferencia significativa en la prueba G con la corrección de Williams (** $P < 0.001$, n.s. = no significativo).

7.4.6. Fermentado acético con C1 y C2 proveniente de *S. cerevisiae*

Como se observa en la Figura 40, el tratamiento Sc+C1+C2 no logró tener mayor preferencia con respecto al vinagre de manzana, lo que sugiere que no es un tratamiento adecuado para la atracción y captura de *D. sukuzii*. Únicamente, donde mostró tener mayor preferencia fue contra el fermentado alcohólico Sc y contra el acético Km+C1+C2, sin embargo, estos no son criterio de elegibilidad.

En la Figura 41, se muestra la preferencia de hembras por Sc+C1+C2 y se puede apreciar que este fermentado tuvo un buen desempeño con respecto a la mayoría de los tratamientos que se evaluaron, sin embargo, cuando se comparó contra el vinagre de manzana tan sólo hubo respuesta por el 50% de preferencia ($G=0$, $df=1$, $p=1$), lo cual deja en evidencia que este no es un tratamiento adecuado para la atracción de *D. sukuzii*.

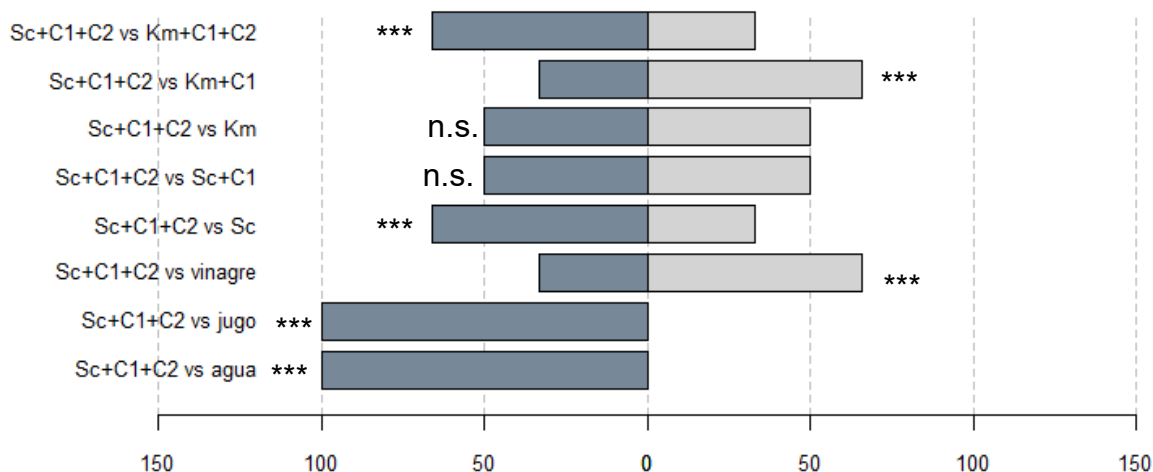


Figura 40. Porcentaje de preferencia del macho entre el fermentado acético de C1 y la adición de C2, previamente fermentado con *S. cerevisiae* y el resto de los tratamientos. Vinagre (vinagre de manzana), agua (agua destilada), jugo (jugo de zarzamora), Sc (fermentado alcohólico con *S. cerevisiae*), Sc+C1 (fermentado acético de C1, previamente fermentado con *S. cerevisiae*), Sc+C1+C2 (fermentado acético de C1 y la adición de C2, previamente fermentado con *S. cerevisiae*), Km (fermentado alcohólico con *K. marxianus*), Km+C1 (fermentado acético de C1, previamente fermentado con *K. marxianus*), Km+C1+C2 (fermentado acético de C1 y la adición de C2, previamente fermentado con *K. marxianus*). Datos de 48 machos y 48 hembras en total; se utilizaron 6 individuos para cada par de tratamientos. Los asteriscos denotan diferencia significativa en la prueba G con la corrección de Williams (** $P < 0.001$, n.s. = no significativo).

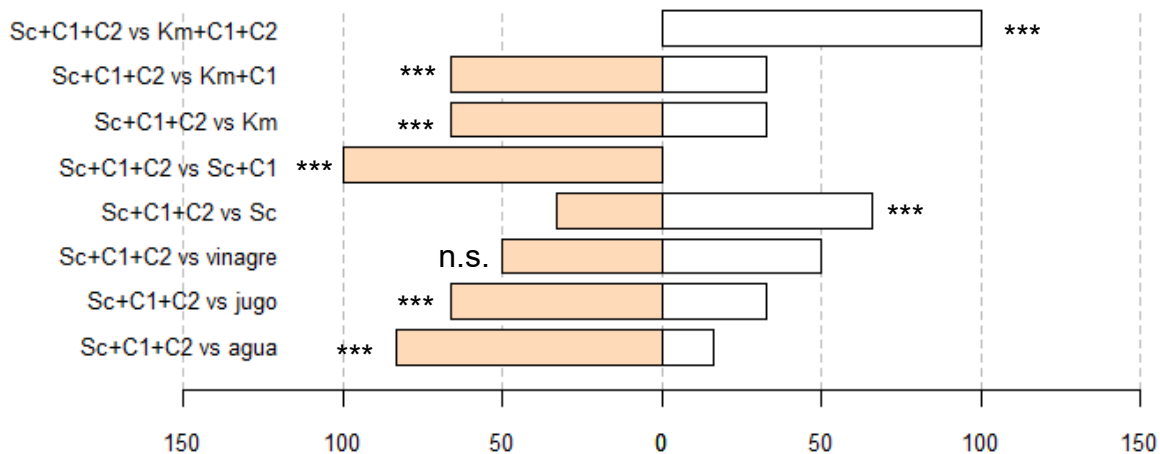


Figura 41. Porcentaje de preferencia de la hembra entre el fermentado acético de C1 y la adición de C2, previamente fermentado con *S. cerevisiae* y el resto de los tratamientos. Vinagre (vinagre de manzana), agua (agua destilada), jugo (jugo de zarzamora), Sc (fermentado alcohólico con *S. cerevisiae*), Sc+C1 (fermentado acético de C1, previamente fermentado con *S. cerevisiae*), Sc+C1+C2 (fermentado acético de C1 y la adición de C2, previamente fermentado con *S. cerevisiae*), Km (fermentado alcohólico con *K. marxianus*), Km+C1 (fermentado acético de C1, previamente fermentado con *K. marxianus*), Km+C1+C2 (fermentado acético de C1 y la adición de C2, previamente fermentado con *K. marxianus*). Datos de 48 machos y 48 hembras en total; se utilizaron 6 individuos para cada par de tratamientos. Los asteriscos denotan diferencia significativa en la prueba G con la corrección de Williams (*** $P < 0.001$, n.s. = no significativo).

7.4.7. Confrontación entre el vinagre de manzana y los fermentados de zarzamora

A continuación, se recopilaron los ensayos donde se tiene al vinagre de manzana contra el resto de los tratamientos. Como se puede observar en la Figura 42 los machos tuvieron una mayor preferencia por el fermentado alcohólico con *K. marxianus* y por el fermentado acético que proviene de esa misma levadura de origen y la adición de la bacteria C1 (Km+C1) con un 83% de preferencia para ambos ($G=49.41$, $df=1$, $p < 0.0001$). Sin embargo, el fermentado alcohólico Km tuvo una mejor respuesta cuando se evaluó contra el resto de los fermentados e incluso contra Km+C1 (Figura 30). Por lo que se puede decir que el fermentado alcohólico de *Kluyveromyces marxianus* es un candidato para la atracción del macho a nivel laboratorio.

El único fermentado donde se observó que hubo mayor preferencia para las hembras (Figura 43) fue por el acético que incluye a C2 y con la levadura de

origen *K. marxianus* (Km+C1+C2), con un 66% (G=11.157, df=1, p=0.00083) de preferencia sobre el vinagre de manzana. Al ser este el único tratamiento en las hembras con un nivel de respuesta que cumple con la hipótesis planteada, se puede decir que hasta este nivel de estudio, presenta resultados alentadores para su atracción. Además, con respecto al resto de los tratamientos tuvo un buen desempeño ya que se seleccionó en la mayoría de los ensayos donde se evaluó.

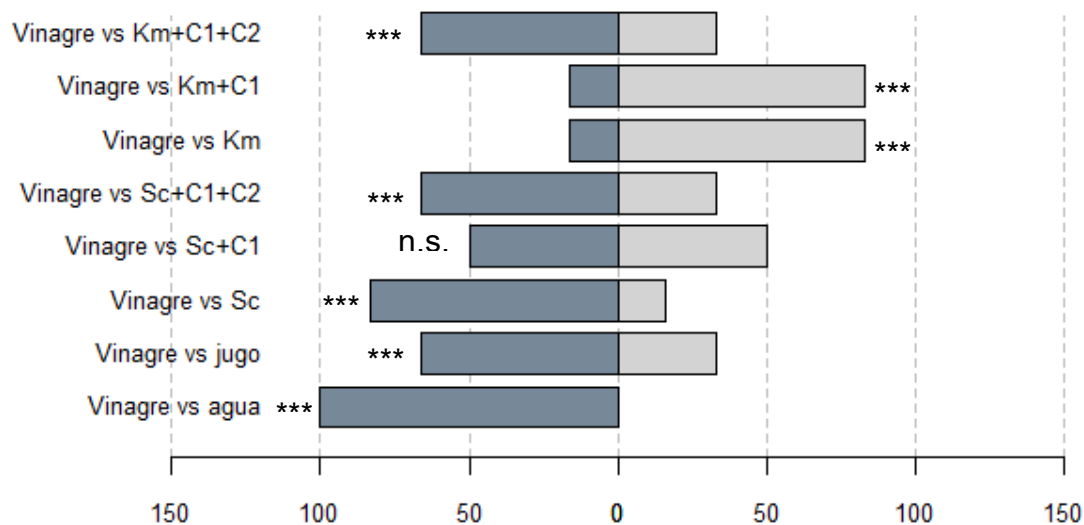


Figura 42. Porcentaje de preferencia del macho entre el vinagre de manzana y el resto de los tratamientos. Vinagre (vinagre de manzana), agua (agua destilada), jugo (jugo de zarzamora), Sc (fermentado alcohólico con *S. cerevisiae*), Sc+C1 (fermentado acético de C1, previamente fermentado con *S. cerevisiae*), Sc+C1+C2 (fermentado acético de C1 y la adición de C2, previamente fermentado con *S. cerevisiae*), Km (fermentado alcohólico con *K. marxianus*), Km+C1 (fermentado acético de C1, previamente fermentado con *K. marxianus*), Km+C1+C2 (fermentado acético de C1 y la adición de C2, previamente fermentado con *K. marxianus*). Datos de 48 machos y 48 hembras en total; se utilizaron 6 individuos para cada par de tratamientos. Los asteriscos denotan diferencia significativa en la prueba G con la corrección de Williams (***) $P < 0.001$, n.s. = no significativo).

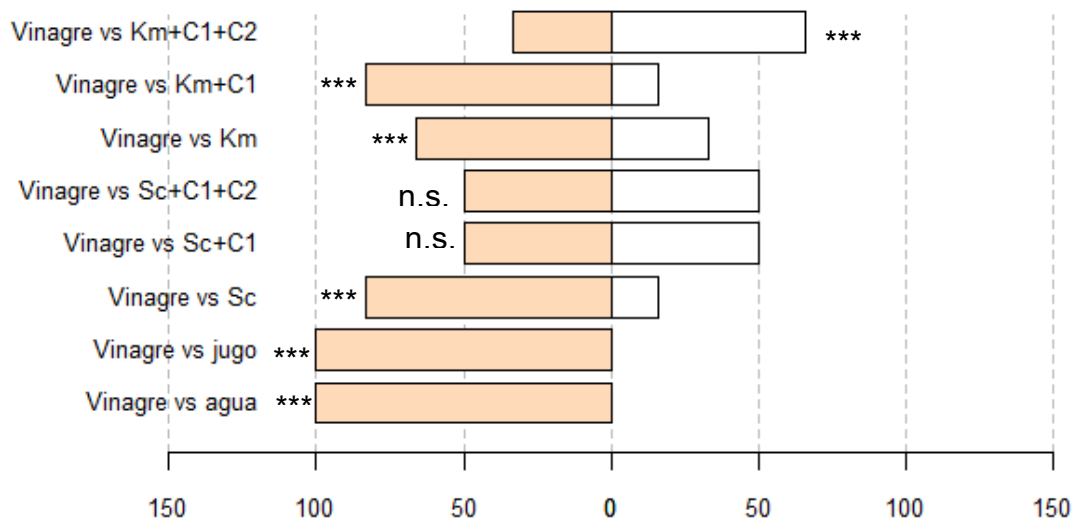


Figura 43. Porcentaje de preferencia de la hembra entre el viangre de manzana y el resto de los tratamientos. Vinagre (vinagre de manzana), agua (agua destilada), jugo (jugo de zarzamora), Sc (fermentado alcohólico con *S. cerevisiae*), Sc+C1 (fermentado acético de C1, previamente fermentado con *S. cerevisiae*), Sc+C1+C2 (fermentado acético de C1 y la adición de C2, previamente fermentado con *S. cerevisiae*), Km (fermentado alcohólico con *K. marxianus*), Km+C1 (fermentado acético de C1, previamente fermentado con *K. marxianus*), Km+C1+C2 (fermentado acético de C1 y la adición de C2, previamente fermentado con *K. marxianus*). Datos de 48 machos y 48 hembras en total; se utilizaron 6 individuos para cada par de tratamientos. Los asteriscos denotan diferencia significativa en la prueba G con la corrección de Williams (*** $P < 0.001$, n.s. = no significativo).

7.5. Ensayo de múltiple elección en semi-campo

Con el objetivo de escalar el bioensayo y evaluar la respuesta de *D. sukuzii* en condiciones menos controladas al emular un entorno natural, se llevó a cabo el ensayo en semi-campo. Sin embargo, debido a las condiciones climáticas que se presentaron durante el mes de Enero del 2020 (como velocidad del viento, bajas temperaturas y precipitaciones), el nivel de respuesta de los ocho ensayos fue bajo. De acuerdo con lo reportado por Clymans et al., (2019), la preferencia olfativa de *D. sukuzii* no sólo depende del estado fisiológico de la mosca, sino también de variables extrínsecas como la época del año y la temperatura media, ya que mediante un año de observación en campo determinaron que el “periodo de bajas capturas” se da entre los meses de noviembre a mayo, mismo que se reflejó en la baja eficiencia de captura de sus trampas durante ese periodo (menor al 12% de capturas) en contraste con el resto del año. En la Figura 44 se observa

mediante agrupación de los datos de los ocho ensayos que el 59% con la etiqueta “sin respuesta”, corresponde a las moscas que sobrevivieron después de 23.5 horas de exposición en las jaulas, y que no las capturó el sistema de trapeo. El 41% restante con la leyenda “Capturados” corresponde a las moscas tanto hembras como machos que sí entraron al sistema de trapeo que se mostró previamente en la Figura 13. Del porcentaje de capturados, la mayoría fueron hembras con un 65% y el resto corresponde a los machos, esto es positivo ya que las hembras son las que realizan el daño directo a la frutilla por lo que se considera a la hembra como el objetivo de captura con mayor interés. Esta relación de captura que se observa entre hembras y machos (Figura 44) es muy similar a lo reportado por Cruz et al., (2020) cuando evaluaron diferentes diseños de trampas y atrayentes en cultivos de zarzamora, fresa, frambuesa y arándano en condiciones de campo en colaboración con Koppert Development Institute Berries en Tiripetío, Michoacán.

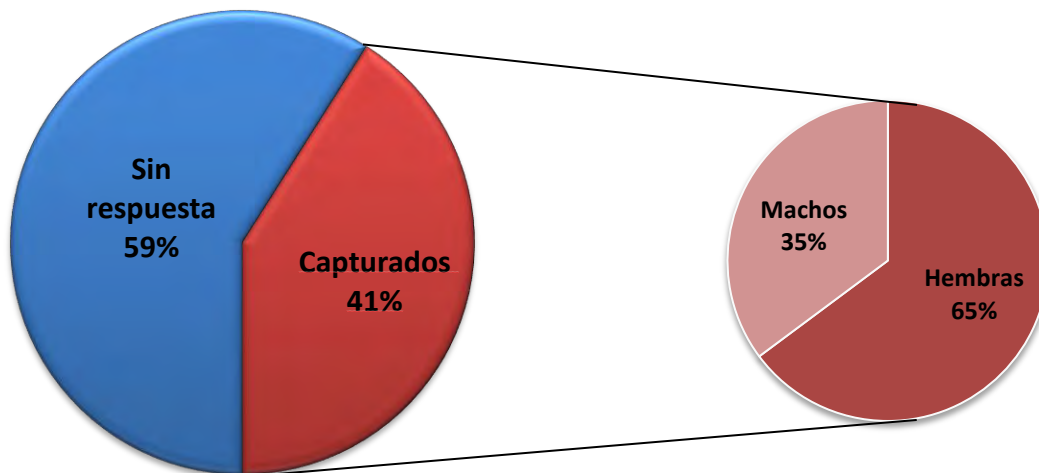


Figura 44. Capturas (porcentaje agrupado) en ensayo de semi-campo.

Debido a que la mayoría de los resultados de este ensayo no lograron diferencia significativa $p > 0.05$ en el test de ANOVA, no se mostrarán esos resultados con

excepción del único donde sí se encontraron diferencias significativas, correspondiente al ensayo donde se evaluaron el agua, vinagre de manzana, jugo de zarzamora y fermentado acético Km+C1 simultáneamente. Como se observa en la Figura 45, el fermentado acético tuvo un nivel de captura promedio de 2.56 moscas (los datos se transformaron con la raíz cuadrada más 0.5) el cual fue el más alto y el que mostró diferencia significativa con la prueba LSD de Fisher, con un intervalo de confianza del 95%.

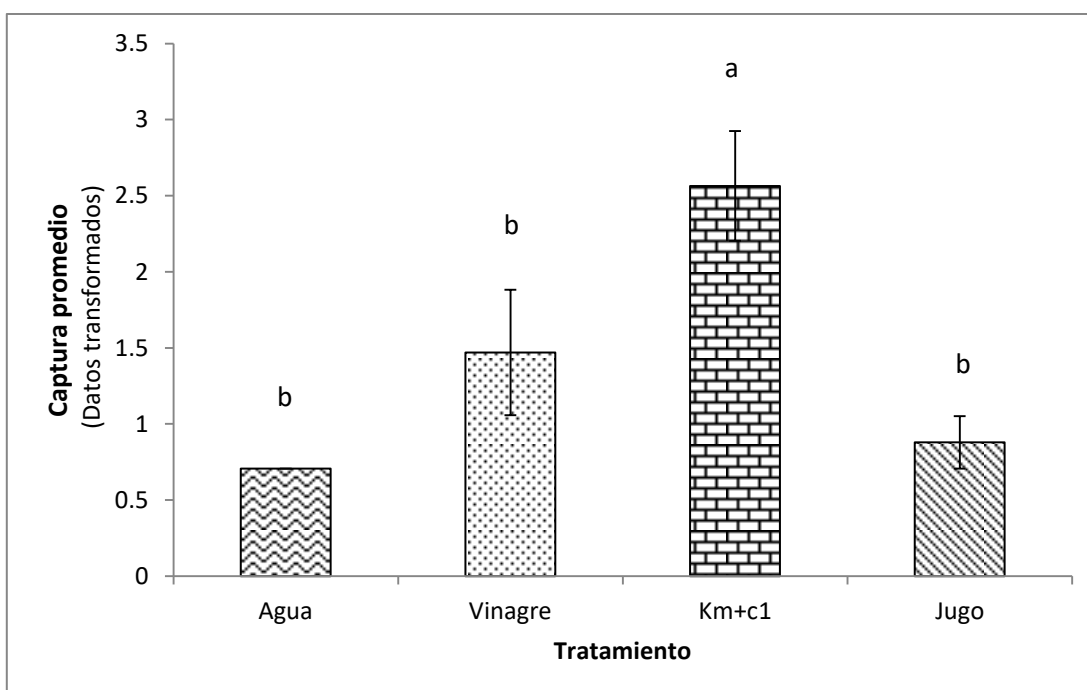


Figura 45. Captura promedio de *D. sukuii* en ensayo de múltiple elección en semi-campo. Los datos que se muestran son promedio de tres réplicas \pm error estándar. Los datos se transformaron con la raíz cuadrada más 0.5 para lograr normalidad. LSD Fisher $\alpha=0.05$, $p=0.0071$.

Esto revela que bajo las condiciones en las que se realizó este ensayo, el fermentado de zarzamora Km+C1 tiene un efecto de atracción en *D. sukuii* superior al que presenta el vinagre de manzana ($p=0.0071$). Estos resultados concuerdan con la respuesta de los machos en los ensayos de olfatometría, donde la preferencia por este tratamiento fermentado fue del 83% con respecto al vinagre de manzana.

7.6. Caracterización de volátiles por GC-MS

Se recurrió a la herramienta Escalamiento Multidimensional No Métrico (NMDS, por sus siglas en inglés) para realizar un análisis de ordenación de datos; método que se basa en la disimilitud (cuanto más semejantes sean los tratamientos, más próximos estarán en el espacio en una representación gráfica de n-dimensiones, tales que el *stress* sea mínimo pero sin dificultar su interpretación (Carrión, 1985). A partir de los datos de la matriz de áreas de los 21 cromatogramas que se analizaron, se generó la Figura 46 donde se observaron tres regiones ampliamente definidas: el grupo de los controles o jugos de zarzamora en la parte superior izquierda, una segunda región correspondiente a los fermentados alcohólicos donde se agruparon los fermentados con las levaduras *K. marxianus* y *S. cerevisiae* en la parte inferior izquierda y el tercer grupo corresponde a los fermentados acéticos donde se observa que los tratamientos con ambas levaduras y con C1 y C2 se encuentran muy próximos entre sí, lo cual indica que el perfil de volátiles en esos cuatro tratamientos es muy similar y que la presencia de C2 no modificó el perfil aromático de manera drástica. Este análisis pone en evidencia que de manera matemática y estadística no es posible diferenciar entre los volátiles que se produjeron por cada levadura, mientras que de manera biológica *D. suzukii* es capaz de encontrar diferencias sutiles de acuerdo con los resultados que se mostraron por olfatometría, donde quedó en evidencia que hubo una discriminación entre los tratamientos con *K. marxianus* y *S. cerevisiae*.

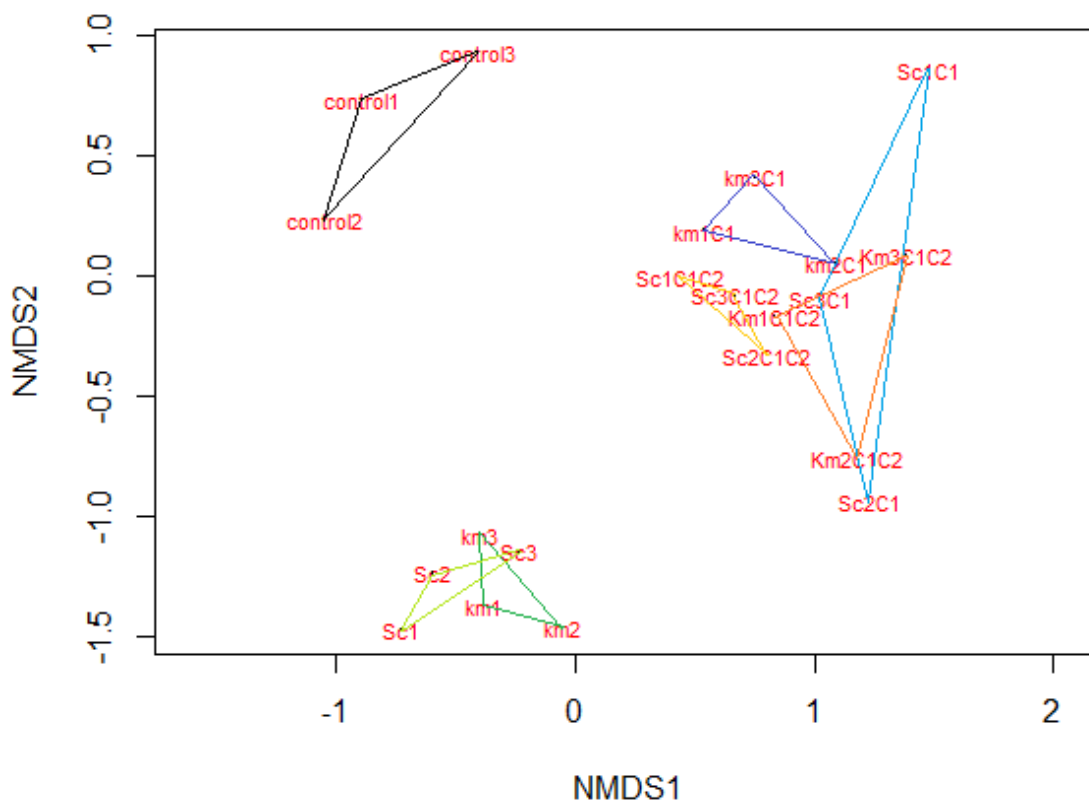


Figura 46. Ordenación de fermentados por su identidad química. Stress=0.13.

Además, se empleó un algoritmo para la elaboración de un mapa de calor y representar de forma visual la concentración de las moléculas identificadas (eje de las abscisas) en cada una de las muestras analizadas (eje de las ordenadas). A mayor intensidad de color, mayor concentración de dicha molécula. Como se aprecia en la Figura 47 la mayoría de los terpenoides aparecen con mayor intensidad en el jugo de zarzamora, ya que son moléculas que se encuentran típicamente en plantas (Du et al., 2010). En los fermentados alcohólicos se observan moléculas como alcoholes y ésteres, mientras que en los fermentados acéticos predominan los ácidos orgánicos. El dendrograma relaciona al fermentado alcohólico de ambas levaduras entre sí, y estos a su vez con el jugo de zarzamora, lo cual indica que estos fermentados conservan parte de la huella química del jugo, ya que este es su medio basal. Por otro lado, el perfil de volátiles de los fermentados acéticos es totalmente diferente al del jugo y al de los fermentados alcohólicos. Además, se agruparon por levadura independientemente

de C1 y C2. Para la realización del dendograma se utilizó la distancia de bray-curtis.

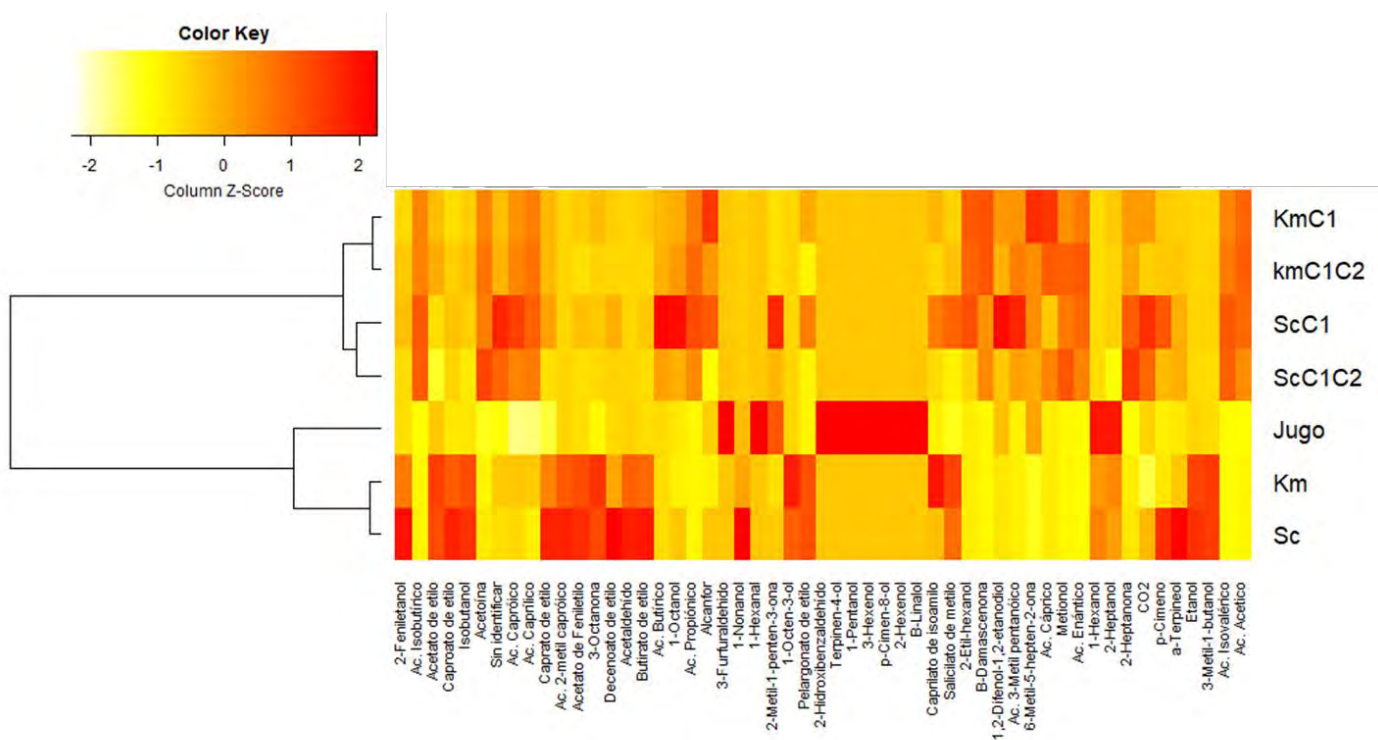


Figura 47. Mapa de calor de la concentración molecular de los fermentados.

Las moléculas identificadas para cada tratamiento, así como su concentración promedio se expresó en porcentaje de área como se muestra en la Tabla 6. Se tomó como base de cálculo el área total de los picos cromatográficos para cada fermentado. La identificación putativa se realizó por medio de la librería NIST-MS. Es importante mencionar que muchas de estas moléculas se reportaron con anterioridad por Bueno et al., (2019); Du et al., (2010); Jacques et al., (2014).

A continuación se presentan algunos cromatogramas representativos de cada grupo. El primer cromatograma en la Figura 48, corresponde al jugo de zarzamora sin fermentar, donde se señalan algunas de las principales moléculas volátiles que componen a este tratamiento e incluso algunas de las moléculas identificadas son típicas de la zarzamora (Jacques et al., 2014) como se muestra en el Anexo 2.

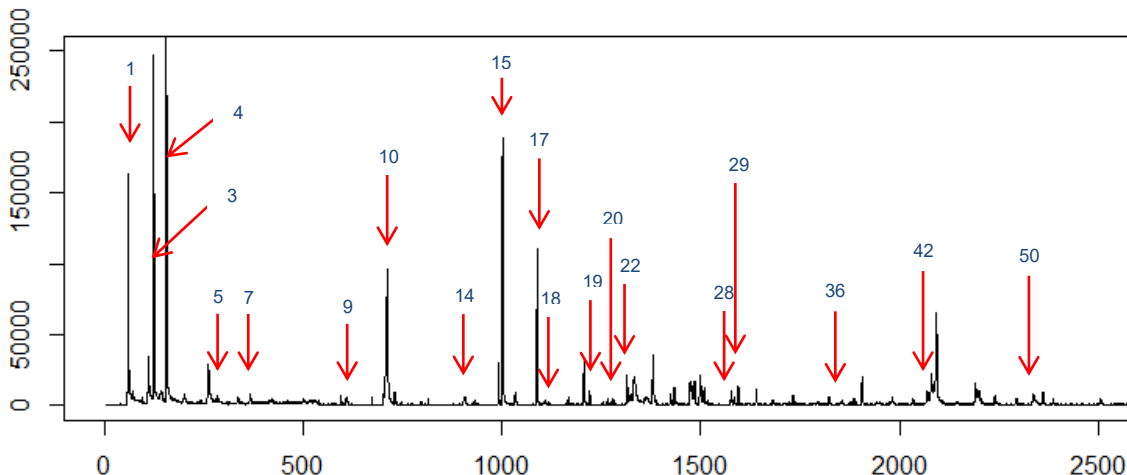


Figura 48. Cromatograma del jugo de zarzamora. En el eje horizontal se mide el tiempo de retención en segundos y en el eje vertical se mide la abundancia relativa en intensidad. Las condiciones del análisis se describen en metodología.

Algunos de los compuestos mayoritarios que se señalan en la Figura 48 corresponden a los picos 1, 3, 4, 10, 15 y 17 de la Tabla 6, los cuales representan hasta un 70% al jugo de zarzamora. Por otro lado, fue posible identificar algunos de los compuestos antena reportados por distintos autores como Abraham et al. (2015); Cha et al. (2012); Keeseey et al. (2015); Mazzetto et al. (2016) y Revadi et al. (2015) citados por Cloonan et al., (2018) en proporciones minoritarias. Los compuestos antena que se detectaron corresponden a los picos 3, 4, 5, 7, 9, 10, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 22, 28, 29, 36, 42 y 50 que se señalan.

En las Figuras 49 y 50 se muestran los cromatogramas correspondientes a los fermentados con *K. marxianus* y con *S. cerevisiae*, respectivamente. En ambas figuras el primer gráfico corresponde al fermentado alcohólico, en seguida el fermentado acético con C1 y finalmente, el fermentado acético de C1 con la adición de C2. Los picos que se señalan corresponden a los compuestos antena que se reportan por Cloonan et al., (2018). Es interesante notar que el 2-Metil-1-penten-3-ona es un compuesto que sólo se detectó con *S. cerevisiae* y dado el bajo nivel de preferencia que tuvo *D. suzukii* por los fermentados con esa levadura, existe la posibilidad de que ese compuesto esté implicado en la respuesta biológica. Algunos otros compuestos como el 1-hexanol y 1-octen-3-ol

(compuestos antenna) y ác. 2-metil-caprónico se detectaron exclusivamente en los fermentados alcohólicos, mientras que el metionol y ác. isovalérico (compuestos antenna) y el ác. butírico, ác. enántico, entre otros, son compuestos que se formaron durante la fermentación acética con C1 y que tuvieron cambios en su concentración durante la fermentación con C2.

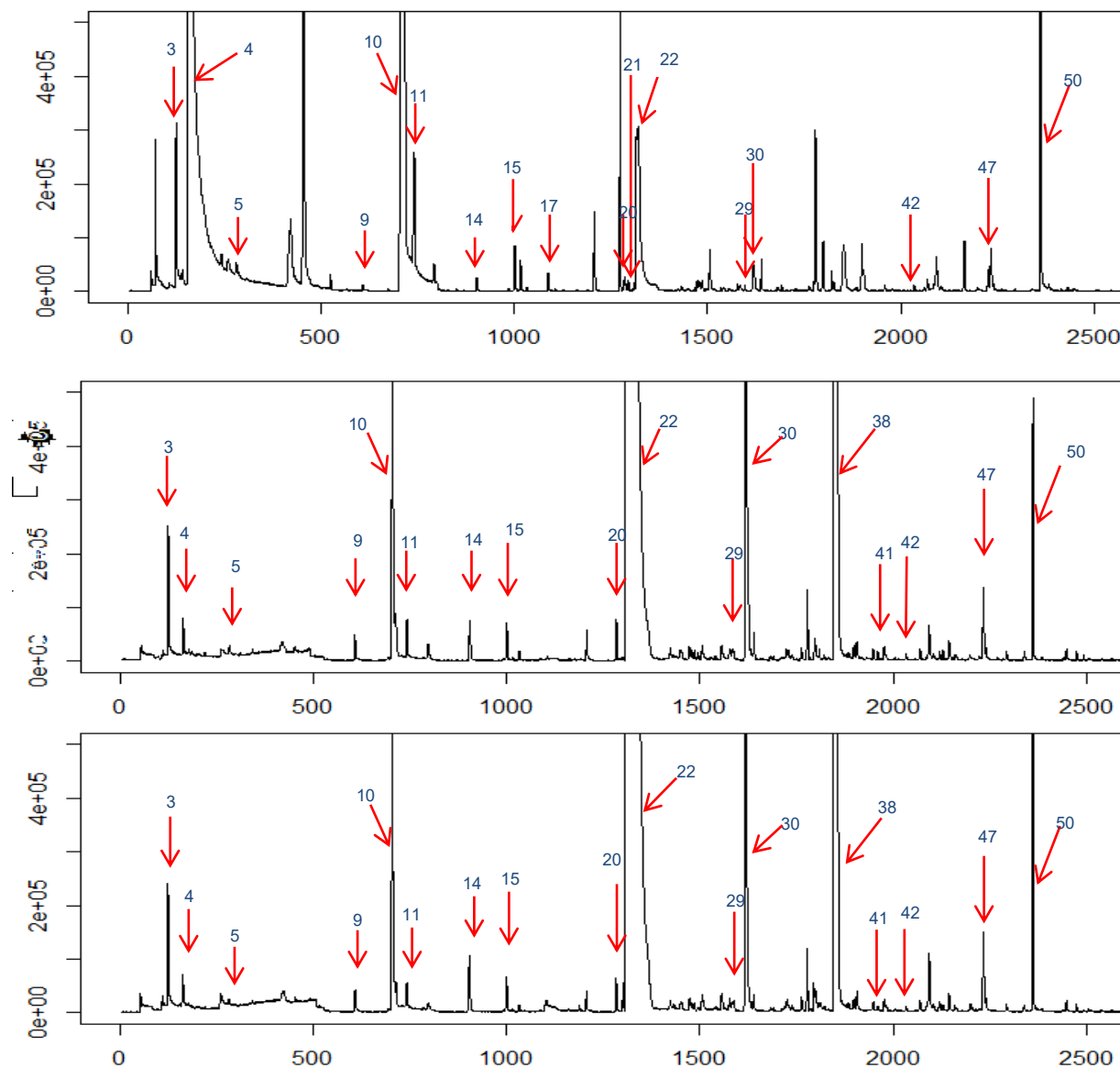


Figura 49. Cromatograma del fermentado alcohólico, acético con C1 y acético con C1 y C2 provenientes de *K. marxianus*. En el eje horizontal se mide el tiempo de retención en segundos y en el eje vertical se mide la abundancia relativa en intensidad. Las condiciones del análisis se describen en metodología.

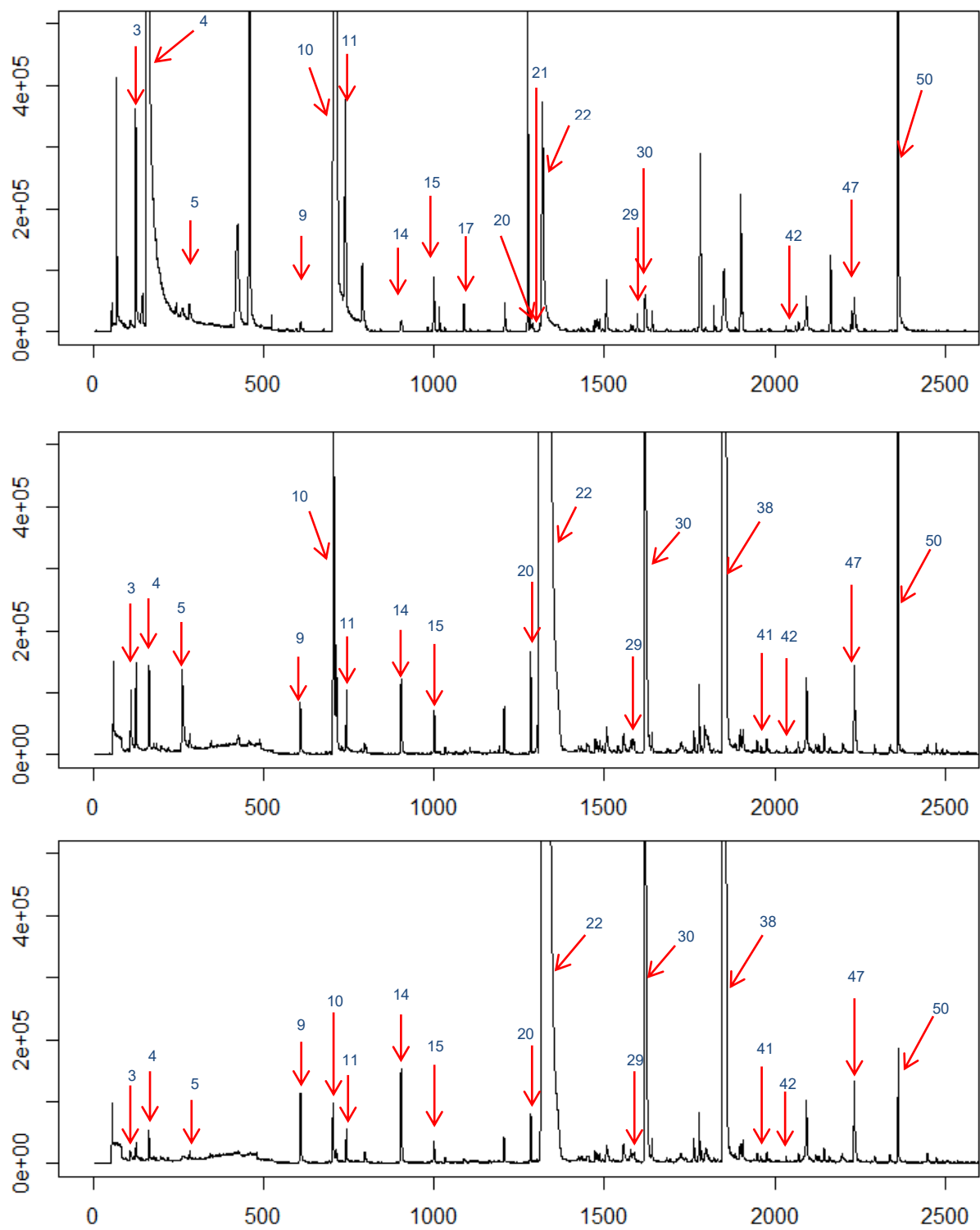


Figura 50. Cromatograma del fermentado alcohólico, acético con C1 y acético con C1 y C2 provenientes de *S. cerevisiae*. En el eje horizontal se mide el tiempo de retención en segundos y en el eje vertical se mide la abundancia relativa en intensidad. Las condiciones del análisis se describen en metodología.

Tabla 6. Compuestos volátiles de los fermentados. Análisis de compuestos volátiles para cada tratamiento, por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

Compuesto No.	RT (min)	Nombre	<u>Jugo</u>		<u>Km</u>		<u>Sc</u>		<u>Km+C1</u>		<u>Sc+C1</u>		<u>Km+C1+C2</u>		<u>Sc+C1+C2</u>		Clasificación
			% Área	%Error	% Área	%Error	% Área	%Error	% Área	%Error	% Área	%Error	% Área	%Error	% Área	%Error	
1	0.96	Dióxido de carbono	4.593	8.71	0.117	0.45	0.202	0.34	0.175	0.68	0.223	0.11	0.123	0.27	0.224	0.37	N/D
2	1.23	Acetaldehído	0.810	2.09	0.685	0.44	0.911	1.56	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	Aldehído
3	2.09	Acetato de etilo	17.101	6.49	1.786	1.36	1.456	0.83	0.544	1.66	0.334	0.20	0.578	0.92	0.172	0.50	Éster
4	2.68	Etanol	14.735	16.42	26.426	31.56	26.039	28.39	0.358	0.41	0.226	0.51	0.264	0.53	0.187	0.67	Alcohol
5	4.72	Butirato de etilo	1.214	0.39	0.645	1.43	0.935	1.82	0.087	0.72	0.085	0.22	0.043	0.81	0.027	0.67	Éster
6	5.69	2-Metil-1-penten-3-ona	1.168	1.61	N/D	N/D	0.006	0.005	N/D	N/D	0.036	0.15	N/D	N/D	0.009	0.02	Cetona
7	6.13	1-Hexanal	2.080	3.29	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	Aldehído
8	7.16	Isobutanol	0.832	2.75	1.812	0.63	1.815	0.83	0.191	1.39	0.159	0.84	0.272	2.62	N/D	N/D	Alcohol
9	10.14	2-Heptanona	0.806	0.63	0.062	0.31	0.066	0.14	0.131	0.14	0.166	0.16	0.110	0.25	0.242	0.58	Cetona
10	11.79	3-Metil-1-butanol	8.486	11.99	49.379	37.23	41.685	19.44	1.056	6.34	1.641	5.34	1.723	7.31	0.209	0.54	Alcohol
11	12.38	Caproato de etilo	N/D	N/D	1.453	6.98	1.738	3.51	0.081	0.58	0.201	0.18	0.152	0.84	0.115	0.18	Éster
12	13.28	3-Octanona	N/D	N/D	0.530	0.79	0.409	1.06	0.102	0.07	0.071	0.09	0.065	0.62	0.058	0.09	Cetona
13	13.69	1-Pentanol	0.268	0.17	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	Alcohol
14	15.08	Acetoina	0.714	0.31	0.099	0.09	0.116	0.18	0.295	0.39	0.265	0.16	0.310	0.29	0.445	0.76	Cetona
15	16.68	2-Heptanol	13.697	11.81	0.361	0.47	0.275	0.27	0.152	0.34	0.122	0.09	0.131	0.26	0.080	0.08	Alcohol
16	17.22	6-Metil-5-hepten-2-ona	0.742	0.82	N/D	N/D	N/D	N/D	0.046	0.06	0.022	0.01	0.024	0.22	0.020	0.02	Cetona
17	18.13	1-Hexanol	8.388	2.22	0.118	0.08	0.141	0.09	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	Alcohol
18	19.44	3-Hexenol	0.451	0.21	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	Alcohol

19	20.39	2-Hexenol	0.612	0.08	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	Alcohol
20	21.41	p-Cimeno	0.336	0.45	0.051	0.23	0.558	6.60	0.090	0.37	0.282	0.57	0.081	0.26	0.125	0.77		Terpenoide
21	21.63	1-Octen-3-ol	N/D	N/D	0.025	0.18	0.014	0.16	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	Alcohol
22	21.94	Ac. Acético	2.649	7.65	3.972	3.65	3.349	3.43	54.336	76.19	46.135	47.36	53.314	62.95	42.506	28.71		Ácido
23	23.00	3-Furfuraldehído	3.900	5.31	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	Aldehído
24	23.74	2-Etil-hexanol	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	0.077	0.08	0.070	0.35	0.067	0.13	0.013	0.04		Alcohol
25	24.60	Alcanfor	1.935	5.38	0.054	0.51	0.079	0.47	0.142	0.51	0.104	0.64	0.080	0.29	0.029	0.36		Terpenoide
26	25.70	Pelargonato de etilo	N/D	N/D	0.019	0.18	0.017	0.20	0.005	0.03	0.007	0.08	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	Éster
27	25.95	Ac. Propiónico	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	0.115	0.12	0.135	0.48	0.120	0.21	0.106	0.20		Ácido
28	26.29	B-Linalol	0.692	0.24	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	Terpenoide
29	26.49	1-Octanol	0.958	0.16	0.033	0.16	0.075	0.07	0.083	0.09	0.192	1.02	0.094	0.03	0.083	0.08		Alcohol
30	26.99	Ac. Isobutírico	N/D	N/D	0.238	0.07	0.302	0.28	3.368	0.64	3.882	3.04	3.202	2.60	4.642	1.41		Ácido
31	28.13	Terpinen-4-ol	0.259	0.17	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	Terpenoide
32	29.39	Ac. Butírico	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	0.039	0.20	0.176	1.09	0.042	0.40	0.060	0.74		Ácido
33	29.64	Caprato de etilo	N/D	N/D	0.697	2.04	1.007	2.18	0.294	0.47	0.297	1.23	0.257	0.35	0.172	0.52		Éster
34	30.35	Caprilato de isoamilo	0.132	0.77	0.113	0.29	0.026	0.31	0.021	0.22	0.034	0.34	0.011	0.21	0.010	0.26		Éster
35	30.50	1-Nonanol	0.252	0.80	0.024	0.22	0.111	0.69	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	Alcohol
36	30.97	2-Hidroxibenzaldehído	0.139	0.81	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	Aldehído
37	30.86	Ac. 2-Metil capríco	N/D	N/D	0.514	0.29	0.633	0.59	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	Ácido
38	30.81	Ac. Isovalérico	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	36.055	2.50	41.609	25.27	36.210	6.30	48.366	56.77		Ácido
39	31.66	Decenoato de etilo	N/D	N/D	0.271	1.36	0.929	1.79	0.033	0.07	0.120	0.84	0.018	0.35	0.024	0.59		Éster

40	31.77	α -Terpineol	2.233	0.56	0.192	0.15	0.654	4.03	0.108	0.17	0.145	0.38	0.111	0.19	0.173	1.17	Terpenoide
41	32.49	Metionol	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	0.030	0.15	0.030	0.08	0.038	0.12	0.045	0.02	Alcohol
42	34.50	Salicilato de metilo	0.902	2.64	0.108	0.13	0.080	0.04	0.037	0.26	0.053	0.39	0.039	0.05	0.031	0.02	Éster
43	34.89	Sin identificar *	7.056	4.85	0.403	0.67	0.315	0.12	0.278	0.42	0.392	0.88	0.271	0.33	0.399	0.52	ND
44	35.34	Ac. 3-Metil pentanóico	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	0.040	0.03	0.074	0.63	0.045	0.07	0.035	0.05	Ácido
45	35.76	β -Damascenona	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	0.090	0.01	0.047	0.09	0.081	0.07	0.061	0.09	Norisoprenoid
46	36.08	Acetato de Feniletilo	N/D	N/D	0.395	0.07	0.411	0.42	0.034	0.03	0.048	0.29	N/D	N/D	N/D	N/D	Éster
47	37.23	Ac. Caprónico	N/D	N/D	0.352	0.22	0.251	0.26	0.349	0.37	0.466	1.29	0.357	0.56	0.408	0.33	Ácido
48	37.34	p-Cimen-8-ol	0.496	0.07	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	Terpenoide
49	38.24	1,2-Difenol-1,2-etanodiol	0.478	0.11	N/D	N/D	N/D	N/D	0.028	0.15	0.065	0.52	0.018	0.19	0.012	0.16	Alcohol
50	39.37	2-Feniletanol	0.886	0.04	8.637	7.28	15.155	19.33	0.515	3.08	1.539	4.59	1.149	7.65	0.304	2.18	Alcohol
51	40.81	Ac. Enántico	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	0.045	0.07	0.042	0.02	0.050	0.15	0.042	0.12	Ácido
52	44.26	Ac. Caprílico	N/D	N/D	0.429	0.47	0.239	0.60	0.496	0.87	0.494	0.37	0.499	1.42	0.523	0.30	Ácido
53	50.66	Ac. Cáprico	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	0.070	0.11	0.012	0.12	0.051	0.18	0.042	0.12	Ácido

Nota. **RT** corresponde al tiempo de retención en minutos. **Nombre** es el compuesto que se determinó por coincidencia de espectro de masas fragmentado con la librería NIST-MS. **% de área** es el promedio de tres ensayos independientes. Se usó como base de cálculo la suma del área bajo la curva de todos los compuestos identificados para cada tratamiento, previamente depurados. **% de error** corresponde al error estándar en porcentaje. * Compuesto no identificado. **N/D** no determinado.

En la Tabla 6 se observa que entre los fermentados con C1 y C2 se identificaron los mismos compuestos, es decir, que la presencia de C2 no contribuyó con la síntesis de moléculas adicionales como se pensó en un principio, por otro lado, se observa variación en la concentración relativa de los compuestos; en algunos casos aumentó y en otros disminuyó lo cual provocó una distinción con respecto al fermentado que se inoculó únicamente con C1, esto se reflejó ya que *D. suzukii* fue capaz de hacer esa distinción durante los bioensayos. Además, al no encontrar grandes diferencias entre los volátiles que se produjeron por *K. marxianus* y *S. cerevisiae* pero sí en el bioensayo de olfatometría, podría deberse a que *D. suzukii* se encuentre atraída por la especie de levadura (Scheidler et al., 2015).

Para elucidar la participación de los volátiles con la respuesta de *D. suzukii* en el bioensayo de olfatometría de tubo en “Y” realizó un análisis de componentes principales en el software STATISTICA 7.0. A fin de llevar a cabo dicho análisis se utilizó la frecuencia con que *D. suzukii* eligió cada tratamiento y la abundancia relativa correspondiente a cada molécula que se identificó en los cromatogramas. Como se observa en la Figura 51-A, el vector que representa la respuesta de los machos de *D. suzukii*, se encuentra donde se grafican la componente 2 (24.54% de varianza explicada) y la componente 4 (4.89% de varianza explicada) el cual tomó una disposición espacial en las coordenadas -0.55, -0.48 respecto del origen (0,0). Al respecto, las moléculas que se encuentran cercanas a este vector corresponden al caprilato de isoamilo, 3-octanona y ác. cáprico, marcadas en color morado.

El PCA donde se encuentra mejor definido el vector de preferencia de las hembras se muestra en la Figura 51-B en las coordenadas -0.40, 0.037 respecto del origen (0,0) con la componente 3 (11.41% de varianza explicada) y componente 4 (4.89% de varianza explicada). La correlación se muestra con moléculas como β -damascenona y ác. enántico, (compuestos típicos del bouquet de vinos y fermentados) que se marcan en morado, mientras que en verde se muestran

algunas de las moléculas con reportes de actividad antenal (Cha et al., 2018) e.g. metionol, acetoína, 2-feniletanol, ác. acético y etanol (Anexo 1).

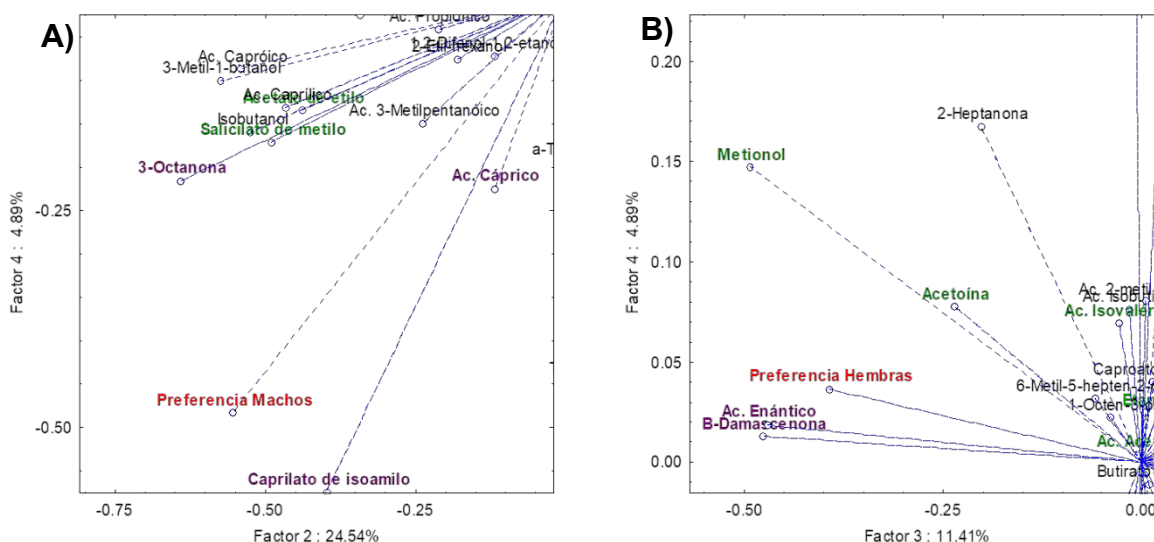


Figura 51. Análisis de componentes principales. A) mejor correlación del vector en machos en las componentes 2 y 4 (izquierdo), B) mejor correlación del vector en hembras en las componentes 3 y 4 (derecho). En verde compuestos con reportes antenalmente activos, en morado moléculas sin reportes sobre su actividad antenal y que se encuentran mejor correlacionados con los vectores de preferencia.

A la fecha, no hay registros de ensayos de electroantenografía u olfatometría con moléculas como β -damascenona, ác. enántico, caprilato de isoamilo, 3-octanona y ác. cáprico. No obstante, este trabajo deja en evidencia su posible participación en la atracción de *D. suzukii* sin olvidar que pertenecen a una mezcla compleja de moléculas en las que se involucran varios factores, como la presencia o ausencia de otras moléculas y cambios en la concentración de tal manera que se consideren como un conjunto de requisitos (influencia de la matriz) que debe incluir el atrayente y no de forma individual. Como sucedió en el grupo de trabajo de Abraham et al., (2015) en el que identificaron 11 compuestos antenalmente activos para *D. suzukii* provenientes de un extracto de frambuesas mediante GC-EAD, posteriormente evaluaron la respuesta por olfatometría de una preparación sintética con esas 11 moléculas versus el extracto natural de frambuesa y tanto hembras como machos tuvieron una preferencia de más del 95% por el extracto natural de frambuesa que por el sintético.

VIII. CONCLUSIÓN

Los vinagres de zarzamora obtenidos con *Kluyveromyces marxianus* y la bacteria C1, presentaron una mayor atracción en los machos de *D. sukii* en comparación al vinagre de manzana, mientras que la adición de la bacteria C2 en ese mismo fermentado promovió una mayor atracción para las hembras. Así mismo, algunas moléculas típicas de fermentación como el metionol, acetoína, β -damascenona y ácido enántico pudieran estar implicadas en la respuesta de las hembras, mientras que moléculas con aromas más afrutados como el caprilato de isoamilo y 3-octanona en la respuesta de los machos.

IX. PERSPECTIVAS

A partir de la información presentada en esta Tesis, las perspectivas de trabajos futuros se pueden dirigir en la siguiente dirección.

La primera dirección estaría enfocada en llevar a cabo estudios de laboratorio mediante la evaluación individual de moléculas sintéticas como β -damascenona, ácido enantico, 3-octanona, caprilato de isoamilo en ensayos comportamentales con *D. suzukii*.

Otro aspecto que sería interesante contemplar es la respuesta del díptero mediante estudios electrofisiológicos de caracterización de los fermentados Km+C1 y Km+C1+C2 mediante GC-EAD.

Tras llevar a cabo los estudios de laboratorio, la siguiente dirección estaría enfocada en realizar estudios de trampeo en campo durante las cuatro estaciones del año y de esa forma determinar la eficiencia y selectividad del atrayente.

X. REFERENCIAS

- Abraham, J., Zhang, A., Angeli, S., Abubeker, S., Michel, C., Feng, Y., & Rodriguez-Saona, C. (2015). Behavioral and Antennal Responses of *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) to Volatiles From Fruit Extracts. *Environmental Entomology*, 44(2), 356–367. <https://doi.org/10.1093/ee/nvv013>
- AOAC International, A. I. (1990). *AOAC: Official Methods of Analysis (Volume 2)* (15a ed., Vol. 2).
- Bueno, E., Martin, K. R., Raguso, R. A., McMullen, J. G., Hesler, S. P., Loeb, G. M., & Douglas, A. E. (2019). Response of Wild Spotted Wing *Drosophila (Drosophila suzukii)* to Microbial Volatiles. *Journal of Chemical Ecology*. <https://doi.org/10.1007/s10886-019-01139-4>
- Burrack, H. J., Asplen, M., Bahder, L., Collins, J., Drummond, F. A., Guedot, C., Isaacs, R., Johnson, D., Blanton, A., Lee, J. C., Loeb, G., Rodriguez-Saona, C., van Timmeren, S., Walsh, D., & McPhie, D. R. (2015). Multistate Comparison of Attractants for Monitoring *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) in Blueberries and Caneberries. *Environmental Entomology*, 44(3), 704–712. <https://doi.org/10.1093/ee/nvv022>
- Caridad, L. (23-27 de septiembre de 2019). *Técnicas para la investigación en ecología química de insectos* [Discurso principal] Curso de técnicas para la investigación en ecología química de insectos. El colegio de la frontera sur, Unidad Tapachula, Chiapas.
- Carrión, J. J. S. (1985). Introducción al análisis multidimensional no-métrico. *Reis*, 29, 187. <https://doi.org/10.2307/40183090>

- Cha, D. H., Adams, T., Rogg, H., & Landolt, P. J. (2012). Identification and Field Evaluation of Fermentation Volatiles from Wine and Vinegar that Mediate Attraction of Spotted Wing Drosophila, *Drosophila suzukii*. *Journal of Chemical Ecology*, 38(11), 1419–1431. <https://doi.org/10.1007/s10886-012-0196-5>
- Cha, D. H., Loeb, G. M., Linn, C. E., Hesler, S. P., & Landolt, P. J. (2018). A Multiple-Choice Bioassay Approach for Rapid Screening of Key Attractant Volatiles. *Environmental Entomology*, 47(4), 946–950. <https://doi.org/10.1093/ee/nvy054>
- Clark, J. T., & Ray, A. (2016). Olfactory Mechanisms for Discovery of Odorants to Reduce Insect-Host Contact. *Journal of Chemical Ecology*, 42(9), 919–930. <https://doi.org/10.1007/s10886-016-0770-3>
- Cloonan, K. R., Abraham, J., Angeli, S., Syed, Z., & Rodriguez-Saona, C. (2018). Advances in the Chemical Ecology of the Spotted Wing Drosophila (*Drosophila suzukii*) and its Applications. *Journal of Chemical Ecology*, 44(10), 922–939. <https://doi.org/10.1007/s10886-018-1000-y>
- Clymans, R., Van Kerckvoorde, V., Bangels, E., Akkermans, W., Alhmedi, A., De Clercq, P., Beliën, T., & Bylemans, D. (2019). Olfactory Preference of *Drosophila suzukii* Shifts between Fruit and Fermentation Cues over the Season: Effects of Physiological Status. *Insects*, 10(7), 200. <https://doi.org/10.3390/insects10070200>
- Colomar, L. A. E. (2016). Métodos de control para *Drosophila suzukii* (Matsumura) (Diptera: Drosophilidae): una nueva plaga de frutales que se está extendiendo mundialmente. *Revista Agronómica del Noroeste Argentino*, 36

- (1), 19-31. Recuperado de <http://www.scielo.org.ar/pdf/ranar/v36n1/v36n1a02.pdf>
- Cruz, E. S., Garay, S. E., Rodríguez, C., & Rojas, J. C. (2020). The attractant, but not the trap design, affects the capture of *Drosophila suzukii* in berry crops. *Bulletin of Entomological Research*, 1–8. <https://doi.org/10.1017/S0007485320000401>
- Del Bo', C., Martini, D., Porrini, M., Klimis-Zacas, D., & Riso, P. (2015). Berries and oxidative stress markers: An overview of human intervention studies. *Food & Function*, 6(9), 2890–2917. <https://doi.org/10.1039/C5FO00657K>
- Deppenmeier, U., & Ehrenreich, A. (2009). Physiology of Acetic Acid Bacteria in Light of the Genome Sequence of *Gluconobacter oxydans*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 16(1–2), 69–80. <https://doi.org/10.1159/000142895>
- DGSV. (2014). Manual para el manejo fitosanitario de la mosca del vinagre de alas manchadas (*Drosophila suzukii* Matsumura). Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV). Dirección del Programa Nacional de Moscas de la Fruta. 18 p.
- Du, X., Finn, C. E., & Qian, M. C. (2010). Volatile composition and odour-activity value of thornless 'Black Diamond' and 'Marion' blackberries. *Food Chemistry*, 119(3), 1127–1134. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.024>
- EPPO. (2020). *Drosophila suzukii* (DROSSU) World distribution. European and Mediterranean Plant Organization (EPPO) Global Database. <https://gd.eppo.int/taxon/DROSSU/distribution>

- Espindola, J. L. (2017). *Respuesta olfativa del depredador Dicyphus hesperus (Hemiptera: Miridae) a volátiles de tomate infestado con Bactericera cockerelli*. [Tesis de maestría, Colegio de Postgraduados]. <http://colposdigital.colpos.mx:8080/jspui/handle/10521/4039>
- Food and Agriculture Organization. (1998). *¿Qué es el Manejo Integrado de Plagas?* Recuperado el 16 de junio de 2020, de <http://www.fao.org/Noticias/1998/ipm-s.htm>
- FAO (2016). *Glosario de Términos Fitosanitarios*. Food and Agriculture Organization (FAO). <http://www.fao.org/3/mc891s/mc891s.pdf>
- Figueroa, I. A. C. (2019). *Ethological control of the Mediterranean fruit fly Ceratitis capitata (Wied.)*. [Tesis de doctorado, Swedish University of Agricultural Sciences]. <https://pub.epsilon.slu.se/16175/>
- Funes, C., Kirschbaum, D., Escobar, L., & Heredia, A. (2018). *La mosca de las alas manchadas, Drosophila suzukii (Matsumura): Nueva plaga de las frutas finas en Argentina*. INTA Ediciones. Recuperado de https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_drosophila_suzukii_0.pdf
- Hernández, S. (23-27 de septiembre de 2019). *Olfatometría* [Discurso principal]. Curso de técnicas para la investigación en ecología química de insectos. El colegio de la frontera sur, Unidad Tapachula, Chiapas.
- Hernández, S., Rodríguez, E., Lomeli, J. R., Bueno, G., Cibrian, J., & Pérez, A. (2019). Searching behavior of the parasitoid Tamarixia triozae mediated by the host plant and experience. *BioControl*, 64(5), 529–538. <https://doi.org/10.1007/s10526-019-09953-1>

- Holopainen, J. K., & Blande, J. D. (2012). Molecular Plant Volatile Communication. En C. López-Larrea (Ed.), *Sensing in Nature* (Vol. 739, pp. 17–31). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1704-0_2
- Jacques, A. C., Chaves, F. C., Zambiasi, R. C., Brasil, M. C., & Caramão, E. B. (2014). Bioactive and volatile organic compounds in Southern Brazilian blackberry (*Rubus Fruticosus*) fruit cv. Tupy. *Food Science and Technology (Campinas)*, *34*(3), 636–643. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.6243>
- Karageorgi, M., Bräcker, L. B., Lebreton, S., Minervino, C., Cavey, M., Siju, K. P., Grunwald Kadow, I. C., Gompel, N., & Prud'homme, B. (2017). Evolution of Multiple Sensory Systems Drives Novel Egg-Laying Behavior in the Fruit Pest *Drosophila suzukii*. *Current Biology*, *27*(6), 847–853. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.01.055>
- Kollasch, A. M., Abdul-Kafi, A.-R., Body, M. J. A., Pinto, C. F., Appel, H. M., & Coccoft, R. B. (2020). Leaf vibrations produced by chewing provide a consistent acoustic target for plant recognition of herbivores. *Oecologia*, *194*(1–2), 1–13. <https://doi.org/10.1007/s00442-020-04672-2>
- Labrada, R., & Parker, C. (1996). El control de malezas en el contexto del manejo integrado de plagas. En *Manejo de Malezas para Países en Desarrollo. (Estudio FAO Producción y Protección Vegetal—120)* (1a ed., Vol. 1). FAO. <http://www.fao.org/3/t1147s05.htm>
- Landolt, P. J., Adams, T., & Rogg, H. (2012). Trapping spotted wing drosophila, *Drosophila suzukii* (Matsumura) (Diptera: Drosophilidae), with combinations of vinegar and wine, and acetic acid and ethanol: Trapping spotted wing

- drosophila. *Journal of Applied Entomology*, 136(1–2), 148–154.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2011.01646.x>
- Lasa, R., Tadeo, E., Toledo, R. A., Carmona, L., Lima, I., & Williams, T. (2017). Improved capture of *Drosophila suzukii* by a trap baited with two attractants in the same device. *PLOS ONE*, 12(11), e0188350.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188350>
- Lee, J. C., Burrack, H. J., Barrantes, L. D., Beers, E. H., Dreves, A. J., Hamby, K. A., Haviland, D. R., Isaacs, R., Richardson, T. A., Shearer, P. W., Stanley, C. A., Walsh, D. B., Walton, V. M., Zalom, F. G., & Bruck, D. J. (2012). Evaluation of Monitoring Traps for *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) in North America. *Journal of Economic Entomology*, 105(4), 1350–1357. <https://doi.org/10.1603/EC12132>
- Loera, E. (2019). *Clase de plagas de importancia agrícola* [Comunicación personal].
- Martinez, A. (2013). *Introducción a la Ecología Química y su uso en el Manejo de Insectos Plaga en Sistemas Forestales* (1a ed., Vol. 1). INTA Ediciones.
- Mazzi, D., Bravin, E., Meraner, M., Finger, R., & Kuske, S. (2017). Economic Impact of the Introduction and Establishment of *Drosophila suzukii* on Sweet Cherry Production in Switzerland. *Insects*, 8(1), 18.
<https://doi.org/10.3390/insects8010018>
- Pawliszyn, J. (2000). Theory of Solid-Phase Microextraction. *Journal of Chromatographic Science*, 38(7):270-278. doi: 10.1093/chromsci/38.7.270.
- Revadi, S., Vitagliano, S., Rossi Stacconi, M. V., Ramasamy, S., Mansourian, S., Carlin, S., Vrhovsek, U., Becher, P. G., Mazzoni, V., Rota-Stabelli, O.,

- Angeli, S., Dekker, T., & Anfora, G. (2015). Olfactory responses of *Drosophila suzukii* females to host plant volatiles. *Physiological Entomology*, 40(1), 54–64. <https://doi.org/10.1111/phen.12088>
- Rivas, G. (2016). *Manejo y Producción Forzada del Cultivo de Zarzamora*. Intagri. Recuperado el 28 de febrero de 2018 de <https://www.intagri.com/articulos/frutillas/manejo-y-produccion-forzada-del-cultivo-de-zarzamora>
- Rojas, J. C., León, J. C. R., Malo, E. A., & Rivera, E. A. M. (2012). *Temas selectos en ecología química de insectos*. El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR). <https://books.google.com.mx/books?id=QE60mAEACAAJ>
- SAG. (2017). *Drosófila de alas manchadas (Drosophila suzukii)*. Servicio Agrícola y Ganadero. Recuperado el 28 de febrero del 2018 de <https://www.sag.gob.cl/ambitos-de-accion/drososofila-de-alas-manchadas-drosophila-suzukii>
- SAGARPA. (2016). Importancia, biología y reconocimiento de la mosca del vinagre de alas manchadas (*Drosophila suzukii* Matsumura). Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). p 23.
- SAGARPA. (2017). *Planeacion agricola nacional 2017-2030: frutas del bosque arándano, frambuesa, zarzamora mexicanas*. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257076/Potencial-Frutas_del_Bosque.pdf
- Scheidler, N. H., Liu, C., Hamby, K. A., Zalom, F. G., & Syed, Z. (2015). Volatile codes: Correlation of olfactory signals and reception in *Drosophila*-yeast

- chemical communication. *Scientific Reports*, 5(1), 14059.
<https://doi.org/10.1038/srep14059>
- Schymanski, E. L., Jeon, J., Gulde, R., Fenner, K., Ruff, M., Singer, H. P., & Hollender, J. (2014). Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence. *Environmental Science & Technology*, 48(4), 2097–2098. <https://doi.org/10.1021/es5002105>
- SIAP. (2018). *Atlas agroalimentario 2012-2018*.
https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2018/Atlas-Agroalimentario-2018
- Skrovankova, S., Sumczynski, D., Mlcek, J., Jurikova, T., & Sochor, J. (2015). Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Different Types of Berries. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(10), 24673–24706.
<https://doi.org/10.3390/ijms161024673>
- Terrile, R. (2010). *Biopreparados para el manejo sostenible de plagas y enfermedades en la agricultura urbana y periurbana*. IPES-FAO.
<http://www.fao.org/3/as435s/as435s.pdf>
- Walsh, D. B., Bolda, M. P., Goodhue, R. E., Dreves, A. J., Lee, J., Bruck, D. J., Walton, V. M., O’Neal, S. D., & Zalom, F. G. (2011). *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae): Invasive Pest of Ripening Soft Fruit Expanding its Geographic Range and Damage Potential. *Journal of Integrated Pest Management*, 2(1), G1–G7. <https://doi.org/10.1603/IPM10010>
- Winkler, A., Jung, J., Kleinhenz, B., & Racca, P. (2020). A review on temperature and humidity effects on *Drosophila suzukii* population dynamics. *Agricultural and Forest Entomology*, 22(3), 179–192. <https://doi.org/10.1111/afe.12381>

XI. ANEXOS

Anexo 1. Lista completa de compuestos activos antennales (EAD) en *Drosophila suzukii*. Encontrados en frutas. (incluido fresa, frambuesa, cereza, arándano y moras), extractos de frutas, follaje y productos de fermentación (por ejemplo, vino Merlot y vinagre de arroz) en diferentes estudios. Tomado de Cloonan et al., (2018).

Compuesto	Fuente	Referencia
Ácidos		
Ácido acético	1, 2	Revadi et al. 2015, Cha et al. 2012, Mazzetto et al. 2016
Ácido hexanóico	1	Revadi et al. 2015
Ácido 2-Metilpropanóico	2	Mazzetto et al. 2016
Ácido 2-Metilbutanóico	2	Mazzetto et al. 2016
Ácido 3- Metilbutanóico	2	Mazzetto et al. 2016
Alcoholes		
Etanol	1, 2	Revadi et al. 2015, Cha et al. 2012, Mazzetto et al. 2016
Hexanol	1,3,2	Revadi et al. 2015, Abraham et al. 2015, Cha et al. 2012
Z-3-Hexen-1-ol	1,3,4	Revadi et al. 2015, Abraham et al. 2015, Keeseey et al. 2015
E-2-Hexenol	4	Keeseey et al. 2015
1-Octanol	1	Revadi et al. 2015
1-Octen-3-ol	1, 4	Revadi et al. 2015, Keeseey et al. 2015
β-Feniletanol	1	Revadi et al. 2015
3-Metil-1-butanol	3	Abraham et al. 2015
2-Heptanol	3	Abraham et al. 2015
6-Metil-5-hepten-2-ol	3, 4	Abraham et al. 2015, Keeseey et al. 2015
E-2-nonenol	4	Keeseey et al. 2015
Alcohol fenetil	4	Keeseey et al. 2015
2-Nitrofenol	4	Keeseey et al. 2015
Eugenol	4	Keeseey et al. 2015
Metionol	2	Cha et al. 2012
2-Feniletanol	2	Cha et al. 2012
2-Propanol	2	Mazzetto et al. 2016
Aldehídos		
Hexanal	3	Abraham et al. 2015
E-2-Hexenal	1, 3	Revadi et al. 2015, Abraham et al. 2015
Nonanal	1	Revadi et al. 2015
Benzaldehído	2	Mazzetto et al. 2016
Cetonas		
2-Heptanona	1, 3	Revadi et al. 2015, Abraham et al. 2015
Acetoína	2	Cha et al. 2012
2-Propanona	2	Mazzetto et al. 2016

Ésteres		
Acetato de butilo	3	Abraham et al. 2015
Acetato de etilo	1, 2	Revadi et al. 2015, Cha et al. 2012
Acetato de hexilo	1	Revadi et al. 2015, Keeseey et al. 2015
Acetato de isoamilo	1, 2	Revadi et al. 2015, Cha et al. 2012
Butanoato de etilo	1	Revadi et al. 2015
Hexanoato de etilo	1	Revadi et al. 2015
Octanoato de etilo	1	Revadi et al. 2015
Hexanoato de metilo	1	Revadi et al. 2015
Octanoato de metilo	1	Revadi et al. 2015
Acetato de Z-3-hexenilo	1, 4	Revadi et al. 2015, Keeseey et al. 2015
Acetato de 3-metil-2-butenilo	3	Abraham et al. 2015
Butirato de etilo	2	Cha et al. 2012
Lactato de etilo	2	Cha et al. 2012
Acetato de 2-metilbutilo	2	Cha et al. 2012
3-Hidroxibutirato de etilo	2	Cha et al. 2012
Lactato de isoamilo	2	Cha et al. 2012
Sorbato de etilo	2	Cha et al. 2012
Succinato de dietilo	2	Cha et al. 2012
Butirato de metilo	1	Keeseey et al. 2015
Isovalerato de metilo	1	Keeseey et al. 2015
Acetato de isopentilo	1	Keeseey et al. 2015
Aromáticos		
Salicilato de metilo	1, 4	Revadi et al. 2015; Keeseey et al. 2015
Norisoprenoides		
α -Ionona	1	Revadi et al. 2015
β -Ionona	1, 4	Revadi et al. 2015; Keeseey et al. 2015
Isoprenoides		
β -Ciclocitral	4	Keeseey et al. 2015
Monoterpenos		
α -Felandreno	1	Revadi et al. 2015
β -Felandreno	1	Revadi et al. 2015
Limoneno	1	Revadi et al. 2015
p-Cymeno	1	Revadi et al. 2015
Linalool	1, 3	Revadi et al. 2015, Abraham et al. 2015
Sesquiterpenos		
E-Cariofileno	1	Revadi et al. 2015

Nota. 1, Fruta; 2, Producto de fermentación; 3, Extracto de fruta; 4, Follaje de cultivos ej. fresa. Tomada de Cloonan et al., (2018).

Anexo 2. Lista completa de compuestos orgánicos volátiles de la zarzamora. Variedad Tupy extraídos por SPME. Tomado de Jacques et al., (2014).

Pico	RT (min)	% Área	Nombre	MW	S	Clase
5	1.68	3.65	Metiletilcetona	72	95	Cetona
8	2.06	3.58	Heptano	100	96	Hidrocarburo
9	2.57	0.77	Tolueno	92	94	Hidrocarburo
11	2.81	2.05	Hexanal	100	91	Aldehído
12	3.45	1.52	2-Hexenal	98	97	Aldehído
13	3.65	4.55	Heptanal	114	98	Aldehído
14	3.98	0.17	2-Heptanona	114	98	Cetona
15	4.13	3.24	2-Heptanol	116	98	Alcohol
17	4.56	0.17	Hexanoato de metilo	130	92	Éster
18	4.65	0.18	α -Thujene	136	91	Terpenoide
19	4.8	0.44	α -Pino	136	97	Terpenoide
20	5.11	0.24	Canfeno	136	97	Terpenoide
21	5.19	0.23	Heptenal	112	94	Aldehído
22	5.36	0.3	Benzaldehído	106	90	Aldehído
23	5.47	0.22	1-Heptanol	116	91	Alcohol
27	5.91	1.16	β -Mirreno	136	95	Terpenoide
29	6.07	0.47	Hexanoato de etilo	144	98	Éster
30	6.16	0.22	Octanal	128	96	Aldehído
31	6.26	0.59	α -Felandreno	136	96	Terpenoide
33	6.56	0.6	Terpinoleno	136	96	Terpenoide
34	6.95	63.26	Limoneno	136	94	Terpenoide
38	7.56	0.73	α -Terpineno	136	97	Terpenoide
39	7.83	0.6	1-Octanol	130	92	Alcohol
40	7.91	0.52	Linalool oxidado	170	98	Terpenoide
42	8.32	0.96	<i>o</i> -Cimeno	136	91	Terpenoide
44	8.58	0.79	Linalool	154	96	Terpenoide
45	8.66	0.47	Nonanal	142	95	Aldehído
50	9.64	0.25	Trans limoneno oxidado	152	92	Terpenoide

51	9.72	0.24	Isopinocarveol	152	93	Terpenoide
54	10.16	0.22	Nonenal	140	92	Aldehído
55	10.45	0.36	Isoborneol	154	90	Terpenoide
56	10.53	0.3	Benzoato de etilo	150	94	Éster
57	10.73	1.12	Terpinen-4-ol	154	91	Terpenoide
59	10.96	1.13	p-Cimen-8-ol	150	93	Terpenoide
60	11.11	0.78	α -Terpineol	154	95	Terpenoide
61	11.24	0.76	Salicilato de metilo	152	96	Éster
63	11.4	0.19	Decanal	156	95	Aldehído
65	11.64	0.23	Verbenona	150	92	Cetona
66	11.77	0.53	p-Mentenal	152	95	Aldehído
71	12.56	0.96	(-)-Carvona	150	95	Terpenoide
72	12.82	0.37	Geraniol	154	95	Terpenoide
76	13.57	0.39	Vitispirano	192	95	Terpenoide
79	14.11	0.17	Teaspirano	194	92	Terpenoide
89	16.19	0.13	α -Copaeno	204	93	Terpenoide
90	16.4	0.18	Damascenona	190	92	Cetona

Nota. MW = Masa molecular; S = Similitud con el espectro de masas; % Área = porcentaje de área relativo al área total de los picos . Tomado de Jacques et al., (2014).