



Riesgo de introducción de *Anastrepha fraterculus* y *Ceratitis capitata* en limones del Noroeste Argentino

E. Willink¹, G. Gastaminza¹,

L. Augier¹, B. Stein²

M.E. Gatti³ y N. Larrea³

Palabras clave: Restricciones cuarentenarias, moscas de los frutos, análisis de riesgo.

INTRODUCCIÓN

Tucumán exporta cerca de 300.000 tn de limones (*Citrus limon* (L.) Burm. f.) frescos por año, que representan el 87% de las exportaciones nacionales. La temporada de cosecha para el mercado exportador es generalmente de abril a finales de septiembre (otoño e invierno en el hemisferio sur). La calidad de la fruta debe ser excelente para poder llegar a destino en buenas condiciones y cumplir con las exigencias de los mercados, algunos de ellos muy lejanos.

Basándonos en los resultados obtenidos en los últimos años, detallados en los capítulos previos, discutiremos el riesgo de introducción de *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) y *Ceratitis capitata* (Wiedemann) en limones provenientes del Noroeste Argentino. Este análisis se realizará considerando: el estatus de hospedero para ambas moscas de los frutos, la presencia natural de las poblaciones de adultos en el campo durante el período de exportación y las características de los limones a exportar.

Japón y China consideran al limón hospedero de *C. capitata* basados en los trabajos de Quayle (1938), Liquido *et al.* (1990) y otros. A raíz de las intercepciones de limones Verna de España infestados por moscas en el año 2006, Estados Unidos

incorporó recientemente al limón como hospedero de la mosca del Mediterráneo (PPQ-APHIS, Treatment Manual, 2007).

A los fines cuarentenarios, se define como hospedero de moscas de los frutos a cualquier fruta u hortaliza en la cual la mosca deposita sus huevos bajo condiciones de campo, eclosionan las larvas, éstas adquieren suficiente alimento para pupar y de ellas emerge el adulto capaz de reproducirse (Armstrong, 1986)

Cowley *et al.* (1992) establecieron los pasos a seguir para la determinación de la condición de hospedero a especies multivoltinas de moscas de los frutos. Estos consisten en realizar pruebas en laboratorio con frutos heridos artificialmente y expuestos a hembras grávidas. Si no hay desarrollo de adulto de la mosca, el fruto no es hospedero. Si por el contrario, hay desarrollo, podría ser un hospedero, pero para confirmarlo serán necesarios ensayos adicionales. Estos consisten en la recolección de frutos (al menos 1.000 frutos por región), trapeo (trampas con atrayentes apropiados cada 400 mts.) y pruebas a campo (frutos con hembras grávidas en jaulas colgadas de la planta). Estas pruebas definirán si es un hospedero o no a los fines cuarentenarios. Follett y Neven (2006), establecieron que el nivel de confianza sobre el cual

¹Centro de Investigaciones Cuarentenarias, Sección Zoología Agrícola, Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombes (EEAOC). William Cross 3150, 4101, Las Talitas, Tucumán. E-mail: ewillink@eeaoc.org.ar

²Sección Fruticultura, Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombes (EEAOC).

³Dirección Nacional de Cuarentena Vegetal-SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA (SENASA).

Cowley *et al.* (1992) basaron sus evaluaciones para establecer el estatus de no hospedero, fue de 22,1% con ningún sobreviviente en 30.000 individuos.

The Asian and Pacific Plant Protection Commission (APPPC) publicó en el año 2005, la Regional Standards for Phytosanitary Measures (RSPM) N° 4, que son los lineamientos para la confirmación de la condición de frutos y hortalizas como no hospederos de las moscas de los frutos. Estos se basan en los mismos procedimientos que establecieron Cowley *et al.* (1992) y que consisten en pruebas de laboratorio con frutos heridos artificialmente y frutos sin heridas, y pruebas a campo con frutos sin heridas expuestos a hembras grávidas en jaulas de infestación. La secuencia de pasos establece que los frutos con heridas deben ser testeados en laboratorio y si no muestran signo de infestación son considerados un "no hospedero", pero si hay signos de infestación, los frutos sin heridas deberán ser testeados en laboratorio y a campo. Si entonces no hay infestación alguna, el producto es considerado un "no hospedero" condicional, mientras que si se infestaran, serán considerados hospederos potenciales.

Follett y Hennessey (2007), revisaron y discutieron los límites de confianza y el tamaño de las muestras para determinar la condición de frutos y hortalizas como no hospederos de tefritidos como medida cuarentenaria. Ellos concluyeron que los "investigadores deberían realizar estudios de infestación bajo condiciones definidas y con un número suficiente de frutos e insectos para determinar convincentemente el estatus de hospedero de un producto" y además, que métodos cuantitativos deberían ser usados para establecer la eficacia que dará consistencia a los datos. También establecieron que los niveles de confianza estimados para un 99,99% o un nivel de 99,9968% (probit 9) de eficacia, deben ser calculados usando la ecuación suministrada por Couey and Chew (1996): $C = 1 - (1-p)^n$ donde p es el nivel aceptado de sobrevivientes y n es el número de individuos tratados. De acuerdo a estos autores, un estudio de hospedero ideal debe incluir pruebas de infestación natural con jaulas tanto en laboratorio como a campo.

Considerando que el limón puede ser un hospedero de mosca de los frutos bajo condiciones muy especiales, trataremos de establecer el estatus de hospedero y el riesgo de introducción de moscas de los frutos en limones exportados del Noroeste Argentino.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar

el riesgo de introducción de *A. fraterculus* y *C. capitata* en limones procedentes del noroeste argentino.

Anastrepha fraterculus

Estatus de hospedero

Para establecer la condición del limón como hospedero de la mosca sudamericana de los frutos y el riesgo de introducción de la plaga a un área, se siguieron los lineamientos propuestos por Cowley *et al.* (1992) y la RSPM N°4 de la APPPC (2005) y se analizaron la eficacia y la confianza de los datos.

A. fraterculus, la mosca sudamericana de los frutos, que se distribuye en América desde el sur de los Estados Unidos a Argentina, no ha sido reportada atacando limones.

Pruebas de laboratorio con frutos heridos artificialmente

La primera prueba decisiva para establecer el estatus de hospedero consiste en infestar con moscas, frutos heridos artificialmente en el laboratorio. En nuestro laboratorio, después de realizar 13 pruebas de infestación forzadas, empleando 910 frutos de limón maduros comercialmente que presentaban heridas artificiales, no se obtuvo desarrollo de *A. fraterculus* (ver capítulo IX). De acuerdo con los lineamientos establecidos por RSPM N° 4 de la APPPC, el limón es un no hospedero de *A. fraterculus*.

Se realizaron además, pruebas de resistencia a campo y en laboratorio con el fin de tener seguridad adicional de que el limón no es hospedero de *A. fraterculus*. Luego de realizar 33 ensayos de infestaciones forzadas a campo exponiendo 2.310 frutos de limón maduros sin heridas a 11.550 hembras grávidas de *A. fraterculus* en jaulas colocadas en plantas de limonero, no se obtuvieron larvas o pupas vivas o muertas de la mosca. De la misma manera, luego de realizar 33 pruebas de infestación forzada en laboratorio sometiendo limones con 2, 4 y 6 días de estacionamiento, a infestación de moscas de la fruta (6.880 limones expuestos a 34.650 hembras grávidas de *A. fraterculus*), no se obtuvieron larvas o pupas vivas o muertas de la mosca. De acuerdo con los lineamientos establecidos por la RSPM N° 4 de la APPPC estos resultados refuerzan el hecho de que el limón no es hospedero de *A. fraterculus*.

De acuerdo a Follett y Hennessey (2007), se calculó la eficacia de los datos para las pruebas de resistencia:

a) considerando la cantidad de insectos: al exponer 9.190 frutos a 46.200 hembras de *A. fraterculus* sin obtener ningún sobreviviente, resulta un 99,01% de confianza que la resistencia es un 99,99% efectiva, y 77,20% de confianza que la resistencia es un 99,9968% efectiva.

b) considerando la cantidad de huevos: con un estimado de 511.803 huevos depositados por 46.200 hembras de *A. fraterculus* en 9.190 frutos, resulta un 100% de confianza que la resistencia es un 99,99% efectiva y 99,9999% de confianza de que la resistencia es un 99,9968% efectiva.

Cowley *et al.* (1992), mencionan la recolección de frutos como otro paso en el procedimiento para determinar el estatus de hospedero. Siguiendo esos lineamientos, no se obtuvo infestación de *A. fraterculus* en 102.700 limones (que comprenden frutos recolectados del suelo, frutos cosechados de las plantas en quintas de limonero y frutos de descarte de empaques). Siguiendo a Follett y Hennessey (2007), obtenemos un 99,99% de confianza de que la resistencia es un 99,99% efectiva, y un 96,26% de confianza que la resistencia es un 99,9968% efectiva. Además 403.220 limones (frutos de exportación en cajas terminadas) fueron muestreados en empaques sin que se obtengan frutos infestados con *A. fraterculus*. Siguiendo nuevamente a Follett y Hennessey (2007), obtenemos un 100% de confianza de que la resistencia es un 99,99% efectiva, y un 99,99% de confianza de que la resistencia es un 99,9968% efectiva.

CONSIDERACIONES FINALES

Considerando que las infestaciones artificiales y naturales no se producen bajo condiciones definidas en el laboratorio y en el campo, y que no hay registros del limón como un hospedero de *A. fraterculus*, concluimos que el limón no es hospedero de *A. fraterculus* y por lo tanto no implica riesgo alguno de introducción de la mosca.

Ceratitis capitata

Estatus de hospedero

A fin de establecer el estatus de hospedero y el riesgo de introducción de la mosca del Mediterráneo en limones a un área, se siguieron los lineamientos propuestos por Cowley *et al.* (1992) y de la RSPM N° 4 de la APPPC (2005). Se analizaron también la eficiencia y los niveles de confianza de los datos.

Registros de hospedero

C. capitata, una mosca de la fruta introducida a América, fue reportada atacando limones bajo circunstancias muy especiales. El estatus del limón como hospedero de *C. capitata* es un ejemplo de controversias entre diferentes organismos fitosanitarios. Por ejemplo, el Comité de Sanidad Vegetal del Cono Sur (COSAVE), no lo considera hospedero, mientras que Japón sí. Por otro lado, Quayle (1938) reportó frutos con larvas en empaques de Sicilia y Liquidó (1990) en frutos recolectados del suelo en Hawái; recientemente Estados Unidos interceptó limones Verna procedentes de España infestados con larvas de *C. capitata* (APHIS, 2006).

Pruebas de laboratorio con frutos heridos artificialmente

La primera prueba decisiva para establecer el estatus de hospedero consiste en infestar en el laboratorio frutos heridos artificialmente. Luego de realizar 13 pruebas de infestación forzadas en laboratorio, empleando 910 frutos de limón maduros comercialmente, a los que se les produjo heridas artificiales, se obtuvieron 122 adultos de *C. capitata*, 115 de los cuales se desarrollaron en limones cosechados en el verano, (ver capítulo IX).

De acuerdo a las pautas de la RSPM N° 4 de la APPPC, el limón puede ser un hospedero potencial o un no hospedero condicional (conditional non host), dependiendo de los resultados de otras pruebas.

Resistencia química

La resistencia de los limones a la mosca de los frutos, es generada por una barrera química de la piel del limón. Los principales componentes del aceite esencial de la cáscara del limón como el citral, linalol y cumarinas, son responsables de la muerte de las larvas y eventualmente de los huevos de la mosca de la fruta (Salvatore *et al.*, 2004). En coincidencia con esto, Back y Perbenton (1915), Greany *et al.* (1985), sugirieron que los componentes de las glándulas del aceite esencial son responsables de los mecanismos de resistencia del limón. Estos componentes corresponden a la parte volátil del aceite esencial, razón por la cual su presencia en la piel del limón disminuye con el paso del tiempo desde la cosecha (Salvatore *et al.*, 2004). El endurecimiento de tejido alrededor del sitio de oviposición (encapsulamiento), es otro factor

que interviene en lo que se considera resistencia mecánica ofrecida por el limón (Back y Perbenton, 1915; Greany *et al.*, 1985 y Spitler *et al.*, 1984).

Teniendo en cuenta estos mecanismos de resistencia, la posibilidad de infestación puede lograrse sólo si el fruto está sobremaduro o tiene muchos días de estacionamiento, al igual que los factores responsables de la resistencia como ha sido probado por Salvatore *et al.* (2004). La otra posibilidad de infestación es mediante frutos con heridas o dañados, ya que *C. capitata* busca depositar sus huevos en orificios, diferente de *A. fraterculus* que necesita algún tipo de resistencia para oviponer.

Pruebas de laboratorio en jaulas con frutos sin heridas

Luego de 33 pruebas de infestación forzada en laboratorio con moscas de los frutos realizadas con limones con 2, 4 y 6 días de estacionamiento, exponiendo 6.880 frutos de limón maduros comercialmente a 34.650 hembras grávidas de *C. capitata*, no se obtuvieron larvas o pupas vivas o muertas de las moscas. De acuerdo a las pautas establecidas por la RSPM N° 4, de la APPPC, estos resultados muestran que el limón es un no hospederero condicional (conditional non host) de *C. capitata*.

Pruebas a campo en jaulas con frutos sin heridas

Luego de 33 pruebas de infestación forzada a campo, exponiendo 2.310 frutos de limón maduros comercialmente sin heridas a 11.550 hembras grávidas de *C. capitata* en jaulas colocadas en las plantas, no se obtuvieron larvas o pupas vivas o muertas de la mosca. De acuerdo a las pautas establecidas por la RPSM N° 4 de la APPPC, estos resultados muestran que el limón es un no hospederero condicional (conditional non host) de *C. capitata*.

Tras exponer 9.190 frutos de limón a 46.200 hembras grávidas de *C. capitata*, sin desarrollo de la mosca, siguiendo a Follett y Hennessey (2007) obtenemos un 99,01% de confianza en que la resistencia es un 99,99% efectiva, y un 77,20% de confianza en que la resistencia es un 99,9968% efectiva. Además, considerando un estimado de 819.931 huevos depositados por 46.200 hembras de *C. capitata* en 9.190 frutos, obtenemos un 100% de confianza que la resistencia es un 99,99% efectiva, y un 100% de confianza en que la resistencia es un 99,9968% efectiva.

Muestras de frutos

Luego de muestrear 102.700 frutos de limón (que incluyen frutos del árbol como del suelo y frutos de descarte de empaques) sin infestación de *C. capitata*, siguiendo a Follett y Hennessey (2007) obtenemos un 99,99% de confianza en que la resistencia es un 99,99% efectiva, y un 96,26% de confianza en que la resistencia es un 99,9968% efectiva.

Muestreo de frutos en empaques

Luego de muestrear 403.220 frutos de limón de empaques (frutos para exportación de cajas terminadas) sin infestación de *C. capitata*, siguiendo a Follett y Hennessey (2007) obtenemos un 100% de confianza en que la resistencia es un 99,99% efectiva, y un 99,99% de confianza en que la resistencia es un 99,9968% efectiva.

Considerando que:

1) Existen pocos antecedentes internacionales de infestación natural de limones por *C. capitata* y los mismos ocurrieron bajo condiciones muy especiales.

2) Sólo se obtuvo desarrollo de adultos de *C. capitata* en condiciones de laboratorio extremas con frutos de limón heridos artificialmente, que no representan las condiciones naturales de producción.

3) Los componentes químicos de la piel del limón ofrecen resistencia a la infestación de *C. capitata*. Los mismos comienzan a decrecer dos semanas después que el limón es cosechado y los frutos se tornan susceptibles a la infestación de la mosca del Mediterráneo.

4) Pruebas de infestación a campo y en laboratorio con limones sin heridas con 8 días de estacionamiento previo a la prueba de infestación, no muestran infestación de la mosca.

5) Limones muestreados en el campo y en empaques, no muestran infestaciones de la mosca.

De acuerdo a:

Cowley *et al.* (1992): el limón es un no hospederero de *C. capitata* porque no se ha obtenido desarrollo en ninguna infestación, en muestreos de fruta, en pruebas a campo con jaulas y además las trampas muestran que las poblaciones de adultos de moscas de los frutos son bajas durante la temporada de exportación.

APPPC N° 4 (2005): el limón es un no hospederero condicional porque se obtiene desarrollo de la mosca en las pruebas en laboratorio con frutos de limón herido artificialmente, pero no

se obtiene desarrollo de adultos en las pruebas de infestación forzadas a campo y en laboratorio con frutos de limón sin heridas.

Follett y Hennessey (2007): el riesgo es despreciable como se expone en los muestreos de frutos en el campo y en empaques con una eficacia para un probit 9, con un nivel de confianza de un 99,95% y un 99,99% respectivamente. Lo mismo se muestra para las pruebas de resistencia, considerando el número de moscas de la fruta o el número estimado de huevos, alcanzando una efectividad de probit 9, con un nivel de confianza de 99,02 y 100% respectivamente.

CONCLUSIONES FINALES

Considerando todo lo expuesto, podemos concluir que el limón exportado del Noroeste Argentino representa un riesgo despreciable de introducción de *C. capitata*.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Armstrong, J. W. 1986.** Pest organism response to potential quarantine treatments. En: Proceedings, 1985 ASEAN PLANTI Regional Conference on Quarantine Support for Agricultural Development. ASEAN Plant Quarantine Center and Training Institute, Serdang, Selangor, Malaysia 1, pp. 25-30.
- Asia and Pacific Plant Protection Commission (APPPC). 2005.** Guidelines for the confirmation of non-host status of fruit and vegetables to tephritid fruit flies. Regional Standards for Phytosanitary Measures, N° 4, APPPC, Food and Agriculture Organization of the United Nations Regional Office for Asia and the Pacific, Bangkok.
- Back, E. A. and C. E. Pemberton. 1915.** Susceptibility of citrus fruits to the attack of the Mediterranean fruit fly. J. Agric. Res. 3: 311-330.
- Couey, H. M. & V. Chew. 1986.** Confidence limits and sample in quarantine research. J. Econ. Entomol. 79: 887-890.
- Cowley, J. M.; R. T. Backer and D. S. Harte. 1992.** Definition and determination of host status for multivoltine fruit fly (Diptera: Tephritidae) species. J. Econ. Entomol. 85 (2): 312-317.
- Follett, P. A. and L. G. Neven. 2006.** Current Trends in Quarantine Entomology. Annual Review of Entomology 51: 359-385.
- Follett, P. A. & M. K. Hennessey. 2007.** Confidence limits and sample size determining nonhost status of fruits and vegetables to tephritid fruit flies as a quarantine measure. J. Econ. Entomol. 100 (2): 251-257.
- Greany, P. D.; S. C. Styer; P. L. Davis; P. E. Shaw and D. L. Chambers. 1983.** Biochemical resistance of citrus to fruit flies. Demonstration and elucidation of resistance to the Caribbean fruit fly *Anastrepha suspensa*. Ent. Exp. Appl. 34: 40-50.
- Liquido, N. J.; L. A. Shinoda and R. T. Cunningham. 1990.** Host Plants of the Mediterranean Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) on The Island of Hawaii. J. Econ. Entomol. 85 (5): 1863-1878.
- Plant Protection and Quarantine - Animal and Plant Health Inspection Service (PPQ-APHIS). 2007.** Treatment Manual. [On line]. Available in http://www.aphis.usda.gov/import_export/plants/manuals/index.shtml (Last accessed November 2007).
- Quayle, H. J. 1938.** Insects of Citrus and Other Subtropical Fruits. Comstock Publishing Company, Inc. New York.
- Salvatore, A.; S. Borkosky; E. Willink and A. Bardón. 2004.** Toxic effects of lemon peel constituents on *Ceratitis capitata*. J. Chem Ecol. 30: 323-333.
- Spitler, G.H.; J.W. Armstrong and H.M. Couey. 1984.** Mediterranean Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) Host Status of Commercial Lemon. J. Econ. Entomol. 77: 1441-1444.