

**DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL  
CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA FITOSANITARIA**

**Área de Diagnóstico Fitosanitario  
Laboratorio de Entomología y Acarología**

**Protocolo de Diagnóstico:**  
***Grapholita molesta* Busck, 1916**  
(Palomilla Oriental de la fruta)

**Tecámac, Estado de México, octubre 2018**

**SENASICA nos protege a todos**



**SADER**  
SECRETARÍA DE AGRICULTURA  
Y DESARROLLO RURAL



**SENASICA**  
SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD,  
INOCUIDAD Y CALIDAD  
AGROALIMENTARIA



### **Aviso**

El presente protocolo de diagnóstico fitosanitario fue desarrollado en las instalaciones de la Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF), de la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), con el objetivo de diagnosticar específicamente la presencia o ausencia de *Grapholita molesta*. La metodología descrita, tiene un sustento científico que respalda los resultados obtenidos al aplicarlo. La incorrecta implementación o variaciones en la metodología especificada en este documento de referencia pueden derivar en resultados no esperados, por lo que es responsabilidad del usuario seguir y aplicar el protocolo de forma correcta.

La presente versión podrá ser mejorada y/o actualizada quedando el registro en el historial de cambios.



## I. ÍNDICE

<b>1. OBJETIVO Y ALCANCE DEL PROTOCOLO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
2.1 Información sobre la plaga .....	1
2.2 Información taxonómica.....	2
2.3 Flujo de trabajo.....	3
<b>3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN .....</b>	<b>4</b>
3.1 Identificación de la Plaga .....	4
3.2 Consideraciones.....	4
3.3 Características morfológicas a observar bajo el microscopio estereoscópico.....	4
<b>4. RESULTADOS DE VALIDACIÓN.....</b>	<b>8</b>
<b>5. REGISTROS .....</b>	<b>8</b>
<b>6. CONTACTO PARA INFORMACIÓN ADICIONAL .....</b>	<b>8</b>
<b>7. RECONOCIMIENTO.....</b>	<b>9</b>
<b>8. REFERENCIAS.....</b>	<b>9</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>11</b>

## II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características morfológicas de la larva de <i>Grapholita molesta</i> .....	11
Figura 2. Genital de <i>Grapholita molesta</i> .....	12
Figura 3. Etiquetado de las estructuras de <i>Grapholita molesta</i> .....	13
Figura 4. Etiquetado de los ejemplares preservados en alcohol al 70%.....	13

## 1. OBJETIVO Y ALCANCE DEL PROTOCOLO

Describir los procedimientos para la identificación de *Grapholita molesta* (Busck, 1916), mediante el uso de claves taxonómicas y microscopía óptica. El siguiente protocolo es una herramienta en la determinación de la especie enfocada para los Terceros Especialistas de los Laboratorios Aprobados, así mismo para los técnicos de laboratorio de diferentes instituciones.

## 2. INTRODUCCIÓN

La palomilla oriental de la fruta (*G. molesta*) es una plaga cuarentenaria transitoria: accionable en curso de erradicación, de acuerdo con las normas de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (SENASICA, 2016). En el año 2002, se puso en marcha el Dispositivo Nacional de Emergencia (DNE), controlando el brote en 2003. Desde el 2013, a través del Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria (PVEF), se ha monitoreado la presencia de esta plaga, detectándola nuevamente en Tijuana, Baja California (NAPPO, 2013; SENASICA-SAGARPA, 2016). Para el año 2015 se da a conocer el Acuerdo mediante el cual se declara erradicado el brote de la palomilla oriental de la fruta (Lepidoptera: Tortricidae) en los municipios de Casas Grandes y Nuevo Casas Grandes, Chihuahua (DOF, 2015).

### 2.1 Información sobre la plaga

La familia Tortricidae, alberga a la palomilla oriental de la fruta, la cual es originaria del noroeste de China y se encuentra distribuida en zonas productoras de frutales de todos los continentes (Rothschild & Vickers, 1991; EPPO, 2018).

El adulto presenta una envergadura de 10-16 mm, las alas anteriores son de color gris oscuro y presentan líneas finas onduladas blanquecinas transversales, mientras que las alas posteriores son de color grisáceo. La pupa es de tipo obtecta, de color pardo oscuro de 5 mm de longitud. La larva es de 12 mm de largo, de color crema a rosado y consta de cinco estadios larvales. Se destaca la presencia de un peine anal con cuatro a siete dientes (CABI, 2016). Los huevos son de forma lenticular, de color amarillo y de 0.7 a 1 mm de diámetro y eclosionan de 3 a 15 días después de la oviposición, éstos se pueden encontrar en brotes, hojas y frutos (USDA, 1958). El ciclo completo de la especie dura entre 25 y 30 días y presentan mayor actividad a temperaturas superiores a los 15 °C. La mayor ocurrencia de *G. molesta* generalmente coincide con la etapa final de floración del fruto (SENASICA, 2016).

Los principales hospedantes de importancia económica de *G. molesta* son durazno, manzano, peral, cerezo, ciruelo, melocotón, nectarina, almendro, membrillo y albaricoque (SINAVIMO, 2010; CABI, 2016). La palomilla perfora los brotes y frutos, causa marchitez en hojas, exudados gomosos de los frutos, muerte progresiva de tallos y brotes; en ataques severos, se forman distorsiones en brotes y tallos de árboles jóvenes (Lanati, 2003; CABI, 2016; SENASICA, 2016). El estado larval, causa daños internos en los frutos debido a las galerías que construyen,

pero éstas no llegan a la zona carpelar, la fruta lesionada puede caer temprano y es más propensa a la infección secundaria por hongos (Gilligan & Epstein, 2014).

Los adultos de *G. molesta* pueden dispersarse a nivel local a través del vuelo y por la movilización de fruta o plantas infestadas. Es posible que la dispersión se efectúe también en material de embalaje (CABI, 2016).

## 2.2 Información taxonómica

**Nombre:** *Grapholita molesta* (Busck, 1916)

**Sinónimos:** *Carpocapsa molesta* (Busck, 1916)

*Cydia molesta* (Busck, 1916)

*Laspeyresia molesta* Busck, 1916

**Nombres comunes:** Palomilla oriental de la fruta

Palomilla del melocotonero

Polilla oriental del duraznero

Fruit moth oriental

Gusano del brote del duraznero

Tiñola orientale

### Posición taxonómica:

**Phylum:** Arthropoda

**Clase:** Insecta

**Orden:** Lepidoptera

**Familia:** Tortricidae

**Subfamilia:** Olethreutinae

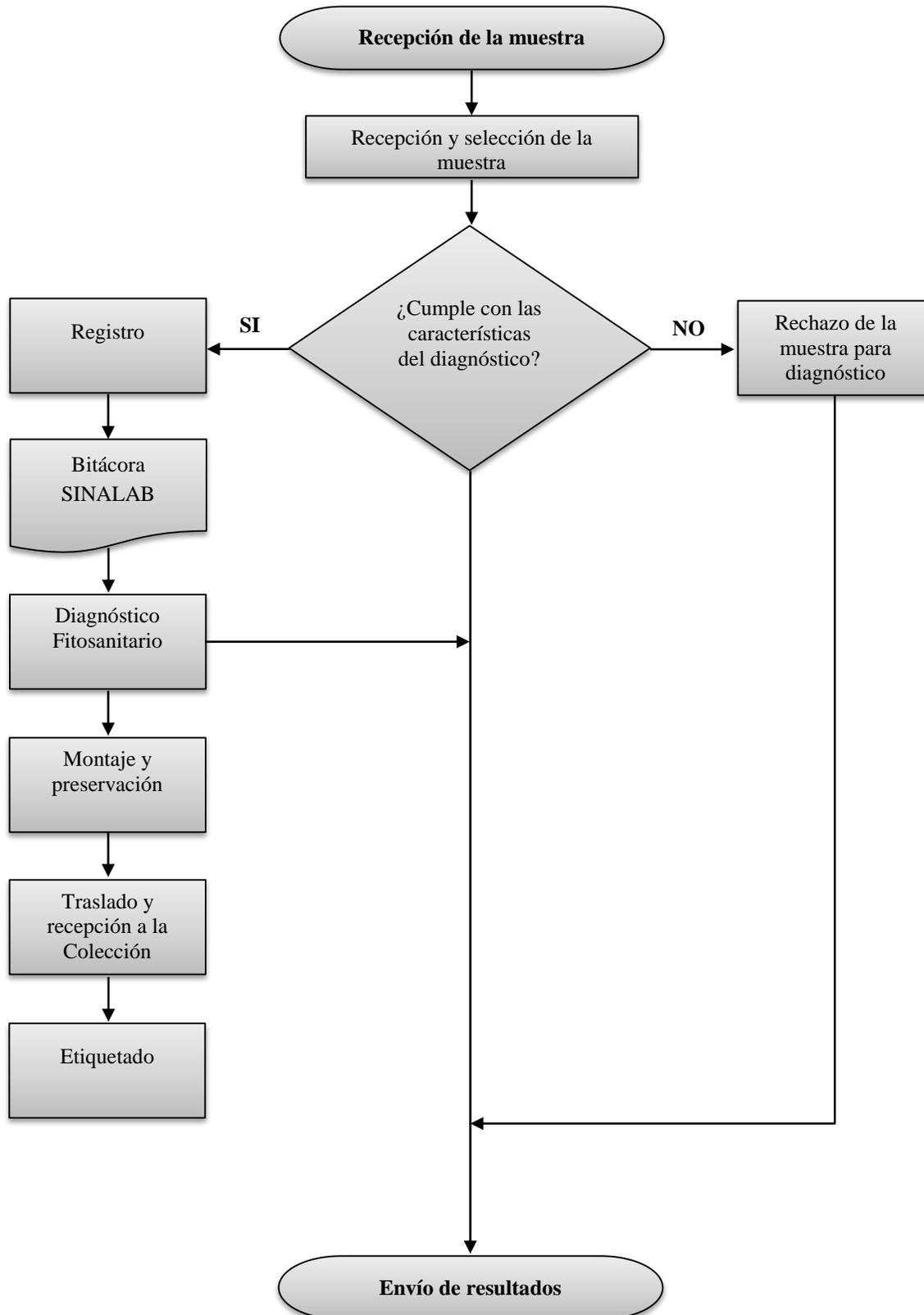
**Tribu:** Grapholitini

**Género:** *Grapholita*

**Especie:** *G. molesta*

(Gilligan et al., 2014)

## 2.3 Flujo de trabajo



## 3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

### 3.1 Identificación de la Plaga

La identificación del adulto de *G. molesta* se basa en caracteres morfológicos de la especie, mediante la observación en estereoscopio y montaje de los genitales del macho y la hembra, previamente tratados con la técnica de aclarado y montaje en laminilla, la cual consiste en eliminar el tejido membranoso y preservar únicamente las estructuras esclerosadas. Dicha técnica se basa en la reportada por Robinson (1976), con modificaciones realizadas por el personal técnico del Laboratorio de Entomología y Acarología del CNRF.

### 3.2 Consideraciones

Cuando el espécimen proviene de trampa pegajosa, es necesario tomar en cuenta que el ejemplar cumpla con las características del diagnóstico:

- a. Que los especímenes no estén dañados o aplastados.
- b. Que el abdomen se encuentre completo y en buen estado.

### 3.3 Características morfológicas a observar bajo el microscopio estereoscópico

Para la selección de especímenes pertenecientes a la familia Tortricidae, se deben observar las siguientes estructuras morfológicas (Gilligan et al., 2008; Gilligan & Epstein, 2014):

- a. Alas en reposo en forma de “campana”.
- b. La presencia de chaetosoma (setas finas) a la altura del ocelo.
- c. Palpos labiales proyectados hacia el frente.
- d. Palpos maxilares reducidos.
- e. Probóscide sin escamas.

Para la separación a la subfamilia Olethreutinae, se deben observar las siguientes estructuras morfológicas (Gilligan & Epstein, 2014):

- a. Las antenas poseen una fila de escamas en cada segmento flagelar.
- b. El complejo de la juxta, caulis y edeago están usualmente fusionados.

- c. El esterigma generalmente no está conectado con las apófisis anteriores en las hembras.
- d. Pecten cubital presente.

### 3.4 Método de preparación

#### 3.4.1 Larva

El estado larval se caracteriza por presentar la cabeza y el protórax de color marrón amarillento y un peine anal de color marrón claro con cerca de cinco dientes (Gilligan & Epstein, 2014). Los primeros estadios presentan un color blanquecino con la cabeza negra y en ocasiones pueden confundirse con otras especies de *Grapholita* y del género *Cydia* (Gilligan & Epstein, 2014). El último instar larval es de aproximadamente 7 a 13 mm (Chapman & Lienk, 1971), además presenta el abdomen de color rosado y una pináculo grande y pálida (Figura 1). Mackay (1959) menciona en su clave taxonómica algunas características diagnósticas que se deben considerar:

- a. Cuerpo y cabeza presentes solo con setas primarias.
- b. Pináculo moderadamente grande.
- c. Espinerete siete a  $8^{1/2}$  veces más larga que ancha.
- d. Tres setas prespiraculares en el protórax (Figura 1a).
- e. D1 (seda dorsal 1) más corta que la SD1 (seda subdorsal 1) o no tan larga que la D2 (seda dorsal 2).
- f. Seta D2 pareadas sobre el IX segmento abdominal en una sola pináculo (Figura 1e).
- g. Las setas laterales L1 y L2 presentes en los segmentos I al VIII, cercanamente juntas por debajo del espiráculo (Figura 1b).
- h. Propatas con 30 a 40 crochets en vista ventral (Figura 1c).
- i. Peine anal presente (Figura 1f).

Para su identificación, las larvas deben estar inmersas en alcohol al 70% y observar así detalladamente las estructuras requeridas en las claves taxonómicas.

**Nota:** es importante señalar que el ejemplar debe estar completamente sumergido en alcohol en posición lateral y con la cabeza a la izquierda del observador, evitando el brillo de la lámpara y la desecación del espécimen.

Para algunos casos es necesaria la extracción de la mandíbula:

- 1) Colocar el ejemplar en posición dorsal, completamente sumergido en el alcohol al 70%.
- 2) Con ayuda de la pinza entomológica sujetar la cabeza de la larva y con la aguja de disección separar la mandíbula del resto.
- 3) Una vez que la mandíbula se encuentra separada, sujetarla con la pinza entomológica y desprenderla.
- 4) Colocar en un portaobjetos de cristal, una gota de glicerina (preparación temporal).
- 5) Colocar la mandíbula en el portaobjetos de cristal y delicadamente colocar el cubreobjetos.
- 6) Visualizar en el microscopio, apoyándose de las claves taxonómicas (MacKay, 1959; Chapman, 1971; Gorham, 1987).

### 3.4.2 Adulto

Los adultos de esta especie son similares a otras especies neárticas, incluyendo a *G. funebrana*, *G. libertina*, *G. tenebrosana*, entre otras (Gilligan et al., 2008; Gilligan & Epstein, 2014). El genital masculino se caracteriza por una valva alargada con el *cucullus* redondeado (Figura 2a); mientras que el genital de la hembra (Figura 2b), presenta extensiones laterales rectangulares del *sterigma* con las proyecciones posterolateral agudamente acentuadas (Gilligan & Epstein, 2014).

Para la identificación de la especie se necesita la extracción del genital descrito por Robinson (1976), tanto del macho como de la hembra; sin embargo, se realizaron modificaciones a la técnica por el Departamento de Entomología y Acarología.

- 1) Desprender con cuidado el abdomen completo del insecto, con la ayuda de una pinza entomológica.
- 2) Colocar en una caja Petri el abdomen y sumergirlo en gasolina blanca por 3 minutos, hasta que la estructura no presente pegamento de la trampa.

- 3) Transferir el abdomen en un tubo de ensaye que contenga solución de hidróxido de potasio (KOH) al 40 % (1cc).
- 4) Colocar el tubo de ensaye a baño maría por un periodo de 5 a 10 minutos y agitar levemente (hasta que la estructura se aclare).
- 5) Colocar el abdomen en una cápsula de porcelana y agregar agua destilada, tratando de cubrir en su totalidad el abdomen para realizar la disección:
  - a. Machos**
    - i. Retirar la cápsula genital con un pincel y con ayuda de pinzas entomológicas.
    - ii. Limpiar delicadamente la cápsula genital, retirando el tejido membranoso, tratando de abrir lateralmente las valvas y mantener completas las estructuras internas como el edeago, uncus, juxta, tegumen (Figura 2a).
  - b. Hembras**
    - i. Retirar delicadamente la bursa copulatrix.
    - ii. Limpiar los restos del tejido membranoso, tratando de mantener completa las estructuras internas como papila anal, apófisis anterior y posterior, ostiolo (Figura 2b).
- 6) Una vez obtenido el genital, realizar dos lavados más con agua destilada; en intervalos de 2 minutos cada uno.
- 7) Colocar el genital en una caja Petri con alcohol al 96%, por un periodo de 2 a 3 minutos.
- 8) Transferir el genital al aceite de clavo por un lapso de 10 minutos.
- 9) Colocar el genital en vista dorsal y con las valvas abiertas (macho) sobre un portaobjetos con una gota de Bálsamo de Canadá, evitando que se formen burbujas.
- 10) Colocar el cubreobjetos sobre la gota del Bálsamo de Canadá. Rotular la preparación.
- 11) Observar al microscopio, apoyándose de las claves taxonómicas (Gilligan et al., 2008; Gilligan & Epstein, 2014).

## Preservación

Para obtener una preparación permanente de las estructuras de *G. molesta* con el medio de montaje Bálsamo de Canadá; se debe colocar el portaobjetos en una estufa de secado a temperatura óptima ( $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), durante un mes; posteriormente, limpiar, aplicar sellador (esmalte) en la periferia del portaobjeto y colocar las siguientes etiquetas (Figura 3):

**Izquierda:** familia, género, especie, nombre del autor quien realizó la descripción, nombre y fecha de quien hizo la determinación, técnica de montaje.

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

Los ejemplares preservados en laminilla, previamente etiquetados, se colocan en un portalaminillas; mientras que los especímenes en alcohol al 70 %, se etiquetan con datos de colecta, taxonómicos y geográficos (Figura 4).

## 4. RESULTADOS DE VALIDACIÓN

Las técnicas de identificación descritas en el presente protocolo se encuentran revisadas y validadas por el Área de Validación de Protocolos (AVP) del CNRF.

El presente protocolo permite la identificación de *Grapholita molesta* a nivel de género y especie en el estado larval y adulto, mediante caracterización morfológica y observación bajo el microscopio compuesto.

## 5. REGISTROS

Los ejemplares preservados en laminilla y los especímenes en alcohol al 70 %, deben ser resguardados en un lugar adecuado, con sus respectivos datos de registro, evitando la exposición de luz natural y artificial, con humedad relativa no mayor a 50%. Se debe colocar paradiclorobenceno, para evitar la aparición de polillas, gorgojos y piojos de los libros y realizar fumigación cada 6 meses (Colección Entomológica).

## 6. CONTACTO PARA INFORMACIÓN ADICIONAL

**Correo:** lab.entomologia@senasica.gob.mx

**Teléfono:** 01 (52) 55 5905 1000 Ext. 51368 y 51370

## 7. RECONOCIMIENTO

Este protocolo fue elaborado por el Laboratorio de Entomología y Acarología (Dulce Azucena Hernández Zetina y Liliana Hernández Sosa) y editado por el Grupo DiaFi (Ariana Guadalupe Robles Zárata y Lizeth Guadalupe Durán Espinosa).

## 8. REFERENCIAS.

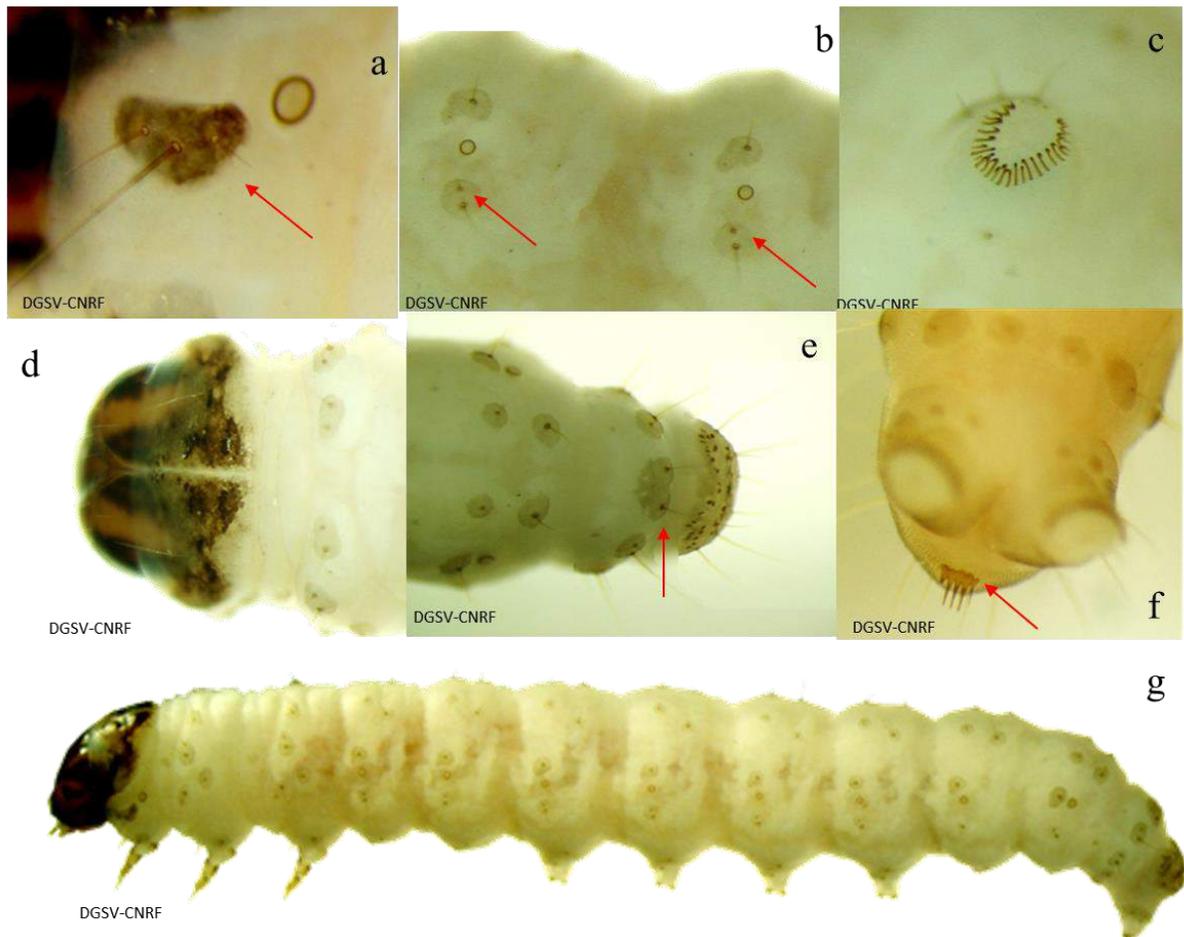
- CABI. (2016). En *Crop Protection Compendium*. Recuperado el 30 julio del 2018 de <http://www.cabi.org>.
- Chapman, P. T., Link, S. E. (1971). *Tortricid fauna on apple in New York (Lepidoptera: Tortricidae)*. New York, Agricultural Experiment Station, Cornell University. 122 p.
- Diario Oficial de la Federación (DOF). (2015). Acuerdo mediante el cual se declara erradicado el brote de la palomilla oriental de la fruta *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae) en los municipios de Casas Grandes y Nuevo Casas Grandes, Estado de Chihuahua. Recuperado de [http://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5417242&fecha=26/11/2015](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5417242&fecha=26/11/2015)
- EPPO. (2018). En Global Database. Recuperado el 20 agosto del 2018 de <https://gd.eppo.int/taxon/LASPMO/distribution>
- Gilligan, T. M. (2014). T@RTS: Online World Catalogue of the Tortricidae (Ver. 3.0). Recuperado el 20 agosto del 2018 de <http://www.tortricid.net/catalogue.asp>.
- Gilligan, T. M. and Epstein, M. E. (2014). *Tortricids of Agricultural Importance by Interactive Keys developed in Lucid 3.5*. Recuperado de [http://idtools.org/id/leps/tortai/Fact\\_Sheet\\_Index.htm](http://idtools.org/id/leps/tortai/Fact_Sheet_Index.htm)
- Gilligan, T. M., Baixeras, J. W. Brown & K. R. Tuck. (2014). T@RTS: Online World Catalogue of the Tortricidae (Ver. 3.0). Recuperado de <http://www.tortricid.net/catalogue.asp>.
- Gilligan, T. M., Wright, D. J. and Gibson, L. D. (2008). Olethreutine Moths of the Midwestern United States. An Identification Guide. Ohio Biological Survey Bulletin New Series. XVI (2): vii+ 334p.
- Gorham, J. R. (1987). Insect and Mite Pests in Food: An Illustrated Key. U. S. Department of Agriculture, Agriculture Handbook Number 655, 767p.
- Lanati, S. J. (2003). *Coccygomimus golbachi* Porter parasitoide de *Grapholita molesta* Busck. Primera cita para Mendoza (Argentina). *Rev. FCA Uncuyo*. Tomo XXXV. N° 2. 119–120.
- Mackay, M. R. (1959). Larvae of the North American Olethreutidae (Lepidoptera). *The Canadian Entomologist*, 91: 5–338.
- NAPPO. (2013). Phytosanitary Alert System: Detection of *Grapholita molesta* in urban areas of the city of Tijuana, Mexico. NAPPO. Recuperado de <http://www.pestalert.org/oprDetail.cfm?oprID=545>
- Robinson, G. S. (1976). The preparation of slides of Lepidoptera genitalia with special reference to the Microlepidoptera. *Entomologist's Gazette*, 27: 127–132.

- Rothschild, G. H. L. & R. A., Vickers. (1991). *Biology, ecology and control of the oriental fruit moth*, p. 389–412. In: L. Van der Geest & H. Evenhuis (eds.), *Tortricid pests their biology, natural enemies and control*. New York, Elsevier, 808p.
- SENASICA. (2016). *Palomilla oriental de la fruta (Grapholita molesta Busck)*. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria-Dirección General de Sanidad Vegetal, Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. Ciudad de México. Ficha Técnica No. 21. 18p.
- SENASICA- SAGARPA. (2016). *Plagas bajo Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. Acciones operativas por plaga 2016*. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA)-Sistema Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). Recuperado el 30 julio del 2018 de <http://sinavef.senasica.gob.mx/SIIVEF>
- SINAVIMO. (2010). *Cydia molesta*. Sistema Nacional de Vigilancia y Monitoreo de Plagas Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA).
- USDA. (1958). *The oriental fruit moth*. *USDA Agriculture Information Bulletin*, 182: 1–28.

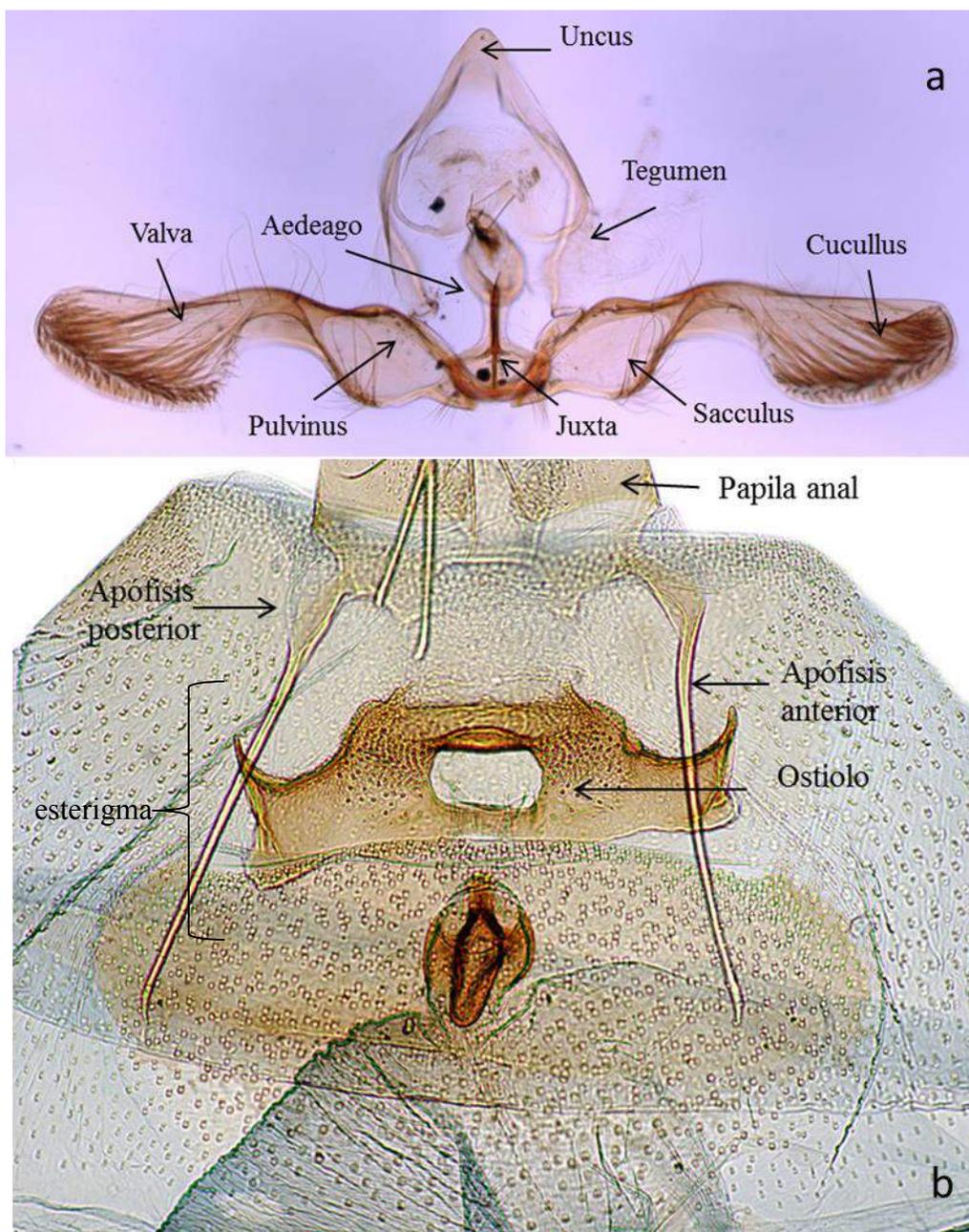
**Forma recomendada de citar:**

- SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2018). *Protocolo de Diagnóstico: Grapholita molesta Busck, 1916 (Palomilla Oriental de la fruta) [Versión 1.0]*. Tecámac, México: Autor.

## 9. ANEXOS



**Figura 1. Características morfológicas de la larva de *Grapholita molesta*.** a. Setas prespiraculares; b. Setas laterales L1 y L2; c. Crochets uniserial; d. Vista dorsal de la cabeza, sutura ecdicial; e. Setas dorsales y subdorsales; f. Vista ventral, peine anal; g. Vista lateral de la larva completa (Créditos: DGSV-CNRF Departamento de Entomología y Acarología).



**Figura 2. Genital de *Grapholita molesta* (Busck, 1916).** a. Características morfológicas del macho; b. Características morfológicas de la hembra (Créditos: a. DGSV-CNRF-Departamento de Entomología y Acarología; b. Gilligan et al., 2008).

<p>Familia: Tortricidae</p> <p>Género: <i>Grapholita</i> Especie: <i>G. molesta</i></p> <p>Determinador: L. Portillo</p> <p>Fecha de determinación: 24/10/2014</p>		<p>Lugar de recolecta: México, Michoacán</p> <p>Hospedero: Trampa</p> <p>Fecha de recolecta: 16/09/2014</p> <p>Recolector: A. Marín</p>
--	---	---

**Figura 3. Etiquetado de las estructuras de *Grapholita molesta*.**



**Figura 4. Etiquetado de los ejemplares preservados en alcohol al 70%.**