
**UNIVERSIDAD NACIONAL
DE TUCUMAN**



**Sensibilidad de la “mosca del Mediterráneo”
Ceratitis capitata Wiedemann (Diptera: Tephritidae)
al bromuro de metilo en pomelo y mandarina**

Tesis presentada para optar por el grado de Magíster en Agronomía

Tesista

Ing. Agr. Beatriz N. Carrizo

Director

M. Sc. Humberto F. Vinciguerra

2012

Este trabajo fue realizado en la sección Zoología Agrícola de la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC), con el apoyo de Fundación Barreras Patagónicas (FUNBAPA) y el Instituto de Sanidad y Calidad Agroalimentaria de Mendoza (ISCAMEN).

A Lourdes y Virginia

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todos aquellos que, de una forma u otra, tuvieron que ver con la realización de este trabajo de Tesis:

A las autoridades de la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres, en particular al Director de Disciplinas Especiales Lic. Eduardo Willink, por haberme brindado la posibilidad de ser parte de su equipo de trabajo y darme los elementos necesarios para realizar esta Tesis.

A las autoridades de FUNBAPA e ISCAMEN, quienes financiaron mi beca e instalaron la cámara de fumigación experimental (única en su tipo en Argentina) para realizar las investigaciones.

A mi Director, M. Sc. Humberto Vinciguerra, por ayudarme en la interpretación de los datos, sus acertados consejos y su incondicional disposición en la organización de las reuniones.

Al Ing. Agr. Ramón Fernández, integrante de la Comisión de Supervisión, por sus sabios consejos, su incondicional presencia y por enseñarme que la docencia es una vocación que acompaña a las personas durante toda su vida.

Al M. Sc. Miguel García, integrante de la Comisión de Supervisión, por su buena disposición, facilitando la organización de las reuniones y por sus valiosos aportes realizados a esta tesis.

A Cecilia, Analía, Anita, María Elvira, Silvana y Paula con quienes aprendí que cuando se comparten esfuerzos, los beneficios que se logran superan los objetivos esperados.

A la Dra. Teresa Vera, por ayudarme desinteresadamente en la última etapa, enseñándome, aconsejándome y alentándome en la ardua tarea de escribir. Por aquellas horas en las cuales nos permitimos filosofar sobre el difícil arte de vivir, gracias...

A Eduardo Urueña, auxiliar de la sección de Zoología Agrícola, por ayudarme y acompañarme en las prolongadas jornadas de fumigación, siempre con buen humor y compañerismo.

A Norma por su franqueza, profesionalidad y por soportar el día a día laboral.

A José Olmos y David González, quienes me ayudaron a solucionar problemas técnicos de la cámara de fumigación y asistirme en las salidas de campo para cosechar fruta.

A todos mis compañeros de la Sección Zoología de la EEAOC, Josefina, Ana Lucía, Pilar, Marcos, Guido, Horacio, Lucrecia, Marcelo, Diego P., Diego M., Franco, Lucas, Augusto, Guille, Lucía, Gabriela, Florencia, Sofía F., Sofía T., Fabiana, Carmen, Alejandro, Gerardo y Marcos por permitirme compartir la jornada laboral.

A toda mi familia, por el apoyo incondicional. A mis padres, quienes me enseñaron que con esfuerzo y dedicación se puede llegar a buen puerto. A mis hermanos Raúl y Norma quienes siempre me alentaron y ayudaron, especialmente en la etapa de escritura de la tesis, albergándome en sus casas.

A Roberto, por estar siempre a mi lado, alentándome, brindándome su ayuda incondicional aún en las pequeñas cosas de la vida.

A todos aquellos a quienes puedo estar olvidando...

A mis hijas, Lourdes y Virginia quienes dieron sentido a mi vida y a las que amo infinitamente.

Y en definitiva... a Dios, por darme todo lo que tengo en esta vida.

CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS	2
1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	2
1.1 La citricultura en la República Argentina	2
1.2 Tratamientos cuarentenarios	3
1.2.1 Tratamientos cuarentenarios físicos	4
1.2.2 Tratamientos cuarentenarios químicos	7
1.2.2.1 Modo de acción del bromuro de metilo	8
1.2.2.2 Susceptibilidad de los insectos al bromuro de metilo	9
1.2.2.3 Ejemplos de tratamientos con bromuro de metilo	11
1.2.2.4 Efecto del bromuro de metilo sobre la calidad de los frutos	13
1.3 Situación actual del bromuro de metilo	14
1.4 Desarrollo de un tratamiento cuarentenario	15
1.5 La “mosca del Mediterráneo”	16
1.5.1 Ciclo de vida y distribución	16
1.5.2 Manejo de la mosca de la fruta en Argentina	17
2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	20
2.1 Hipótesis	20
2.2 Objetivo general	20
2.3 Objetivos específicos	20
3. MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1 Material biológico	22
3.1.1 Frutos	22
3.1.2 Cría de <i>C. capitata</i>	25
3.2 Inoculación	27
3.2.1 Artificial	27
3.2.2 Natural forzada	27
3.3 Instrumental de fumigación	27
3.3.1 Cámara de fumigación	27
3.4 Determinación de la sensibilidad de los estados de desarrollo de <i>C. capitata</i> al bromuro de metilo	27
3.4.1 Material biológico	27
3.4.2 Tratamientos	27
3.4.3 Inoculación	28
3.4.4 Control de la muestra testigo	28
3.4.5 Introducción en la cámara de fumigación	27
3.4.6 Revisión de frutos	27
3.4.7 Registro de datos	28
3.4.8 Análisis de datos	28
3.5 Determinación de la incidencia de las variedades de pomelos y mandarinas en el estado biológico de <i>C. capitata</i> más tolerante al bromuro de metilo	30
3.5.1 Material biológico	30

3.5.2	Tratamientos	30
3.5.3	Inoculación	30
3.5.4	Revisión de los frutos	30
3.5.5	Análisis de datos	27
3.6	Determinación de la dosis y tiempo de fumigación para eliminar el estado de <i>C. capitata</i> más tolerante al bromuro de metilo.....	27
3.7	Evaluación del bromuro de metilo sobre la calidad de pomelos y mandarinas	28
3.7.1	Análisis de datos	28
4.	RESULTADOS	29
4.1	Determinación de la sensibilidad de los estados de desarrollo de <i>C. capitata</i> al bromuro de metilo.....	29
	RI	29
	RI	30
4.1.1	Análisis Probit	31
4.2	Determinación de la incidencia de las variedades de pomelos y mandarinas en el estado biológico de <i>C. capitata</i> más tolerante al bromuro de metilo.....	32
	RI	33
	RI	33
4.2.1	Análisis Probit.....	34
4.3	Determinación de la dosis y tiempo de fumigación para eliminar el estado ... de <i>C. capitata</i> más tolerante al bromuro de metilo.....	35
4.4	Evaluación del bromuro de metilo sobre la calidad de pomelos y mandarinas...	36
4.4.1	Parámetro físico.	36
		38
4.4.2	Parámetro fisiológico.....	38
4.4.2	Parámetro fisiológico.....	39
4.4.3	Parámetros organolépticos.....	41
5.	DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	46
6.	BIBLIOGRAFÍA	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1. Variedades de pomelos a) Marsh Seedless b) Río Red c) Henninger's Ruby y mandarinas d) Hernandina e) Clemenules f) Ellendale g) Satsuma h) Murcott.

Figura 3.2. Jaulas con adultos de *Ceratitis capitata*.

Figura 3.3. Cría de larvas de *C. capitata*.

Figura 3.4. Inoculación artificial de huevos y larvas de *C. Capitata*.

Figura 3.5. Inoculación natural forzada de huevos de *C. capitata*.

Figura 3.6. Cámara de fumigación: a) cámara de fumigación experimental b) lámpara de haluro c) computadora de registro de temperaturas, tiempo de fumigación y dosis de bromuro de metilo.

Figura 3.7. Disposición de los frutos en la cámara de fumigación en las pruebas de sensibilidad.

Figura 3.8. Revisión de frutos después del tratamiento.

Figura 4.1. Pérdida porcentual de peso en pomelos Río Red (A), Henninger's Ruby (B) y Marsh Seedless (C) en los tratamientos de bromuro de metilo de 48 y 56 g/m³ durante 3 y 4 horas.

Figura 4.2. Pérdida porcentual de peso de mandarinas Hernandina (A), Clemenules (B), Ellendale (C) y Satsuma (D) en los tratamientos de bromuro de metilo de 48 y 56 g/m³ durante 3 y 4 horas.

Figura 4.3. Clasificación de daños en pomelos y mandarina a) leve b) moderado c) grave.

Figura 4.4. Porcentaje de daños en tres variedades de pomelos.

Figura 4.5. Porcentaje de daños en cuatro variedades de mandarinas.

Figura 4.6. Parámetros organolépticos de tres variedades de pomelos en el tratamiento de 48 y 56 g/m³ de bromuro de metilo durante 3 y 4 horas.

Figura 4.7. Parámetros organolépticos de cuatro variedades de mandarinas en los tratamientos de 48 y 56 g/m³ de bromuro de metilo

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Producción y exportación mundial y de Argentina de fruta cítrica fresca expresada en miles de toneladas.

Tabla 3.1. Componentes de la dieta larvaria de *Ceratitis capitata*.

Tabla 3.2. Tratamientos empleados en la etapa de sensibilidad.

Tabla 3.3. Tratamientos empleados para determinar la incidencia de las variedades de pomelos y mandarinas en la tolerancia al bromuro de metilo.

Tabla 3.4. Tratamientos evaluados para eliminar el estado más tolerante de *C. capitata*.

Tabla 3.5. Tratamientos empleados en las evaluaciones de calidad de pomelos y mandarinas.

Tabla 4.1. Mortalidad corregida de los estados de desarrollo de *C. capitata* en pomelos Río Red para cinco dosis de bromuro de metilo a 15°C durante dos horas.

Tabla 4.2. Mortalidad corregida de los estados de desarrollo de *C. capitata* en mandarinas Satsuma para 5 dosis de bromuro de metilo a 15°C durante dos horas.

Tabla 4.3. Valores de DL50 mediante el análisis probit para los estados de desarrollo de *C. capitata* en pomelos Río Red en fumigaciones a 15°C durante 2 horas.

Tabla 4.4. Valores de DL50 obtenidos mediante el análisis probit para los estados de desarrollo de *C. capitata* en mandarinas Satsuma.

Tabla 4.5. Mortalidad corregida de huevos de *C. capitata* en dos variedades de pomelos para cinco dosis de bromuro de metilo a 15°C durante 2 horas.

Tabla 4.6. Mortalidad corregida de huevos de *C. capitata* en dos variedades de mandarinas para cinco dosis de bromuro de metilo a 15°C durante 2 horas.

Tabla 4.7. Resultados del análisis probit para huevos de *C. capitata* en dos variedades de pomelos.

Tabla 4.8. Resultados del análisis probit de la DL50 para huevos de *C. capitata* en dos variedades de mandarinas.

Tabla 4.9. Mortalidad de huevos de *C. capitata* en pomelos Río red expuestos a fumigaciones con bromuro de metilo.

Tabla 4.10. Mortalidad de huevos de *C. capitata* en mandarinas Satsuma expuestos a fumigaciones con bromuro de metilo.

RESUMEN

La citricultura es una de las actividades agroindustriales más importante en la Argentina. El continuo crecimiento del área de cultivo y el aumento de la producción, originó la búsqueda de nuevos mercados para su comercialización. En el norte argentino, la presencia de plagas claves como la mosca del Mediterráneo, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae), limitan la comercialización de los frutos hospedantes de dicha mosca, los cuales deben recibir tratamientos cuarentenarios para poder entrar en zonas o regiones libres de la misma. La fumigación con bromuro de metilo es uno de los tratamientos más empleados en el mundo por su amplio espectro de control de plagas en diversos productos frutihortícolas. El objetivo general de este trabajo fue determinar la sensibilidad de *C. capitata* Wied. al bromuro de metilo en frutos de pomelos (*Citrus paradisi* Macfadyen) y mandarinas (*Citrus reticulata* Blanco). Los objetivos específicos fueron establecer la variedad de pomelo y mandarina en la que el estado de desarrollo de *C. capitata* presenta mayor tolerancia; determinar las condiciones de fumigación a 15°C (dosis y tiempo de fumigación) para obtener la mortalidad total del estado más tolerante, y evaluar el efecto del bromuro de metilo sobre las variedades de pomelos y mandarinas. Los estudios se realizaron en cuatro etapas de ensayos.

En la etapa I se determinó la sensibilidad de los estados de desarrollo de *C. capitata* al bromuro de metilo variando las dosis de bromuro de metilo.

En la etapa II se estableció si las variedades de pomelos y mandarinas inciden sobre la tolerancia al bromuro de metilo del estado más tolerante de *C. capitata*.

En la etapa III se determinó la dosis de bromuro de metilo y el tiempo de fumigación a 15°C necesarios para obtener el 100% de mortalidad del estado más tolerante.

En la etapa IV se establecieron los daños causados por el bromuro de metilo en frutos de pomelos y mandarinas de importancia comercial.

Los resultados obtenidos en la etapa I, mostraron que los huevos tuvieron el mayor valor de DL 50, presentando diferencias significativas con las DL 50 de las larvas inmaduras y maduras en las dos especies cítricas.

En la etapa II se encontró que las DL 50 de los huevos obtenidos para las variedades de pomelos y mandarinas, no mostraron diferencias significativas entre ellas.

Los resultados obtenidos en la etapa III mostraron que no se encontraron huevos vivos en los tratamientos de 48 g/m³ con 4 y 4,5 horas y 56 g/m³ con 3; 3,5 y 4 horas de exposición.

En la etapa IV se determinó que los pomelos Marsh Seedless y las mandarinas Clemenules fueron las más susceptibles a las fumigaciones con bromuro de metilo, ya que presentaron los mayores valores de pérdida de peso y alteraciones fisiológicas.

Se concluyó que el huevo de *C. capitata* es el estado más tolerante al bromuro de metilo; que se puede obtener una mortalidad total de ese estado con fumigaciones de 48 g/m³ durante 4; 4,5 horas, y 56g/m³ durante 3; 3,5 y 4 horas a 15°C, y que los tratamientos mantienen la calidad comercial de los pomelos y mandarinas.



INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1 La citricultura en la República Argentina

La producción de cítricos es una de las actividades frutícolas más importante en la Argentina. Las condiciones climáticas óptimas de las áreas de producción, el empleo de diferentes variedades y la aplicación de tecnología de última generación, originó la obtención de frutas de alta calidad, comercializada actualmente en los principales mercados mundiales.

Argentina presenta dos zonas citrícolas definidas: el Noroeste Argentino, (Tucumán, Jujuy, Salta y Catamarca) con 59.018 hectáreas cultivadas y alrededor del 54% de la producción nacional; y el Noreste Argentino, (Entre Ríos, Corrientes, Misiones y Buenos Aires) con 78.382 hectáreas y alrededor del 45% de la producción nacional, produciendo ambas regiones 3,6 millones de toneladas.

En la actualidad, la producción de cítricos se encuentra en aumento y se estima alcanzar en pocos años los 4 millones de toneladas. El principal mercado de exportación es la Unión Europea, a la cual en los últimos años se sumaron otros como Europa Oriental, Japón y países socios del MERCOSUR (Tabla 1.1) (Federcitrus, 2011).

Tabla 1.1. Producción y exportación mundial y de Argentina de fruta cítrica fresca expresada en miles de toneladas.

Especie	Producción			Exportación		
	Mundial	Argentina	%	Mundial	Argentina	%
Naranja	46.352	1130	2,44	3415	130	3,79
Mandarina	19.543	555	2,84	1952	118	6,06
Pomelo	4.981	172	3,46	799	10	1,31
Limón	6.489	1.756	35,26	1.501	244	16,26
Total	77.365	3.613	4,67	7.667	502	6,55

Asimismo, en lo que respecta a la parte industrial, Argentina ocupa el cuarto lugar en cítricos procesados, con 1.283.000 toneladas, siendo responsable del 38% de la industrialización del limón, el 1% de mandarina, el 5% de naranja y el 9% de pomelo a nivel mundial. Los principales productos obtenidos del proceso industrial son jugo concentrado (de las cuatro especies) y aceite esencial (de limón).

La presencia de especies insectiles perjudiciales como la mosca del Mediterráneo *C. capitata*, ha generado serios inconvenientes en el intercambio de estos productos a zonas libres de la misma (Urrutia Anabalon, 1998; Segovia, 2003).

Estados Unidos, Japón, Chile y otros países poseen parte o todo su territorio libre de esta mosca, y por lo tanto, toda fruta hospedante de *C. capitata* que ingrese debe recibir tratamientos postcosecha, también llamados tratamientos cuarentenarios.

1.2 Tratamientos cuarentenarios

La introducción de una plaga en una región o país, ocasiona pérdidas económicas importantes en los cultivos, tanto por la acción directa de la plaga, como por los costos ocasionados por las medidas de control que se deben adoptar para evitar su diseminación y/o erradicación, el deterioro al medio ambiente al aplicar dichas medidas y la pérdida de mercados de exportación libres de la plaga recientemente introducida.

Para evitar la introducción de plagas, los países y/o regiones consumidores de frutas frescas establecen restricciones y exigencias muy firmes cuando comercializan con regiones y/o países que presentan la plaga en cuestión. Entre las distintas exigencias se encuentran los tratamientos postcosecha o cuarentenarios. El objetivo de estos tratamientos es buscar la eliminación total de la plaga de manera de minimizar el riesgo de introducción de la misma como consecuencia de la comercialización del producto.

1.2.1 *Tratamientos cuarentenarios físicos*

1.2.1.1 *Irradiación*

Los isótopos radiactivos y la radiación gamma se han utilizado en el campo de la entomología, principalmente para los estudios de biología, comportamiento, combate autocida de insectos plagas a través de la técnica del insecto estéril (TIE) y como tratamiento cuarentenario. El cobalto 60 es el emisor de radiación gamma más comúnmente utilizado para el control cuarentenario o para esterilizar insectos. Los rayos gamma producen alteraciones que lesionan las cadenas de ADN al colisionar con ellas, fracturándolas o desnaturalizando sus funciones.

Las ventajas que tiene este tipo de tratamiento es que no deja residuo en las frutas o elemento irradiado, es rápido, no modifica la temperatura del producto y puede aplicarse en una amplia variedad de productos. Las desventajas son que no todos los países lo aceptan como válido (por ejemplo Japón), falta de conocimiento por parte del público del uso de la energía ionizante, instalaciones costosas y frutos con alto contenido de jugo o ambientes con bajos niveles de oxígeno, pueden reducir la eficacia del tratamiento.

1.2.1.2 *Aire caliente forzado*

En este tratamiento, la humedad relativa no supera el 60% pudiendo fluctuar durante el mismo. La transferencia de calor es únicamente por convección y durante el proceso se deben mantener elevadas las temperaturas de la pulpa y de la superficie del fruto para eliminar los insectos. Estos mueren en un corto período de tiempo al exponerlos a temperaturas que oscilan entre 45 a 60°C. La causa de la mortalidad por las altas temperaturas puede ser explicada desde el punto de vista fisiológico debido a un desorden químico que ocasiona la coagulación de las proteínas, la pérdida de agua del cuerpo o deshidratación, inhibición de la acción enzimática, etc.

En Estados Unidos se desarrolló el primer tratamiento de aire forzado para eliminar tres tipos de moscas de los frutos: *C. capitata*, *D. cucurbitae* y *D. dorsalis* en papayas infestadas de Hawaii. La humedad relativa utilizada fue de 40-60% 47,2°C durante 2 horas (Armstrong *et al.* 1989). También se realizaron experiencias para

eliminar adultos de “trips” *Heliethrips haemorrhoidales* Bouche, y el quinto estadio larval de la “polilla de la manzana” *Epiphyas postvittana* Walker, sobre la superficie del níspero japonés *Diospyros kaki* L. Se empleó aire caliente a una temperatura de 47°C y una HR de 55-60% durante 15 minutos, logrando una mortalidad del 100% sin deteriorar la fruta (Cowley *et al.* 1992a). También se realizaron investigaciones para determinar la tolerancia de los huevos y larvas de *Bactrocera tryoni* al vapor de agua (Heard *et al.* 1992). Las desventajas que tiene este tratamiento son su alto costo de equipamiento, difícil regulación de temperatura y humedad y numerosos daños en los frutos (alteración del sabor, deformación, manchas sobre la superficie, deterioro de la pulpa y pudrición).

1.2.1.3 Inmersión en agua caliente

Este método consiste en sumergir un producto (frutos, vegetales, raíces y tallos) en un baño de agua caliente a una temperatura específica durante un tiempo determinado, según el producto del cual se trate y de las plagas que pudieran estar presentes en él. La causa de la mortalidad de los insectos es la misma que en el tratamiento anterior y fue desarrollado con éxitos en frutos tropicales (Gould y Sharp, 1992). Entre las ventajas y desventajas de este tratamiento pueden mencionarse que no contamina el ambiente ni perjudica la salud humana, pero sólo puede ser aplicado a frutos que resisten altas temperaturas; este método tiene un elevado costo de inversión. Armstrong (1982) logró la eliminación de los estadios inmaduros de *C. capitata* y *Bactrocera dorsalis* Hendel en bananas, y actualmente se lo usa para la desinsectación de mangos afectados por *C. capitata* y *Anastrepha* sp. También se realizaron investigaciones para evaluar la sensibilidad de los estados de desarrollo de diferentes especies de moscas de los frutos a este tipo de tratamiento, con el objetivo de su posterior aplicación como tratamiento cuarentenario (Glosser, 1990; Jang, 1986; Jang *et al.* 1999).

1.2.1.4 Vapor de agua

Es un método de desinfección que aplica vapor saturado a una temperatura aproximada de 43-50°C. El aire húmedo se condensa cuando el agua entra en contacto

con la superficie fría de la fruta al inicio del tratamiento, liberando calor y aumentando el calor de conducción. La muerte de los insectos se produce de la misma forma que en los tratamientos con altas temperaturas, los cuales fueron descritos anteriormente. Este método de desinfección pasó a reemplazar a los de aire caliente e inmersión en agua caliente por ser menos agresivo con los frutos. Puede ser aplicado para el control de diferentes plagas siempre que el hospedante lo tolere (Carpenter y Potter, 1994).

1.2.1.5 Atmósfera controlada

La tecnología de atmósfera controlada trabaja por reducción de la respiración, demorando la producción de etileno, inhibiendo la reproducción de patógenos y matando insectos. El gran impacto sobre los insectos es alcanzado por el mantenimiento de bajas concentraciones de O₂ en un período extenso de tiempo, el cual conduce a una privación de O₂ en los tejidos de los insectos. Las ventajas de este tratamiento son la prolongación del período óptimo de conservación, reducción de las mermas por peso y del ataque fúngico. Sin embargo, presenta una inversión inicial elevada puesto que necesita de un equipamiento tecnológico específico para su funcionamiento.

1.2.1.6 Frío

Este tratamiento consiste en exponer las frutas a bajas temperaturas, generalmente por debajo de los 3°C, por períodos de tiempos que garanticen la completa eliminación de las plagas. Es una buena alternativa para productos cuyo destino es lejano y su traslado ocurre en barco, lo cual permite someter a la fruta y/o producto a cierta temperatura por un período prolongado. Otra ventaja es el hecho de ser un tratamiento aceptado internacionalmente. Por sus características, sin embargo no resulta apropiado para productos tropicales y subtropicales, ya que estos no resisten tratamientos a bajas temperaturas y potencian el deterioro de las frutas ocasionado por una cosecha y transporte deficiente. Gould *et al.* (1990) desarrollaron un tratamiento de 15 días a 1,1°C, para carambolas infestadas con *A. suspensa* Loew de Florida, con destino a California. Por su parte, Gastaminza (2002), desarrolló un tratamiento cuarentenario para limones del Noroeste Argentino con destino a Japón, y determinó

que manteniendo la fruta a $2 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 19 días se eliminaban todos los estadios de desarrollo de *C. capitata*.

1.2.2 Tratamientos cuarentenarios químicos

En estos tratamientos se emplean fumigantes que se caracterizan por ser sustancias orgánicas volátiles, generalmente con uno o más halógenos, que se convierten en gases a una temperatura mayor o igual a $4,4^{\circ}\text{C}$. Estos fumigantes son efectivos como agentes de control porque la mayoría son altamente tóxicos y se difunden rápidamente. Entre los productos más utilizados se encuentran la fosfina y el bromuro de metilo. La ventaja de estos tratamientos es que generalmente controlan un amplio rango de plagas, requieren poco tiempo de exposición, son de fácil manejo y bajo costo de implementación comparado con los tratamientos cuarentenarios físicos. Tienen la desventaja de ser perjudiciales para el ambiente y la salud humana ya que se utilizan compuestos tóxicos (Lins, 1982; Windeguth y King, 1982).

1.2.2.1 Tratamientos con fosfina

La fosfina es un fumigante que presenta dos tipos de formulaciones. Uno es el fosforo de aluminio o de magnesio en pastillas o pellets, y el otro como fosforo de hidrógeno envasado en mezcla con CO_2 . Este último es empleado en tratamientos cuarentenarios en Japón. El estado activo es el gaseoso, teniendo la fosfina pura un tiempo de fumigación más corto que el fosforo de aluminio, razón por la cual puede ser aplicado en plantas vivas y productos frescos. El problema que presenta la fosfina pura cuando se mezcla con aire a concentraciones superiores a 18.000 ppm (1,8% de fosfina) es que forma mezclas explosivas. En la actualidad, se desarrolló un nuevo método de aplicación de fosfina a través de un horno generador (HDS, Horn Diluphos System) que permite la dilución directa de la fosfina pura envasada en cilindros con aire para obtener una mezcla a una concentración de 10.000 ppm. Este gas actúa sobre los insectos por asfixia, inhibe la actividad de la enzima colinesterasa afectando procesos metabólicos y enzimáticos del sistema respiratorio de los insectos.

Este tipo de tratamiento tiene la ventaja de que puede ser aplicado a un amplio rango de insectos (plagas de granos almacenados, algunas cochinillas, ácaros y trips).

Una vez liberada la fosfina a la atmósfera se oxida rápidamente a ácido fosfórico por acción de la luz solar. Además, este tratamiento no afecta el poder germinativo ni el rendimiento de las semillas de cereales, sorgos y legumbres. Sin embargo, presenta la desventaja de que requieren mayores períodos de exposición (varias horas), altos costos operativos y es altamente tóxico para el hombre y los animales.

En Japón se realizaron investigaciones sobre tratamientos con fosfina para el control de la polilla del duraznero *Carposina niponensis* en ciruela, cereza, nectarines, y pera, y determinaron que el tratamiento produjo la muerte de los huevos de esta polilla sin observarse frutos con daños. También se realizaron pruebas de gran escala utilizando el horno generador de fosfina para el control de tres especies de ácaros en peras variedad “Nijisseiki”. Las condiciones del tratamiento fueron 1,5 g/m³ de fosfina durante 24 horas a 15°C y se trataron todos los estados de desarrollo de las plagas. El tratamiento produjo el 100% de mortalidad de la plaga y no dañó la fruta fumigada (Soma *et al.*, 2000; 2002).

1.2.2.2 Tratamientos con bromuro de metilo

Las fumigaciones con bromuro de metilo son las más utilizadas en el mundo. El principal motivo radica en el hecho que son tratamientos aplicables a un amplio rango de productos fruti-hortícolas, son rápidos, económicos y eficientes. Es así que países como Estados Unidos, Japón y Chile, desarrollaron tratamientos con bromuro de metilo adaptados a las condiciones de producción de sus cultivos frutícolas y hortícolas, los cuales facilitaron el intercambio comercial y el crecimiento económico de la actividad (Yokohama, 1994a).

1.2.2.1 Modo de acción del bromuro de metilo

El bromuro de metilo actúa bloqueando las deshidrogenasas que intervienen en la formación del ATP y otras reservas energéticas de los seres vivos. Por otra parte, inhibe la citocromo-oxidasa, rompiendo la secuencia respiratoria y por lo tanto la muerte de los insectos se produce por asfixia. La acción biocida de este compuesto es

muy amplia, lo cual lo hace altamente efectivo en numerosas especies. Su penetración en los insectos se realiza a través de los espiráculos (orificios respiratorios) tanto en larvas, pupas como adultos y en el caso de los huevos difunde a través de la membrana y corión.

1.2.2.2 Susceptibilidad de los insectos al bromuro de metilo

La susceptibilidad de los insectos a los fumigantes está relacionada con su metabolismo respiratorio, el cual varía de acuerdo al estado de desarrollo. En la mayoría de las especies, el adulto tiene el ritmo respiratorio más alto, luego le sigue la larva y por último la pupa y el huevo. Asimismo, existen factores que actúan sobre la susceptibilidad de los insectos durante el proceso de fumigación como ser:

- Temperatura: la absorción y volatilización de los fumigantes se incrementa con el aumento de la temperatura, así como también la toxicidad de los mismos. En cuanto a los insectos, al aumentar la temperatura, aumenta la tasa metabólica y por ende la demanda de oxígeno (Bond, 1975; Hilton y Banks, 1997; Misumi *et al.* 2001).
- Concentración de CO₂: este factor tiene importancia en los lugares donde se realizan los tratamientos. El aumento de la concentración de CO₂ en la cámara de fumigación incrementa la susceptibilidad de los insectos ya que produce un estímulo en los centros respiratorios. Por esta razón ese producto es utilizado en mezcla con otros gases.
- Concentración de O₂: en el proceso de fumigación, la concentración de O₂ en la cámara disminuye y aumenta la concentración del químico, ocasionando un incremento de la susceptibilidad de los insectos al fumigante, facilitando la acción tóxica del mismo (Cotton, 1932; Claypool y Vines, 1956; Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, 1997).
- Estado biológico: se refiere a investigaciones realizadas para estudiar la sensibilidad de los estados biológicos de los insectos frente a diferentes fumigantes. Balock y Lindgren (1951) trabajaron con *D. dorsalis* Hendel y 53 fumigantes y determinaron que para el caso del bromuro de metilo, los huevos fueron más tolerantes que las larvas.

En el desarrollo de fumigaciones cuarentenarias para *Cydia pomonella* Linnaeus en manzanas y ciruelas exportadas a Japón, se determinó que las larvas del quinto estadio fueron las más tolerantes en manzanas, mientras que en ciruela fueron los huevos (Gaunce *et al.*, 1981; Tebbets *et al.*, 1986; Dentener *et al.* 1998).

En fumigaciones cuarentenarias de cerezas, duraznos, pelones, peras y ciruelas infestadas con *C. capitata*, se consideraron a los huevos como el estado más tolerante al bromuro de metilo, ya que éstos presentaron la menor actividad respiratoria y por lo tanto el intercambio gaseoso fue más lento, (Spitler y Couey, 1983, Armstrong y Couey, 1984b). Por el contrario, en trabajos realizados en pomelos Red Blush se determinó que las larvas del tercer estadio fueron las más tolerantes, (Marti Silva *et al.* 1992).

Hartsell *et al.* (1986) determinaron que los huevos de 24 horas de *Amyelois transitella* Walker fueron los más tolerantes en pistachos infestados con esta plaga.

En el caso de duraznos infestados con *Rhagoletis completa* Cresoon, se determinó que las larvas del tercer estadio son las más tolerantes (Yokohama *et al.* 1992)

En Japón se desarrollaron tratamientos para el control de *Carposina niponensis* Walsingham y *Conogethes punctiferalis* Guenée en manzanas exportadas a Estados Unidos, y se determinó que para ambas plagas los huevos fueron los más tolerantes (Kawakami *et al.* 1994).

De la misma forma, Zettler *et al.* (2002) trabajando con huevos, ninfas y adultos de la cochinilla *Maconellicoccidae hirsutus* Green, determinaron que las ninfas tardías fueron las más tolerantes al bromuro de metilo.

Amstrong y Whitehard (2005) evaluaron el efecto del bromuro de metilo en *C. capitata* y *D. dorsalis*. Trabajaron con dosis de 16, 32, 48, 64 g/m³ y temperaturas 15, 20, 25 y 30°C. Estos autores establecieron que los huevos de ambas moscas fueron más tolerantes al bromuro de metilo que las larvas para las temperaturas y dosis más bajas.

1.2.2.3 Ejemplos de tratamientos con bromuro de metilo

Como se mencionó, el bromuro de metilo es uno de los fumigantes más utilizado en tratamientos cuarentenarios. Como ejemplo de ello, se pueden citar a Spitler y Couey (1983); Armstrong y Couey (1984b), quienes desarrollaron fumigaciones para el control de *C. capitata* en cerezas, duraznos, pelones, peras y ciruelas. Los tratamientos que controlaron totalmente la plaga fueron:

a) 48 g/m³ durante 2 ó 3 horas y 32 g/m³ durante 4 horas, ambos a una temperatura mayor a 21°C.

b) 24 g/m³ 2,5 horas, 32 g/m³ 1,5 horas o más, y 48 g/m³ 1 hora o más. Estos tres tratamientos a una temperatura mayor de 30°C. También se desarrolló una fumigación para melones infestados con *B. xanthodes* y las condiciones del tratamiento fueron 32 g/m³ 4 horas a 21°- 26° (Cowley *et al.* 1991)

En Chile, Marti Silva *et al.* (1992) desarrollaron un tratamiento cuarentenario con 40 g/m³ de bromuro de metilo durante 4 horas a más de 21°C para el control de *C. capitata* en pomelos Red Blush.

También se desarrollaron tratamientos para otros dípteros de importancia cuarentenaria como el caso de *A. suspensa* Loew en pomelos Marsh Seedless, cuyas fumigaciones efectivas fueron 40 mg/l y 56 mg/l durante 2 horas a 21°C - 24°C. Posteriormente se establecieron fumigaciones para el control de la misma plaga en duraznos y ciruelas, cuyos tratamientos eficaces fueron 32 ó 48 g/m³ durante 1 ó 1,5 horas, 38,3 g/m³ y 20,4 g/m³ durante 2 horas, todos a 30°C, (Benchoster, 1979b; 1988).

En 1983 se desarrollaron fumigaciones para cerezas infestadas con *Rhagoletis indifferens* Curran y se determinaron que los tratamientos que tuvieron seguridad cuarentenaria fueron 64 g/m³ a 6°C – 12,5°C, 48 g/m³ a 13°C -16,5°C, 40 g/m³ a 17°C – 20,5°C y 32 g/m³ 21°C, todos durante 2 horas, (Moffit *et al.* 1983).

Asimismo se establecieron dos tratamientos para pepinos infestados con *B. cucurbitae* Coquillet y *D.dorsalis*. Las condiciones de fumigación fueron 32 g/m³ por 4 horas y 48 g/m³ por 2 horas, ambos a una temperatura mayor de 19 °C (Armstrong y

García, 1985). También se desarrollaron tratamientos para eliminar otros dípteros de importancia cuarentenaria en frutos exportados a Japón (Yokohama *et al.* 1994c).

Para la exportación de duraznos desde Estados Unidos a Nueva Zelanda, se estableció una fumigación para el control de *R. completa* Cresson. El tratamiento que produjo el 100% de mortalidad de esta mosca fue 40 g/m³ de bromuro de metilo durante 2 horas a más de 21°C (Yokohama *et al.* 1992).

En 1974, se iniciaron los trabajos para el control de *C. pomonella* en frutos de carozo y pepita. Anthon *et al.* (1975) trabajaron con cerezas infestadas con esta plaga y determinaron que el tratamiento que produjo la total eliminación de la misma fue 32 g/m³ durante 2 horas a 24°C. Posteriormente se desarrollaron tratamientos para exportar cerezas y duraznos a Japón (Yokohama *et al.* 1990a; 1990b). En el caso de las cerezas, los tratamientos que garantizaron la completa eliminación de la plaga fueron: 32 g/m³ durante 2 horas a más de 22°C, 64 g/m³ por 2 horas a 6°C, 48 g/m³ por 2 horas a más de 20°C, y para duraznos fue 48 g/m³ durante 2 horas a 21°C, (Gaunce *et al.* 1980 y 1981; Weddell *et al.* 1989; Moffit *et al.* 1992; Yokohama *et al.* 1994b; Leesch *et al.* 1999; Yokohama *et al.* 2000; Maindonald *et al.* 2001). También se desarrollaron fumigaciones para eliminar otros lepidópteros de importancia cuarentenaria cuyas condiciones de tratamientos fueron similares a las de *C. pomonella* (Yokohama *et al.* 1987; Robertson y Yokoyama, 1998).

Hartsell *et al.* (1986) trabajaron con huevos y larvas de *Amyelois transitella* Walker en pistachos y obtuvieron dos tratamientos que produjeron el 100% de mortalidad de esa plaga. Dichas fumigaciones fueron: 32 g/m³ a 15,5°C y 16 ó 24 g/m³ a 26,6°C, ambos tratamientos durante 24 horas.

En Japón, se desarrollaron tratamientos para numerosas plagas, tal es el caso de la fumigación para el control de *Carposina niponensis* Walsingham y *Conogethes punctiferalis* Guenee en manzanas exportadas a los Estados Unidos. Las condiciones del tratamiento con bromuro de metilo fueron 50 g/m³ durante 2 horas a 15°C (Kawakami *et al.* 1994).

También se desarrollaron tratamientos para la eliminación de *Tetranychus kanzawai* Kishida, *Eotetranychus sexmanaculatus* Riley, *Toxoptera citricidus* Kirkaldy,

y *Diaphorina citri* Kuwayama en mandarinas Satsuma y determinaron que el tratamiento de 48 g/m³ durante 2 horas a 15°C, fue efectivo para controlar todos los estados biológicos de las plagas (Katayama *et al.* 2001). De la misma forma, se estableció una fumigación para frutillas infestadas con *Frankliniella occidentalis* Pergande y el tratamiento seguro para eliminar esta plaga fue 20 g/m³ durante 2 horas a 20°C, (Soma *et al.* 2001).

1.2.2.4 Efecto del bromuro de metilo sobre la calidad de los frutos

Una de las condiciones que debe reunir un tratamiento cuarentenario es mantener óptimas las características de calidad de los frutos, de manera de permitir una correcta comercialización de los mismos.

Los síntomas de daño por bromuro de metilo se manifiestan de diferentes formas. Los frutos pueden presentar puntuaciones deprimidas de color marrón (pitting), bronceado de la epidermis de los frutos, decaimiento general y aceleración o retardo de la maduración (Shader *et al.* 1942; Seo *et al.* 1970; Hatton y Cubbedge, 1979; Lipton *et al.* 1982; Soma *et al.* 1994).

Benchoster (1979a) evaluó la variabilidad estacional y la tolerancia de los pomelos Marsh Seedless a las fumigaciones. Los daños en pomelos cosechados tempranamente se manifestaron con un bronceado de la epidermis y decaimiento de los frutos, en tanto que los cosechados al final de temporada no presentaron daños.

También se evaluaron las respuestas fitotóxicas de diferentes variedades de cerezas, pelones y duraznos a la fumigación. Los daños de bromuro de metilo fueron clasificados en leves, moderados y severos. Al analizar los resultados se determinó que los pelones mantuvieron inalterable su calidad. En cambio, los duraznos Fairtime, Suncrest y O'Henry, presentaron daños leves y severos. En cuanto a los efectos sobre la coloración de los frutos, sólo la cereza Bing presentó retardo en el viraje de color (Harvey *et al.* 1982a y b; Hartsell *et al.* 1992).

Hinsch *et al.* (1992) trabajaron con tres variedades de pelones de importancia comercial. Para la evaluación de los daños, utilizaron una escala de cinco categorías (0

= sin daño y 5 = daño grave) y midieron el contenido de sólidos solubles. Para el análisis de los resultados se utilizó la prueba de Tukey y determinaron que las diferencias de daños en las variedades no fueron significativas.

Hallman y King (1992) desarrollaron un tratamiento cuarentenario con bromuro de metilo para carambolas Arkin infestadas con *A. suspensa* Loew. Los resultados mostraron que no hubo diferencias significativas en cuanto al color, sabor y daños. Sin embargo, los frutos adelantaron su proceso de maduración y descomposición.

Maindonald *et al.* (1992) realizaron trabajos para determinar la susceptibilidad de cinco variedades de cerezas fumigadas con bromuro de metilo para el control de *C. pomonella* en las variedades Dawson, Bing, Rainier, Sam y Lambert. Comprobaron que las mismas no tenían efecto sobre la mortalidad de los huevos de esta plaga y no presentaron diferencias significativas con respecto a los daños.

1.3 Situación actual del bromuro de metilo

El uso del bromuro de metilo en nuestro país está regulado a través de acuerdos multilaterales ambientales de los que Argentina forma parte; dichos acuerdos son, el Convenio de Viena para la protección de la capa de ozono y el Protocolo de Montreal referido a las sustancias que afectan dicha capa. Este último protocolo establece para cada una de las sustancias, un cronograma de reducción del consumo y producción hasta su eventual eliminación, a excepción de las empleadas para cuarentena y preembarque. Los cronogramas están diferenciados según se trate de países desarrollados o de países en desarrollo, estableciendo para estos últimos, plazos más extensos de eliminación.

De acuerdo con ese protocolo, los países en desarrollo deberán eliminar completamente el consumo y la producción de bromuro de metilo a partir de 2005 hasta 2015, a excepción de aquellos usos que se consideren críticos.

Se define como uso crítico (CUE) cuando no hay alternativas o sustitutos técnicos y económicamente viables, o la falta de disponibilidad de bromuro de metilo resultaría en una significativa interrupción de mercado. En los últimos años, el consumo de bromuro de metilo en tratamientos cuarentenarios fue aumentando y esto se vio

reflejado en el número de presentaciones de CUEs provenientes de Italia (41% de su nivel de base), EE.UU. (39%), España (25%) y Australia (22%).

En el caso de EE.UU. y Canadá, este incremento se debió principalmente a la introducción de plagas de cultivos forestales que produjeron pérdidas económicas importantes, razón por la cual el Animal and Plant Health Inspections Services (APHIS) estableció la obligatoriedad de que todos los productos madereros deberían recibir tratamientos cuarentenarios, tales como fumigaciones con bromuro de metilo. En el año 2009 aumentó el consumo mundial de bromuro de metilo para uso cuarentenario, registrándose estos incrementos en China, Estados Unidos e Israel principalmente (Levaggi, 2004; UNEP, 2010).

La falta de tratamientos alternativos factibles de ser aplicados a un amplio rango de productos y plagas causaría pérdidas económicas importantes en los países en desarrollo. En Argentina, el bromuro de metilo es empleado principalmente como desinfectante de suelo (91%), mientras que el resto (9%) es utilizado en tratamientos de poscosecha y preembarque. Estas fumigaciones están reglamentadas por el Servicio de Sanidad y Calidad Vegetal Argentina (SENASA), en el cual se especifican las condiciones del tratamiento (dosis, temperatura y tiempo de exposición) para los productos hospedantes de “moscas de la fruta” (SENASA *et. al.* 2002).

1.4 Desarrollo de un tratamiento cuarentenario

Para el desarrollo de un tratamiento cuarentenario se deben cumplir con una serie de etapas que están estandarizadas y reglamentadas por las autoridades fitosanitarias de cada país. Las fases más importantes en este proceso son:

- Cría de la plaga: se debe establecer una cría en laboratorio que posea como mínimo 1000 individuos y que sea representativa de la población de campo.
- Definir los métodos de inoculación de los frutos, que pueden ser a través de infestaciones naturales o artificiales para obtener un número definido de individuos de todos los estados biológicos de la plaga (Von Windeguth *et al.* 1982).

- Determinar la sensibilidad de los estados de desarrollo de la plaga al tratamiento. Para ello se realizan pruebas con diferentes dosis y los resultados de mortalidad se analizan usando modelos de dosis respuestas como PROBIT (Pruebas de sensibilidad) (Gastaminza *et al.* 2001; Gramajo, 2004). En esta etapa se determina el estado o estadio de la plaga más tolerante al tratamiento evaluado.
- Establecer la variedad más tolerante al tratamiento, empleando una metodología similar al paso anterior, pero utilizando exclusivamente el estado de la plaga más tolerante. El análisis de los resultados se realiza de forma similar al anterior.
- Definición de las condiciones del tratamiento para producir la mortalidad total del estado más tolerante de la plaga. En esta fase se exige que se traten 3.000 o 5.000 individuos viables por repetición (Pruebas de pequeña escala).
- Análisis del efecto del tratamiento sobre la calidad de la fruta. En esta etapa se determina la sensibilidad de las diferentes variedades al tratamiento (Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, 1997).

1.5 La “mosca del Mediterráneo”

1.5.1 Ciclo de vida y distribución

C. capitata (Wiedeman), (Diptera: Tephritidae), comúnmente llamada la “mosca del Mediterráneo”, es una de las plagas más importantes en el mundo debido a su alto impacto económico y a su amplia distribución geográfica. Por su alta capacidad de adaptación a diferentes condiciones climáticas ha logrado establecerse en más de 95 países aproximadamente (Weems, 1981).

Durante su dispersión ha logrado infestar a más de 250 especies vegetales de importancia económica (Domato, 1947; Rosillo, 1953; Nasca, *et al.* 1981; Fimiani, 1989; Christenson y Foote, 1960; Cowley *et al.* 1992b), incluyendo especies de cítricos, manzana, durazno, ciruela, higo, café, como así también especies hortícolas.

Los daños originados por esta mosca comienzan en la etapa de la oviposición; las hembras adultas introducen su ovipositor en la fruta, generando una abertura a través

de la cual insertan los huevos debajo del epicarpio de los frutos. Estos orificios favorecen la entrada y el posterior crecimiento de hongos y bacterias. Las cicatrices así originadas disminuyen las cualidades organolépticas de los productos y por lo tanto, su valor comercial. Por su parte, las larvas generan galerías al alimentarse, lo que lleva a la caída del fruto (Christenson y Foote 1960); todos estos daños directos originan severas pérdidas sobre la producción.

El ciclo de *C. capitata* comienza después de la fecundación, cuando las hembras insertan los huevos dentro de los frutos. En el interior de éstos se produce el desarrollo embrionario y el postembrionario, conocido como etapa larval. Se reconocen tres estadios larvales. Al completar el tercer estadio la larva sale del fruto, apartándose del alimento, en busca de un lugar seco, y una vez alcanzado éste se inmoviliza. La cutícula larval se endurece y oscurece, formando una cubierta protectora llamada pupario. Durante los mismos, se producen las transformaciones externas e internas que darán lugar al adulto maduro o imago. La duración de las distintas etapas del ciclo son afectadas en forma significativa por la temperatura y humedad del ambiente (Shoukry y Hafez 1979), lo que determina junto con la oportunidad de hospedantes, el número de generaciones anuales de este insecto. Las temperaturas cálidas y templadas y los niveles altos de humedad representan las condiciones climáticas óptimas para su reproducción.

1.5.2 Manejo de la mosca de la fruta en Argentina

La presencia de *C. capitata* en Argentina llevó a la implementación de un Programa de Control y Erradicación de Moscas de los frutos (PROCEM), coordinado por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). Este programa tiene tres objetivos principales: 1) erradicar a la mosca de la fruta en aquellas zonas donde es técnica y biológicamente factible, 2) obtener el reconocimiento internacional de Área Libre o de Baja Prevalencia una vez alcanzado dicho logro, y 3) minimizar el impacto en las zonas donde su erradicación es técnicamente más difícil o incluso no recomendable (Cosenzo *et al.* 1997). Para alcanzar estos objetivos, se dividió al país en distintas áreas, se establecieron subprogramas dentro de cada una de ellas, y se aplicaron medidas de monitoreo y control.

Las provincias de Mendoza (PROCEM-Mendoza), San Juan (PROCEM-San Juan) y La Rioja (PROCEM-La Rioja), junto con la región Patagónica (PROCEM-Patagonia), utilizan la Técnica del Insecto Estéril (TIE) como principal medida de control para *C. capitata* (De Longo *et al.* 2000; Frissolo *et al.* 2006; Rial *et al.* 2006). Los avances en los últimos años fueron importantes ya que en 1999 el SENASA declaró Área Libre de Mosca de los Frutos a los Valles Andinos Patagónicos (Resolución N° 194/99). En 2002 se declaró Área de Escasa Prevalencia de Mosca del Mediterráneo a la provincia de Mendoza (Resolución N° 1/02). En 2003 se declaró Área Libre de Mosca de los Frutos a los Valles de Malargüe y El Sosneado, provincia de Mendoza (Resolución N° 6/03). En 2004 se declaró Área Libre de Mosca del Mediterráneo al Valle de Uco, provincia de Mendoza (Resolución N° 15/04). En 2006 se declaró Área Libre de la Plaga Mosca de los Frutos (i.e. *C. capitata* y *A. fraterculus*) a los Valles de los departamentos de San Rafael y General Alvear, provincia de Mendoza, y además a toda la región Patagónica (Resolución N° 17/06).

El éxito en los distintos programas justificó que la propuesta avanzara hacia otras provincias y regiones. Así, por ejemplo, en 2008 se declaró a la región centro del noreste (NEA), que abarca fundamentalmente las provincias mesopotámicas de Entre Ríos, Corrientes y Misiones, pero comprende también áreas cítricas ubicadas en San Pedro (Buenos Aires), Formosa y Santa Fe, como área diagnóstico.

Para que los productos hospedantes de la mosca puedan ser comercializados en las zonas de Cuyo y Patagonia, deben recibir tratamientos poscosecha como fumigaciones con bromuro de metilo (Tebbetts *et al.* 1983). El tratamiento para cítricos exige temperaturas superiores a 21°C (SENASA *et al.* 2002). La época de cosecha y comercialización de estos frutos es invernal, por lo que elevar la temperatura a 21°C genera tiempos operativos muy largos y un alto costo para las empresas de fumigaciones y productores.

Por todo lo antes expuesto, el propósito general de esta tesis fue establecer las pruebas básicas para el desarrollo de un tratamiento cuarentenario con bromuro de metilo, adaptada a las condiciones de producción de pomelos y mandarinas argentinos, conforme con estándares internacionales.



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

La interacción de dosis de bromuro de metilo y tiempo de exposición permiten disminuir la temperatura de los tratamientos en pomelo y mandarina.

2.2 Objetivo general

El objetivo general de este trabajo fue establecer las etapas básicas de un tratamiento cuarentenario con bromuro de metilo que garantice la completa eliminación de los estados inmaduros de *C. capitata* en pomelos y mandarinas.

2.3 Objetivos específicos

- Determinar el estado de desarrollo de *C. capitata* más tolerante al bromuro de metilo en pomelo y mandarina.
- Determinar si las variedades de pomelos y mandarinas influyen sobre la tolerancia del estado más resistente al bromuro de metilo.
- Determinar la dosis y tiempo de fumigación necesarios para eliminar el estado de desarrollo más tolerante de *C. capitata* a una temperatura de 15°C.
- Evaluar el efecto de los tratamientos encontrados como efectivos sobre la calidad de pomelos y mandarinas de importancia comercial.



MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material biológico

3.1.1 Frutos

Se utilizaron tres variedades de pomelos: Marsh Seedless, Henninger's Ruby, Río Red, y cinco variedades de mandarinas: Satsuma, Hernandina, Clemenules, Ellendale y Murcott, provenientes de las provincias de Tucumán y Catamarca.

3.1.1.1 Pomelos

3.1.1.1a Marsh Seedless: es el pomelo de pulpa blanca más conocido en el mundo. El tamaño de los frutos varía de mediano a grande, siendo éstos de excelente calidad de exportación (Figura 3.1).

3.1.1.1b Río Red: es un pomelo de pulpa roja, se caracteriza por poseer cáscara gruesa y forma aplanada; los frutos son comercializados principalmente en el mercado interno (Figura 3.1).

3.1.1.1c Henninger's Ruby: es un pomelo de pulpa rosada y la variedad más cultivada en el Noroeste Argentino; los frutos presentan un excelente tamaño, buen contenido de jugo y sólidos solubles, por lo que es una de las variedades más exportadas (Figura 3.1).

3.1.1.2 Mandarinas

3.1.1.2d Hernandina: es una mutación de Clementina Fina, la planta y sus frutos tienen características similares a Clementina Fina, con la excepción del periodo de cosecha, que es más tardío. La planta es grande y vigorosa, productiva, con frutos de cáscara fina, sensible a las alteraciones provocadas por las bajas temperaturas (Figura 3.1).

3.1.1.2e Clemenules: Es una mutación espontánea de Clementina Fina, la planta es grande, vigorosa. Fruto de mayor tamaño que su progenitora de maduración ligeramente posterior, cáscara algo rugosa, fácil de pelar con elevado contenido de jugo y sin semillas (Figura 3.1).

3.1.1.2f Ellendale: es un híbrido natural entre naranja y mandarina; resalta por presentar tamaño mediano a grande, buen contenido de jugo y sabor. Es una variedad poco cultivada en el Noroeste Argentino (Figura 3.1).

3.1.1.2g Satsuma: es una de las variedades más cultivadas en el mundo. Se caracteriza por tener una maduración más temprana que el resto de las mandarinas. Tiene buen tamaño, jugo y contenido de sólidos solubles (Figura 3.1).

3.1.1.2h Murcott: Esta variedad es conocida desde hace mucho tiempo, es un “Tangor” (híbrido entre mandarina y naranja) de parentesco desconocido. La planta es vigorosa de copa compacta y densa. Es muy productiva, pero tiene tendencia a la producción alternada. La fruta se produce en la terminación de las ramas, es de tamaño mediano, firme, aplanada y de color amarillo-anaranjado. La cáscara es fina bastante pegada a los gajos, tiene alto contenido de jugo muy dulce y de baja acidez, las frutas tienen muchas semillas (Figura 3.1).

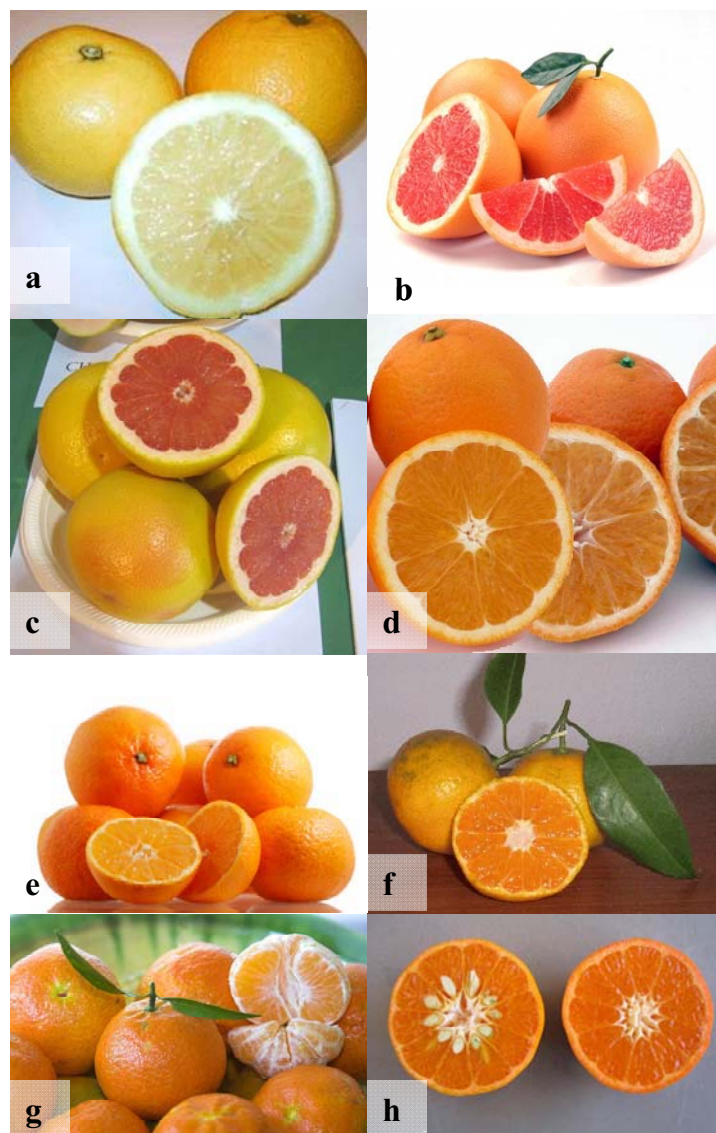


Figura 3.1. Variedades de pomelos a) Marsh Seedless b) Río Red c) Henninger's Ruby y mandarinas d) Hernandina, e) Clemenules f) Ellendale g) Satsuma h) Murcott.

3.1.2 Cría de *C. capitata*

El material fundador para iniciar la cría semi-masiva en laboratorio provino de diferentes localidades del Noroeste Argentino, con el objetivo de contar con una amplia base genética. Dichos lugares fueron: Colonia Santa Rosa y Orán en Salta, y Las Talitas, Tafi Viejo y El Ojo en Tucumán.

3.1.2.1 Jaulas de cría de adultos de *C. capitata*

La cría de adultos se realizó en cámaras acondicionadas a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, con una humedad relativa del $70 \pm 10\%$ y un fotoperíodo de 12 horas de luz y 12

horas de oscuridad. En ellas se colocaron jaulas con una capacidad volumétrica de 0,15 m³ (1 m de alto, 0,5 m de ancho y 0,30 m de profundidad). El frente y contrafrente de la jaula estaba constituido por un bastidor de aluminio recubierto por una tela de voile, que permitió el intercambio gaseoso y el paso de la luz. Por jaula se colocaron aproximadamente 10.000 pupas, las cuales se distribuyeron en el interior de la misma, en recipientes plásticos. La alimentación de los adultos se realizó con una dieta constituida por tres partes de azúcar y una de proteína hidrolizada. El agua se suministró en recipientes de plásticos con una almohadilla que se humedeció por capilaridad. La recolección de huevos se realizó una vez por día, para lo cual se usaron envases plásticos perforados para la oviposición de las moscas. Las jaulas se renovaron cada veinte días (Figura 3.2).



Figura 3.2. Jaulas con adultos de *Ceratitis capitata*

3.1.2.2 Cría de larvas de C. capitata

Las condiciones de temperatura y humedad de la cámara fueron las mismas a las detalladas para la cría de adultos. Se utilizaron bandejas de acero inoxidable de 4 cm³ de capacidad; en ellas se colocaron 2,5 kg de dieta y se sembraron 0,4 ml de huevos (a razón de 4 huevos por gramo de dieta). La humedad de la dieta larvaria se controló cada 48 horas; de ser necesario se la humedeció con una solución de agua benzoatada al 1/oo. Las bandejas se colocaron en estantes, protegidas con una tela de voile que permitió el intercambio gaseoso, e impidió la contaminación. En la base de los estantes se colocó una bandeja con arena esterilizada, en la que se recolectaron las pupas a partir del

octavo día. Una vez separadas las pupas, se mantuvieron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por espacio de siete días, después de lo cual se colocaron en las jaulas de adultos, para esperar su emergencia. A continuación se muestra la cría de larvas y se detalla en tabla los componentes de la dieta larvaria (Figura 3.3) (Tabla 3.1).



Figura 3.3. Cría de larvas de *C. capitata*.

Tabla 3.1. Componentes de la dieta larvaria de *C. capitata*.

Componentes	Porcentaje
Bagazo de caña de azúcar	6,6%
Azúcar de caña	13,1%
Harina de soja inactiva	9,1%
Levadura de cerveza	8,3%
Benzoato de sodio	0,3%
Nipagin	0,3%
Agua destilada	60,0%
Ácido cítrico	0,5%

3.2 Inoculación

La inoculación consiste en colocar dentro de la fruta hospedante los diferentes estados de desarrollo de la plaga. Esta puede ser artificial y natural forzada.

3.2.1 Artificial

Uno de los métodos que causaba el menor deterioro en la fruta y mejores condiciones de desarrollo de esta mosca fue el tipo *tapa*, que consistió en cortar un casquete del sector del pedúnculo de la fruta y retirar la pulpa de esa tapa, de manera de crear una especie de cámara de aireación. Sobre la pulpa se colocaron huevos o larvas de la mosca y se procedió al sellado de la tapa con parafina, para evitar deshidratación y la entrada de patógenos (Salvatore *et. al.* 2001) (Figura 3.4).

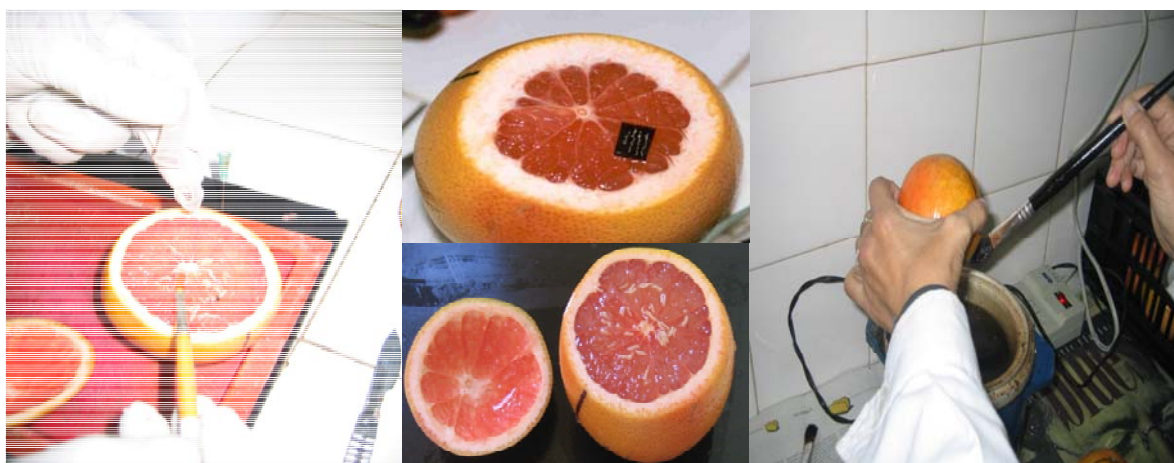


Figura 3.4: Inoculación artificial de huevos y larvas de *C. capitata*.

3.2.2 Natural forzada

Con este método se simulaban las condiciones naturales de oviposición de la mosca y se disminuyó el deterioro de la fruta. Esta inoculación consistió en colocar frutos de pomelos y mandarinas dentro de jaulas metálicas que tenían en su interior hembras de seis días de oviplenas, y machos de igual edad, en relación 2:1. La fruta permanecía dentro de las jaulas aproximadamente tres a cuatro horas (Burditt *et al.* 1974; Spliter y Couey 1983; Armstrong *et al.* 1984a) (Figura 3.5).



Figura 3.5. Inoculación natural forzada de huevos de *C. capitata*

3.3 Instrumental de fumigación

3.3.1 Cámara de fumigación

Los tratamientos se realizaron en una cámara de fumigación de bromuro de metilo de tipo experimental, cuyo volumen fue de 2 m^3 y un sistema de inyección tipo volumétrico. Dicha cámara presentaba un sensor de temperatura ambiental y cuatro sensores de temperatura de pulpa de fruta PT100. Para medir las concentraciones de bromuro de metilo dentro de la cámara, se utilizó un sistema de toma de muestras ubicado en la parte superior, media e inferior de la cámara. Las mediciones se realizaron con un analizador de gases o fumiscopio modelo D-digital.

En cada tratamiento se midieron las concentraciones de bromuro de metilo a los 30 minutos de iniciada la fumigación y a los 15 minutos antes de finalizar cada uno de ellos. La temperatura de cada sensor, concentración de bromuro de metilo y tiempo de fumigación fueron registrados automáticamente en la memoria de una computadora que posee un software específico para estas fumigaciones. Para detectar las posibles fugas de bromuro de metilo durante las fumigaciones se utilizó una lámpara de haluro, la cual posee un anillo de cobre rojo, el que actuando como catalizador, provoca la reacción del fumigante (Figura 3.6).



Figura 3.6. Cámara de fumigación: a) cámara de fumigación experimental, b) lámpara de haluro, c) computadora de registro de temperaturas, tiempo de fumigación y dosis de bromuro de metilo.

3.4 Determinación de la sensibilidad de los estados de desarrollo de *C. capitata* al bromuro de metilo

3.4.1 Material biológico

Los estados de desarrollo de *C. capitata* empleados fueron: huevos de 24 horas desde la oviposición, larvas inmaduras (del primer y segundo estadio) y larvas maduras (del tercer estadio). Se trabajó con pomelos Río Red y mandarinas Satsuma.

3.4.2 Tratamientos

Las dosis evaluadas fueron 8, 16, 24, 32 y 40 g/m³ generando entonces, cinco tratamientos. Éstos se realizaron a 15°C, durante dos horas de fumigación, y se hicieron tres repeticiones de cada uno (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Tratamientos empleados en la etapa de sensibilidad.

Tratamientos	T1	T2	T3	T4	T5
Dosis	8 g/m ³	16 g/m ³	24 g/m ³	32 g/m ³	40 g/m ³
Tiempo	2 horas	2 horas	2 horas	2 horas	2 horas
Temperatura	15°C	15°C	15°C	15°C	15°C

3.4.3 Inoculación

En esta etapa los frutos fueron inoculados con el método *tapa* y se colocaron 50 individuos de cada estado por fruto. Posteriormente, la fruta fue ubicada en una cámara a 25°C por 24 horas para favorecer la adaptación de los individuos al medio.

3.4.4 Control de la muestra testigo

El día de introducción de la fruta a la cámara de fumigación se separó una muestra de frutos testigos de cada especie cítrica y de cada uno de los estados tratados, para el cálculo de la viabilidad. La muestra testigo con larvas se mantuvo por 24 horas en cámara a 25°C y se revisó al día siguiente de la fumigación.

La revisión de la muestra testigo consistió en destruir totalmente la fruta (en el caso de larvas inmaduras y maduras) en una cápsula de petri, tratando de recuperar la mayor cantidad de larvas de cada uno de los frutos, registrando el número de larvas vivas y muertas. Con esos datos se calculó la viabilidad, que es la relación entre los insectos sobrevivientes en el testigo por el número de fruta revisada.

El número de frutas a revisar por estado de desarrollo dependió de la viabilidad, ya que por tratamiento el número de insectos viables debió ser superior a 200 individuos (Gastaminza, 2002).

En el caso de la fruta inoculada con huevos de *C. capitata*, luego de 3 días incubadas a 25°C, se abrieron los frutos y los huevos fueron colocados en cajas de petri. La revisión se realizó cada 48 horas hasta que los valores de las lecturas se repitieron dos veces. En el recuento de los huevos se consideraron los eclosionados y no eclosionados.

3.4.5 Introducción en la cámara de fumigación

Cada fruta fue identificada con las siglas del estado inoculado y colocadas en bandejas plásticas abiertas, conteniendo cada una de ellas 28 pomelos y 45 mandarinas aproximadamente.

En cada fumigación o tratamiento se registraron las temperaturas de la fruta a través de los sensores de pulpas, colocados en el centro de la fruta y a una profundidad de cinco cm aproximadamente, en tres niveles diferentes, inferior, medio y superior (Figura 3.7).



Figura 3.7. Disposición de los frutos en la cámara de fumigación en las pruebas de sensibilidad

3.4.6 Revisión de frutos

Después de cada fumigación los frutos fueron almacenados a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ durante 72 horas, momento en el cual se procedió a la revisión, contando el número de individuos vivos y muertos. Se consideraron vivos aquellas larvas con movimiento y en el caso de huevos, los eclosionados (Figura 3.8).

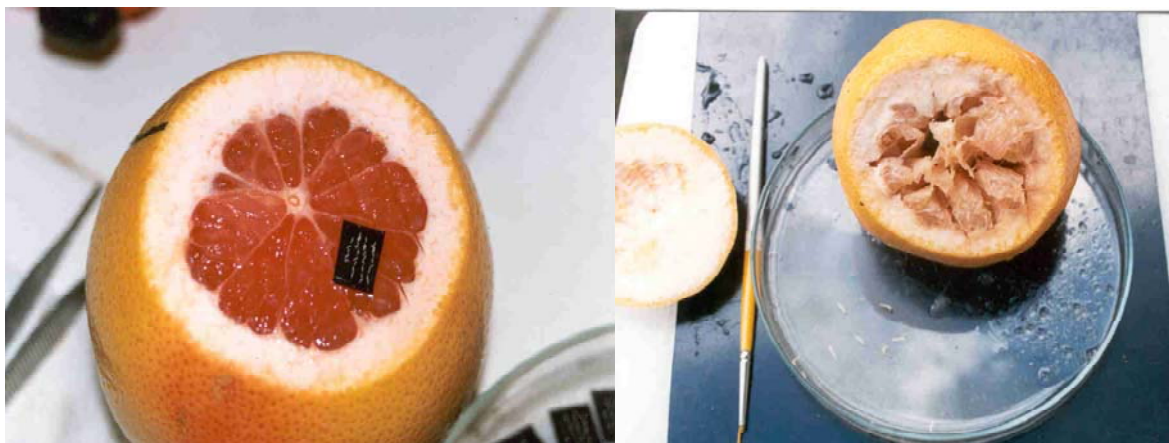


Figura 3.8. Revisión de frutos después del tratamiento

3.4.7 Registro de datos

Para cada uno de los tratamientos se confeccionaron planillas donde se registraron: número de frutos inoculados, número total de insectos inoculados, número de insectos vivos para cada uno de los tratamientos, porcentaje de mortalidad (%M) y mortalidad corregida mediante el método de Abbot (%MC).

$$\%M = \frac{(\text{n}^\circ \text{ total de insectos tratados} - \text{n}^\circ \text{ total de insectos vivos}) * 100}{\text{n}^\circ \text{ total de insectos tratados}}$$

Para la corrección de la mortalidad por el método de Abbot se tomaron en cuenta los valores de viabilidad obtenidos en los testigos determinados en las pruebas de sensibilidad, según la siguiente ecuación.

$$\% MC = \frac{(\text{Individuos vivos en el testigo} - \text{Individuos vivos en el ensayo}) * 100}{\text{individuos vivos en el testigo}}$$

3.4.8 Análisis de datos

Los resultados fueron analizados de acuerdo al método Probit (Lichtfield *et al.* 1949; Landolt *et al.* 1984). Se utilizó el programa SSPS Probit (1992) para calcular los parámetros estadísticos DL 50 con sus respectivos intervalos de confianza (IC95%) donde:

DL 50: dosis de bromuro de metilo (expresada en g/m^3) necesarios para eliminar el 50% de los insectos expuestos, para cada uno de los estados estudiados.

IC 95: intervalo de confianza del 95% que comprende a la DL50.

El criterio de selección para determinar el estado biológico más tolerante al bromuro de metilo fueron las DL 50 donde la superposición o no de los intervalos de confianza del 95% establece diferencias significativas entre los estados analizados (Finney 1971; Yokoyama *et al.* 1994b).

3.5 Determinación de la incidencia de las variedades de pomelos y mandarinas en el estado biológico de *C. capitata* más tolerante al bromuro de metilo

3.5.1 Material biológico

Se utilizaron huevos de 24 horas de *C. capitata*, por haber sido los más tolerantes en la etapa de sensibilidad. Se trataron más de 200 individuos viables por tratamiento y se hicieron tres repeticiones de cada uno de ellos. Se emplearon pomelos variedades Henninger's Ruby Marsh Seedless, mandarinas variedades Ellendale y Murcott.

3.5.2 Tratamientos

Tabla 3.3. Tratamientos empleados para determinar la incidencias de las variedades de pomelos y mandarinas en la tolerancia al bromuro de metilo.

Tratamientos	T1	T2	T3	T4	T5
Dosis	8 g/m ³	16 g/m ³	24 g/m ³	32 g/m ³	40 g/m ³
Tiempo	2 horas	2 horas	2 horas	2 horas	2 horas
Temperatura	15°C	15°C	15°C	15°C	15°C

3.5.3 Inoculación

Se contaron 50 huevos de 24 horas en papel de filtro negro y fueron colocados en la fruta de acuerdo a la inoculación tipo *tapa*. Se inocularon en total más de 200 huevos viables por tratamiento y se realizaron 3 repeticiones de cada uno de ellos.

3.5.4 Revisión de los frutos

Los frutos fumigados fueron colocados en cámaras a 25°C durante tres días y al cabo de este período, se abrieron los frutos y los huevos fueron colocados en cajas de petri. La revisión de los huevos se realizó cada 48 horas hasta que los valores de las lecturas se repitieron dos veces. En el recuento de los huevos se consideraron los eclosionados y no eclosionados.

3.5.5 Análisis de datos

Los resultados fueron analizados de acuerdo al método Probit (Lichtfied *et al.* 1949) y se utilizó el programa SSPS PROBIT versión Windows Advanced Statistics Realease 5.

3.6 Determinación de la dosis y tiempo de fumigación para eliminar el estado de *C. capitata* más tolerante al bromuro de metilo

En base a los resultados obtenidos en las pruebas de sensibilidad y de incidencia de las variedades cítricas, se establecieron las siguientes dosis y tiempos de fumigación a 15°C para eliminar el estado de desarrollo de *C. capitata* más tolerante al bromuro de metilo (Tabla 3.4).

Tabla 3.4. Tratamientos evaluados para eliminar el estado más tolerante de *C. capitata*.

Tratamientos	T1	T2	T3	T4	T5
Dosis	48 g/m ³	48 g/m ³	56 g/m ³	56 g/m ³	56 g/m ³
Tiempo	3.5 horas	4 horas	4.5 horas	4 horas	3.5 horas
Temperatura	15°C	15°C	15°C	15°C	15°C

Los huevos de *C. capitata* fueron inoculados en la fruta utilizando el método de inoculación natural forzado. En cada tratamiento se fumigaron más de 3000 individuos viables y se realizaron tres repeticiones de cada uno de ellos.

Para alcanzar un mínimo de 3.000 insectos viables por tratamiento, fue necesario determinar el número de huevos viables en el testigo. Para ello del total de frutas inoculadas se separó un 20%; las mismas fueron colocadas en cámaras a 25°C durante 20 horas. Posteriormente se revisaron las frutas y se extrajeron los huevos, los cuales fueron colocados en cajas de petri. Estos huevos fueron revisados a las 72 horas contándose los huevos eclosionados. La determinación de la viabilidad y del número de frutos a revisar fue similar a las pruebas de sensibilidad.

Se emplearon pomelos Río Red y mandarinas Satsuma. Después de la infestación, los frutos fueron colocados en cámaras de incubación a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ durante 20 horas aproximadamente para lograr el desarrollo embrionario. Los frutos a fumigar fueron ubicados en cajones de madera embalados como para comercialización. Se utilizó fruta de relleno hasta cubrir el 80% de la cámara de fumigación.

Las frutas fumigadas fueron colocadas en cámara de incubación a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ durante 12 días. La revisión de los frutos se realizó en dos etapas, el 80% al 8^{avo} día y el 20% restante al 12^{avo} día, debido a que se obtuvieron individuos vivos hasta el 7° día posterior al tratamiento.

En esta etapa no se realizaron análisis estadísticos, ya que el concepto de efectividad de los tratamientos se basó en la mortalidad total de los individuos tratados.

3.7 Evaluación del bromuro de metilo sobre la calidad de pomelos y mandarinas

En esta etapa se emplearon pomelos rojos variedad Río Red, rosados Henninger's Ruby y blancos Marsh Seedless. En el caso de las mandarinas, se utilizaron las variedades Hernandina, Clemenules, Ellendale y Satsuma. Se seleccionaron dos tratamientos que resultaron efectivos para eliminar el estado más tolerante de *C. capitata* y se hicieron tres repeticiones de cada uno de ellos (Tabla 3.5).

Se separaron 100 frutos de cada variedad de pomelo y mandarina, el 50% fue utilizado como testigo (fruta sin fumigar) y el 50% restante fue fumigado. Los frutos a fumigar fueron numerados y pesados individualmente, registrándose su peso en planillas. Posteriormente, fueron acondicionados de acuerdo a las condiciones de comercialización utilizándose fruta de relleno para cubrir el 80% de la capacidad de carga de la cámara de fumigación. Después de la fumigación, los frutos no fueron encerados y estuvieron almacenados en cámaras a 25°C .

Las evaluaciones de los parámetros físicos y fisiológicos se realizaron al 5° y 10° día después del tratamiento, simulando el período de transporte, distribución y comercialización de los frutos (Harvey y Harris, 1982a). En el caso de los parámetros químicos, estos fueron medidos antes de los tratamientos y al finalizar el período de

evaluación (Instituto Argentino de Sanidad y Calidad Vegetal, 1993). Para ello se extrajeron muestras de 10 frutos sobre los cuales se realizaron las determinaciones.

Los parámetros de calidad analizados fueron:

Parámetro físico. Se determinó la variación de peso expresado como porcentaje de pérdida de peso durante el período de evaluación.

Parámetro fisiológico. Los daños producidos por bromuro de metilo fueron clasificados en cuatro categorías: Sin daño (fruta sin síntomas de daño), Leve (fruta con lesiones en el 5-25% de la superficie), Moderado (fruta con lesiones en el 26-40% de la superficie) y Grave (fruta con lesiones en más del 40% de su superficie). Los valores fueron expresados como porcentaje de frutos afectados (Harvey y Harris, 1982a). Los frutos de las categorías leves y moderadas se consideraron con valor comercial.

Parámetros organolépticos. Se midieron el porcentaje de jugo (expresado como gramos de jugo contenidos en 100 gramos de fruta), grados brix (sólidos solubles totales SST), acidez (gramos de ácido cítrico en 100 ml de jugo), relación SST/acidez y contenido de vitamina C.

$$\% \text{ Jugo} = \frac{\text{Pj} \times 100}{\text{Pt}}$$

Pt: peso total de la fruta.

Pj: peso del jugo (sin pulpa ni semillas).

Tabla 3.5. Tratamientos empleados en las evaluaciones de calidad de pomelos y mandarinas.

Tratamiento	Ta	Tb
Dosis	56 g/m ³	48 g/m ³
Tiempo	3 horas	4 horas
Temperatura	15°C	15°C

3.7.1 Análisis de datos

Los resultados de los parámetros físicos, fisiológicos y organolépticos fueron analizados por un MANOVA de dos vías (Statsoft Inc., 2007). Posteriormente las medias fueron contrastadas a través de la prueba de Tukey HSD.



RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Determinación de la sensibilidad de los estados de desarrollo de *C. capitata* al bromuro de metilo

Los valores de mortalidad corregida para huevos, larvas inmaduras y maduras de *C. capitata* en pomelos Río Red y mandarinas Satsuma para las cinco dosis de bromuro de metilo evaluadas, se muestran en las Tablas 4.1 y 4.2 respectivamente.

Tabla 4.1: Mortalidad corregida de los estados de desarrollo de *C. capitata* en pomelos Río Red para cinco dosis de bromuro de metilo a 15°C durante dos horas.

Estado/Estadio	Dosis (g/m ³)	R I	R II	R III
Huevo	8	8,7	8,7	8,0
	12	23,4	27,9	32,6
	24	48,1	47,7	47,0
	32	73,9	73,3	79,9
	40	89,7	88,8	88,5
Larva inmadura	8	45,2	43,9	47,1
	12	89,8	91,0	95,2
	24	100,0	100,0	100,0
	32	100,0	100,0	100,0
	40	100,0	100,0	100,0
Larva madura	8	9,4	9,0	10,6
	12	42,5	49,1	46,1
	24	87,3	92,0	86,9
	32	100,0	100,0	100,0
	40	100,0	100,0	100,0

R I, R II y R III corresponden a las tres repeticiones realizadas.

Tabla 4.2: Mortalidad corregida de los estados de desarrollo de *C. capitata* en mandarinas Satsuma para cinco dosis de bromuro de metilo a 15°C durante dos horas.

Estado/Estadio	Dosis (g/m ³)	R I	R II	R III
Huevo	8	10,4	9,8	11,2
	12	29,4	25,6	25,3
	24	48,2	43,7	48,7
	32	75,4	71,8	82,9
	40	89,6	88,6	89,3
Larva inmadura	8	39,4	38,5	40,1
	12	86,7	86,7	92,2
	24	99,7	99,7	100,0
	32	99,3	99,7	100,0
	40	100,0	100,0	100,0
Larva madura	8	13,5	10,1	13,0
	12	46,1	45,7	47,6
	24	84,4	89,4	85,3
	32	100,0	100,0	100,0
	40	100,0	100,0	100,0

R I, R II y R III corresponden a las tres repeticiones realizadas.

Del análisis de los valores de mortalidad corregida para pomelos Río Red se observó que el 100% de la mortalidad de larvas inmaduras se obtiene a una dosis de 24 g/m³ y con 32 g/m³ para larvas maduras. Para huevos, se alcanzó una mortalidad próxima al 89% con una dosis de 40 g/m³.

En el caso de mandarinas Satsuma, la mortalidad de huevos y larvas maduras mostró una tendencia similar que para pomelos, mientras que para larvas inmaduras con una dosis de 40 g/m³ se registró una mortalidad del 100%.

4.1.1 Análisis Probit

Los valores de DL50 obtenidos mediante el análisis Probit con los datos de mortalidad corregida para huevos, larvas inmaduras y maduras en pomelos se muestran en la Tabla 4.3. La DL 50 obtenida para huevos fue significativamente superior al de las larvas inmaduras y maduras. Esto se evidencia porque los intervalos de confianza de las DL 50 de los huevos no se superpusieron con los de larvas inmaduras y maduras. A su vez, no hubo diferencias significativas entre estadios larvales, ni superposición entre los intervalos correspondientes.

Tabla 4.3: Valores de DL50 obtenidos mediante el análisis Probit para los estados de desarrollo de *C. capitata* en pomelos Río Red en fumigaciones a 15°C durante dos horas.

Estado/Estadio de desarrollo	DL 50			IC 95%		
	RI	RII	RIII	RI	RII	RIII
Huevo	22,1	21,9	20,9	16,8 – 28,6	17,6 – 27,2	16,9 – 25,5
Larvas inmaduras	8,6	8,6	8,3	7,3 – 9,6	7,1 – 9,5	7,8 – 8,7
Larvas maduras	12,2	12,1	12,2	11,2 – 13,2	11,0 – 13,1	11,2 – 13,3

Los valores de DL50 obtenidos mediante el análisis Probit con los datos de mortalidad corregida para los distintos estados de desarrollo de *C. capitata* en mandarinas Satsuma se muestran en la Tabla 4.4. Al igual que para pomelo, la DL 50 obtenida para huevos fue superior a los valores de las DL50 de las larvas inmaduras y maduras. Nuevamente esto se evidenció porque los intervalos de confianza de las DL 50 de los huevos fueron mayores y no se superpusieron con los de larvas inmaduras y larvas maduras; a su vez, no hubo diferencias significativas entre los estadios larvales, ni superposición entre los intervalos (a excepción de la RI).

Tabla 4.4: Valores de DL50 obtenidos mediante el análisis Probit para los estados de desarrollo de *C. capitata* en mandarinas Satsuma.

Estado/Estadio de desarrollo	DL 50			IC 95%		
	R I	R II	R III	R I	R II	R III
Huevo	21,2	22,5	20,8	16,1-27,2	16,3-30,7	15,9-29,2
Larvas inmaduras	9,1	9,2	8,9	7,8-10,3	8,1-10,3	8,2-9,5
Larvas maduras	11,6	12,1	11,5	10,3-12,9	11,1-12,2	10,6-12,4

Considerando los resultados obtenidos del análisis Probit en las tres repeticiones para ambas especies cítricas, se pudo observar que la DL 50 de los huevos fue significativamente mayor al de las larvas inmaduras y maduras. A su vez la DL 50 de las larvas maduras fueron más altas que las de las larvas inmaduras.

4.2 Determinación de la incidencia de las variedades de pomelos y mandarinas en el estado biológico de *C. capitata* más tolerante al bromuro de metilo

Los valores de mortalidad corregida obtenidos para huevos en pomelos Henninger's Ruby y Marsh Seedless, y mandarinas Ellendale y Murcott se muestran en las Tablas 4.5 y 4.6. La mayor mortalidad se registró con una dosis de 40 g/m³, pero no alcanzó el 100%.

Tabla 4.5: Mortalidad corregida de huevos de *C. capitata* en dos variedades de pomelos para cinco dosis de bromuro de metilo a 15°C durante dos horas.

Variedad	Dosis (g/m ³)	R I	R II	R III
Henninger's Ruby	8	9,0	9,8	10,3
	12	30,2	29,3	33,2
	24	48,0	49,1	50,1
	32	75,0	78,5	77,3
	40	90,1	90,2	91,0
Marsh Seedless	8	9,00	9,1	9,6
	12	31,5	33,0	29,0
	24	49,0	50,9	49,0
	32	76,1	78,2	79,1
	40	91,2	90,5	92,0

Tabla 4.6. Mortalidad corregida de huevos de *C. capitata* en dos variedades de mandarinas para cinco dosis de bromuro de metilo a 15°C durante dos horas.

Variedad	Dosis (g/m ³)	R I	R II	R III
Ellendale	8	11,5	11,9	10,2
	12	26,1	26,5	25,0
	24	49,8	47,2	46,9
	32	84,1	74,4	82,4
	40	89,7	88,9	89,1
Murcott	8	9,9	12,3	10,2
	12	28,1	27,1	29,0
	24	47,6	49,3	47,0
	32	77,3	80,1	79,1
	40	92,1	90,8	91,0

4.2.1 Análisis Probit

Los valores de DL50 obtenidos mediante el análisis Probit con los datos de mortalidad corregida se muestran en las Tablas 4.7 y 4.8 para las distintas variedades de pomelo y mandarina analizadas respectivamente. El pomelo Henninger's Ruby registró la mayor DL 50. Sin embargo, al comparar los intervalos de confianza de las DL 50 para las dos variedades de pomelo, se observó que los mismos se superpusieron en todos los casos. Para mandarinas, la variedad Ellendale mostró mayor DL50 que la variedad Murcott. Al comparar los intervalos de confianza de las DL 50 sobre estas dos variedades, se observó que los mismos se superpusieron en todos los casos.

Considerando los resultados obtenidos de los análisis Probit en las tres repeticiones sobre las dos variedades de pomelo y de mandarina analizadas, se pudo observar que las DL 50 de los huevos no mostraron diferencias significativas entre variedades y especies.

Tabla 4.7. Resultados del análisis Probit para huevos de *C. capitata* en dos variedades de pomelos.

Variedad	DL 50			IC 95%		
	R I	R II	R III	R I	R II	R III
Henninger's Ruby	21,3	20,9	20,5	16,6-26,7	15,9-26,6	16,4-24,9
Marsh Seedless	20,6	20,3	20,8	16,2-26,2	15,6-25,6	15,2-24,0

Tabla 4.8. Resultados del análisis Probit de la DL 50 para huevos de *C. capitata* en dos variedades de mandarinas.

Variedad	DL 50			IC 95%		
	R I	R II	R III	R I	R II	R III
Ellendale	20,6	21,5	21,2	13,8-28,6	15,3-29,4	14,3-29,6
Murcott	21,1	20,5	20,9	15,0-28,2	13,6-28,6	14,8-28,1

4.3 Determinación de la dosis y tiempo de fumigación para eliminar el estado de *C. capitata* más tolerante al bromuro de metilo

Los valores de mortalidad obtenidos para huevos sometidos a distintos tratamientos donde se evaluaron distintos tiempos de exposición y dosis de bromuro de metilo se muestran en la Tabla 4.9.

Tabla 4.9: Mortalidad de huevos de *C. capitata* en pomelo Río Red expuestos a fumigaciones con bromuro de metilo.

Tratamiento	N° de individuos tratados			N° de individuos vivos		
	R I	R II	R III	R I	R II	R III
48 g/m ³ 3,5 horas	3374	3756	3344	0	2	0
48 g/m ³ 4 horas	3753	3564	3839	0	0	0
56 g/m ³ 3 horas	3304	4050	4488	0	0	0
56 g/m ³ 3,5 horas	3817	3640	3648	0	0	0
56 g/m ³ 4,5 horas	3915	3608	3600	0	0	0

Todos los tratamientos fueron realizados a 15°C.

Se pudo observar que para los cinco tratamientos evaluados, sólo se obtuvieron individuos vivos en la repetición II del primer tratamiento, mientras que en los demás tratamientos no hubo individuos vivos.

En el caso de mandarina Satsuma, los valores de mortalidad obtenidos para los distintos tratamientos evaluados se muestran en la Tabla 4.10.

Tabla 4.10: Mortalidad de huevos de *C. capitata* en mandarinas Satsuma expuestos a fumigaciones con bromuro de metilo.

Tratamientos	N° de individuos tratados			N° de individuos vivos		
	R I	R II	R III	R I	R II	R III
48 g/m ³ 3,5 horas	3242	3815	3615	2	1	3
48 g/m ³ 4 horas	3685	3735	3447	0	0	0
56 g/m ³ 3 horas	3680	3750	3780	0	0	0
56 g/m ³ 3,5 horas	3701	3451	3576	0	0	0
56 g/m ³ 4,5 horas	3645	3512	3773	0	0	0

Todos los tratamientos fueron realizados a 15°C.

Al igual que en pomelos, solo en el primer tratamiento se obtuvieron individuos vivos, mientras que en los otros tratamientos no se registraron individuos vivos.

4.4 Evaluación del bromuro de metilo sobre la calidad de pomelos y mandarinas

4.4.1 Parámetro físico.

Los valores de pérdida de peso para los tratamientos de 48 g/m³ a 15°C cuatro horas, y 56 g/m³ a 15°C durante tres horas se muestran en la figura 4.1. La variedad que manifestó diferencias significativas en la disminución de peso fue Marsh Seedless en ambos tratamientos ($F=38,67$; $p=0,0001$). Para las variedades Río Red y Henninger's Ruby las disminuciones de peso no fueron importantes estadísticamente.

En el caso de las mandarinas, las pérdidas de peso se muestran en la figura 4.2. En las variedades Ellendale, Satsuma y Clemenules la disminución de peso presentó diferencias significativas con respecto a la fruta sin fumigar en los dos tratamientos evaluados ($F_{EII}=6,6$ $p_{EII}=0,02$; $F_{Sa}=16,27$ $p_{Sa}=0,003$; $F_{CI}=32,66$ $p_{CI}=0,0006$). Además, se observó que Clemenules presentó las mayores pérdidas de peso en el tratamiento de 56 g/m³ a 15°C durante tres horas. En mandarina Hernandina las pérdidas de peso no fueron iguales, registrándose diferencias significativas en el tratamiento de 48 g/m³ ($F=7,29$; $p=0,02$).

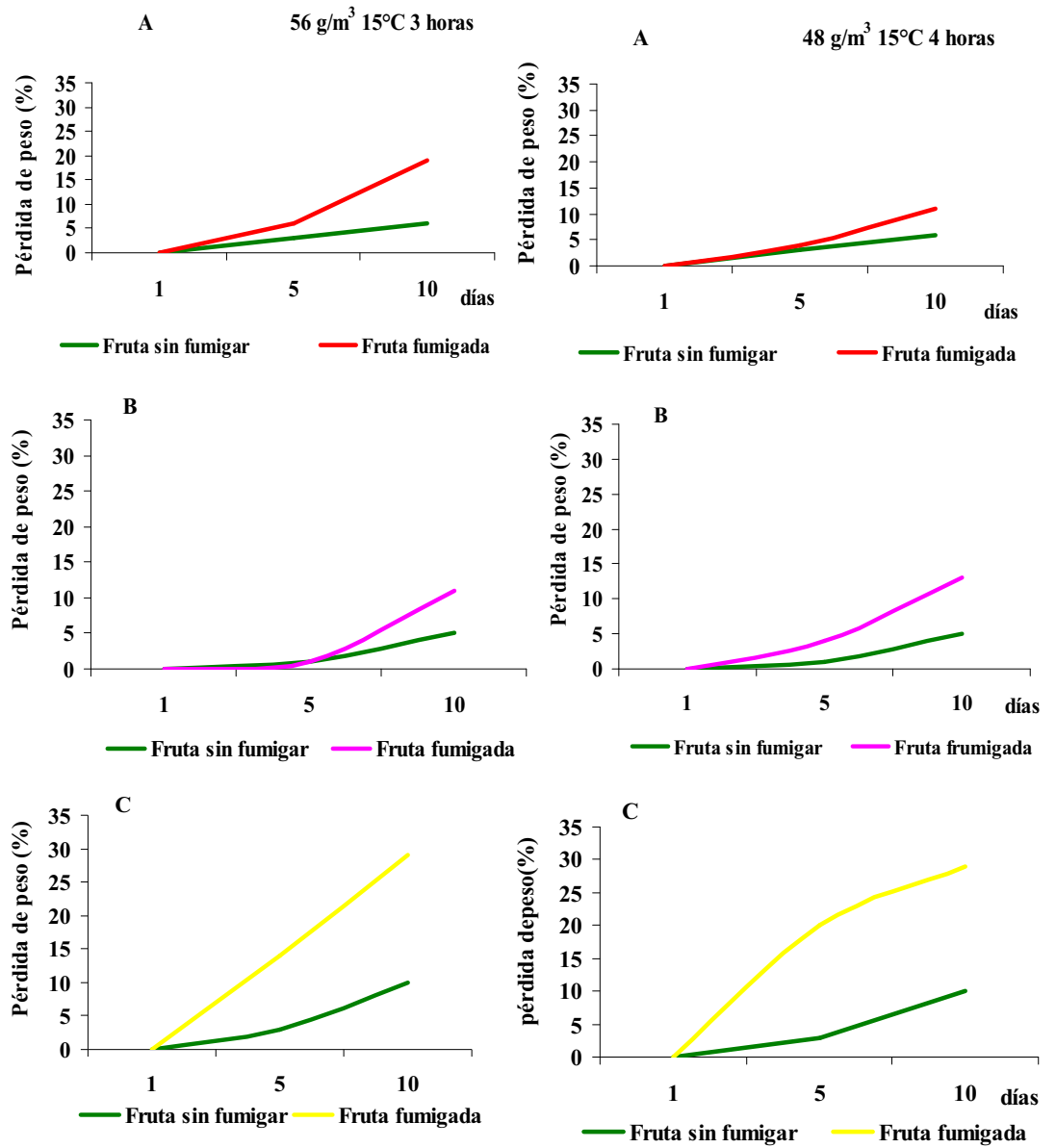


Figura 4.1. Pérdida porcentual de peso en pomelos Río Red (A), Henninger's Ruby (B) y Marsh Seedless (C) en los tratamientos de bromuro de metilo de 48 y 56 gr/m³ durante 3 y 4 horas.

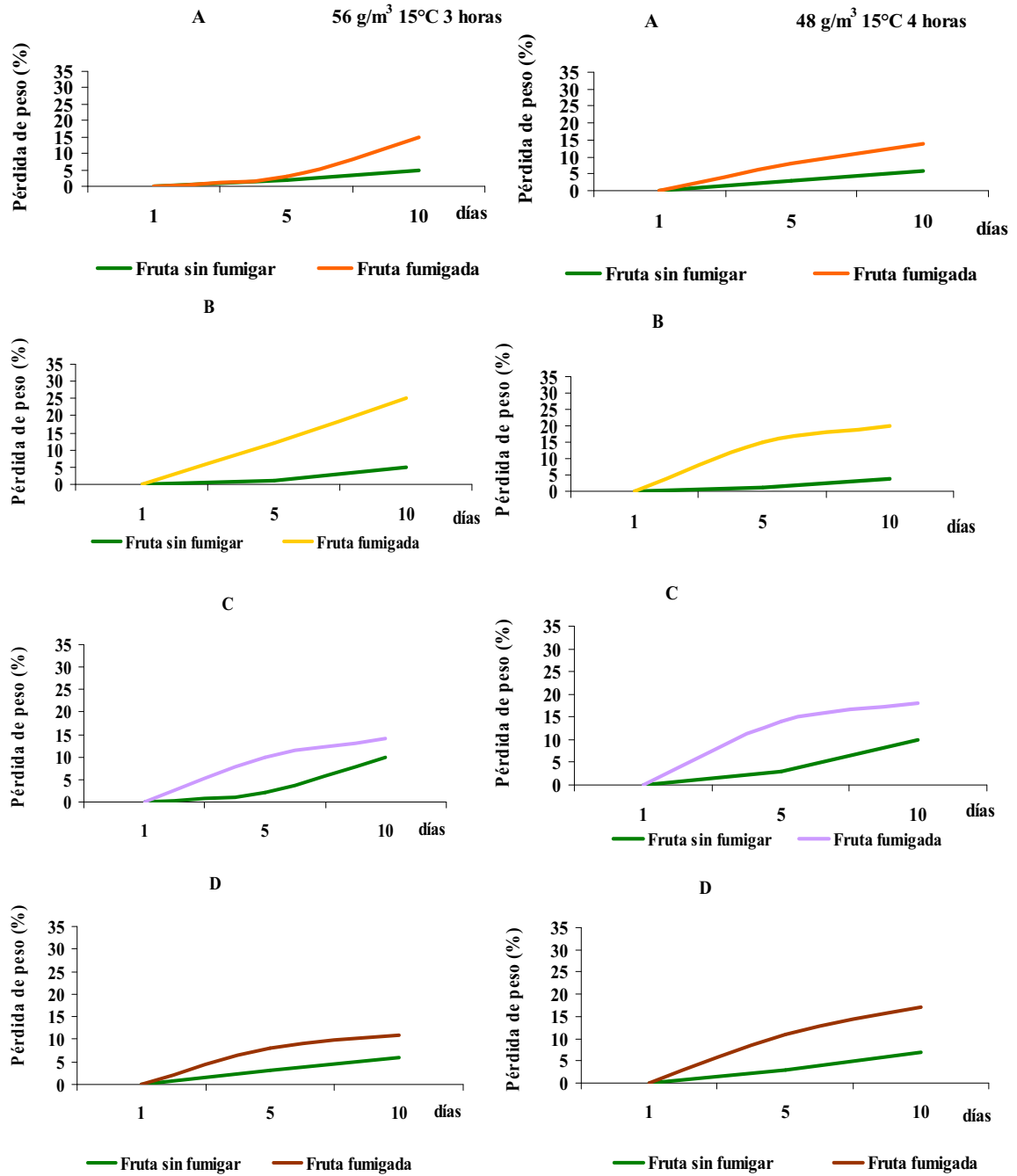


Figura 4.2. Pérdida porcentual de peso en mandarinas Hernandina (A), Clemenules (B), Ellendale (C) y Satsuma (D) en los tratamientos de bromuro de metilo de 48 y 56 gr/m³ durante tres y cuatro horas.

4.4.2 Parámetro fisiológico.

Los daños producidos por bromuro de metilo en pomelos y mandarinas se manifestaron como manchas deprimidas de color marrón en la epidermis de los frutos. Estas presentaron diferentes tamaños y distribución (Figura 4.3).

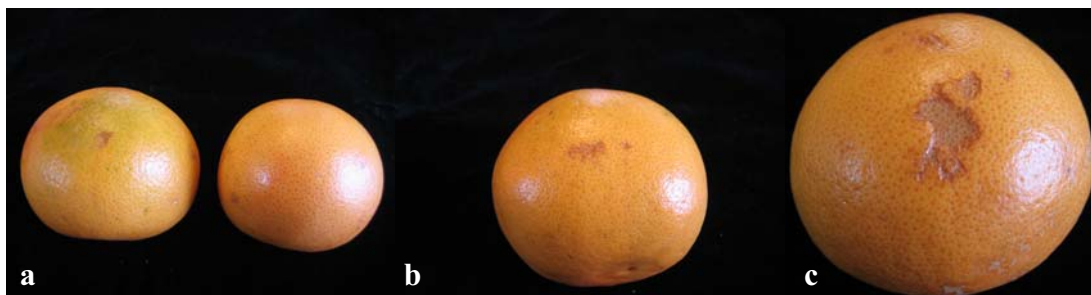


Figura 4.3. Clasificación de daños en pomelos y mandarinas: a) leve b) moderado c) grave.

En la categoría de frutos sin daños, las variedades de pomelos Río Red y Henninger's Ruby presentaron diferencias significativas con respecto a Marsh Seedless en ambos tratamientos ($F_{48}=11,97$ $p_{48}=0,008$ y $F_{56}=14,49$ $p_{56}=0,005$). Además, los daños moderados manifestaron diferencias considerables sólo en la variedad Marsh Seedless del tratamiento a 56 g/m^3 ($F= 6,32$; $p= 0,03$). En cuanto a los daños graves, Marsh Seedless se diferenció estadísticamente de las variedades Río Red y Henninger's ruby, puesto que presentó los niveles más altos de daños en ambos tratamientos ($F_{48}=6,88$ $p_{48}=0,02$ y $F_{56}=34,88$ $p_{56}=0,005$) (Figura 4.4).

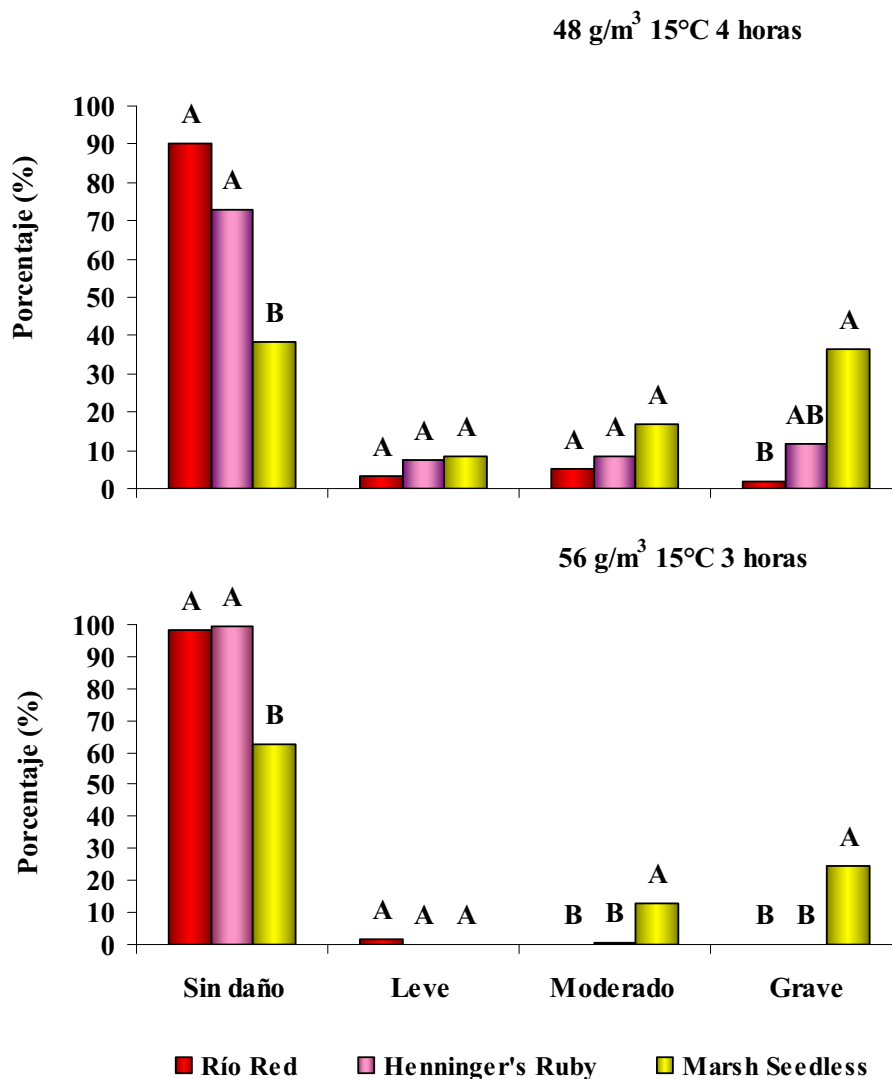


Figura 4.4. Porcentaje de daños en tres variedades de pomelos.

En mandarinas, en la categoría sin daño, las variedades Hernandina y Ellendale presentaron diferencias significativas con respecto a Clemenules en ambos tratamientos ($F_{48}=8,47 p_{48}=0,0073$; $F_{56}=8,94 p_{56}=0,0062$). Igualmente, estas mismas variedades se diferenciaron notoriamente en los daños leves del tratamiento de 56 g/m³ ($F=6,85 P=0,01$). Los daños moderados mostraron diferencias importantes en las variedades Clemenules en el tratamiento de 48 g/m³ ($F=9,24 p=0,005$) y Satsuma en el de 56 g/m³ ($F=8,1 p=0,008$). Además, en la evaluación de los daños graves, Clemenules se diferenció estadísticamente del resto de las variedades ($F=5,04 p=0,03$) (Figura 4.5).

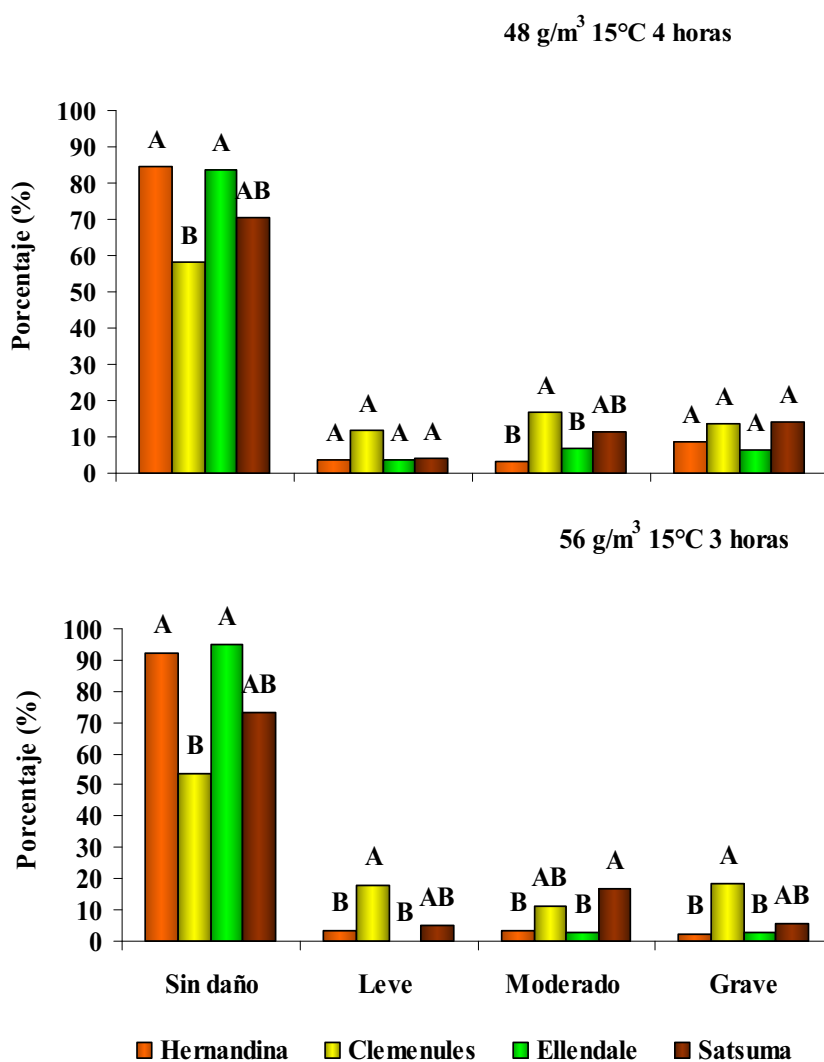


Figura 4.5. Porcentaie de daños en cuatro variedades de mandarina.

4.4.3 Parámetros organolépticos.

Las variaciones de los parámetros organolépticos en pomelos se muestran en el grafico 4.5. a) porcentaje de jugo b) Brix c) Acidez d) Ratio d) vitamina C. El porcentaje de jugo disminuyó significativamente ($F=9,6$; $p=0,0002$) en las tres variedades de pomelos para los tratamientos evaluados, observándose que la fruta sin fumigar presentó notoriamente más jugo con respecto a idéntica fruta fumigada a 48 y 56 g/m³. A su vez, para la fruta sin fumigar, la variedad Río Red presentó el menor porcentaje de jugo, difiriendo significativamente de la variedad Marsh Seedless (Fig. 4.6.a). El contenido de sólidos solubles en las variedades Henninger's Ruby y Marsh

Seedless disminuyó significativamente con la fumigación ($F=5,3$; $p=0,005$). Por otro lado, las variedades sin fumigar Río Red y Henninger's Ruby presentaron una mayor y notoria cantidad de sólidos solubles que la variedad Marsh Seedless (Fig. 4.6.b). Con respecto a la acidez, Henninger's Ruby y Marsh Seedless manifestaron diferencias significativas en los dos tratamientos ($F= 3,8$; $p= 0,01$). Asimismo, analizando la relación sólido soluble/acidez, se observó un comportamiento diferencial de Marsh Seedless fumigadas a 48 g/m^3 con respecto a la sin fumigar, manifestándose en éste último valores mayores ($F=5,3$; $p=0,0003$). En cuanto a los valores de vitamina C, se observaron diferencias importantes en Henninger's Ruby y Marsh Seedless en el tratamiento de 56 g/m^3 , registrándose los niveles más bajos en dichas variedades ($F=10,6$; $p=0,0001$). Sin embargo, Río Red no mostró diferencias significativas entre la fruta sin fumigar y fumigada.

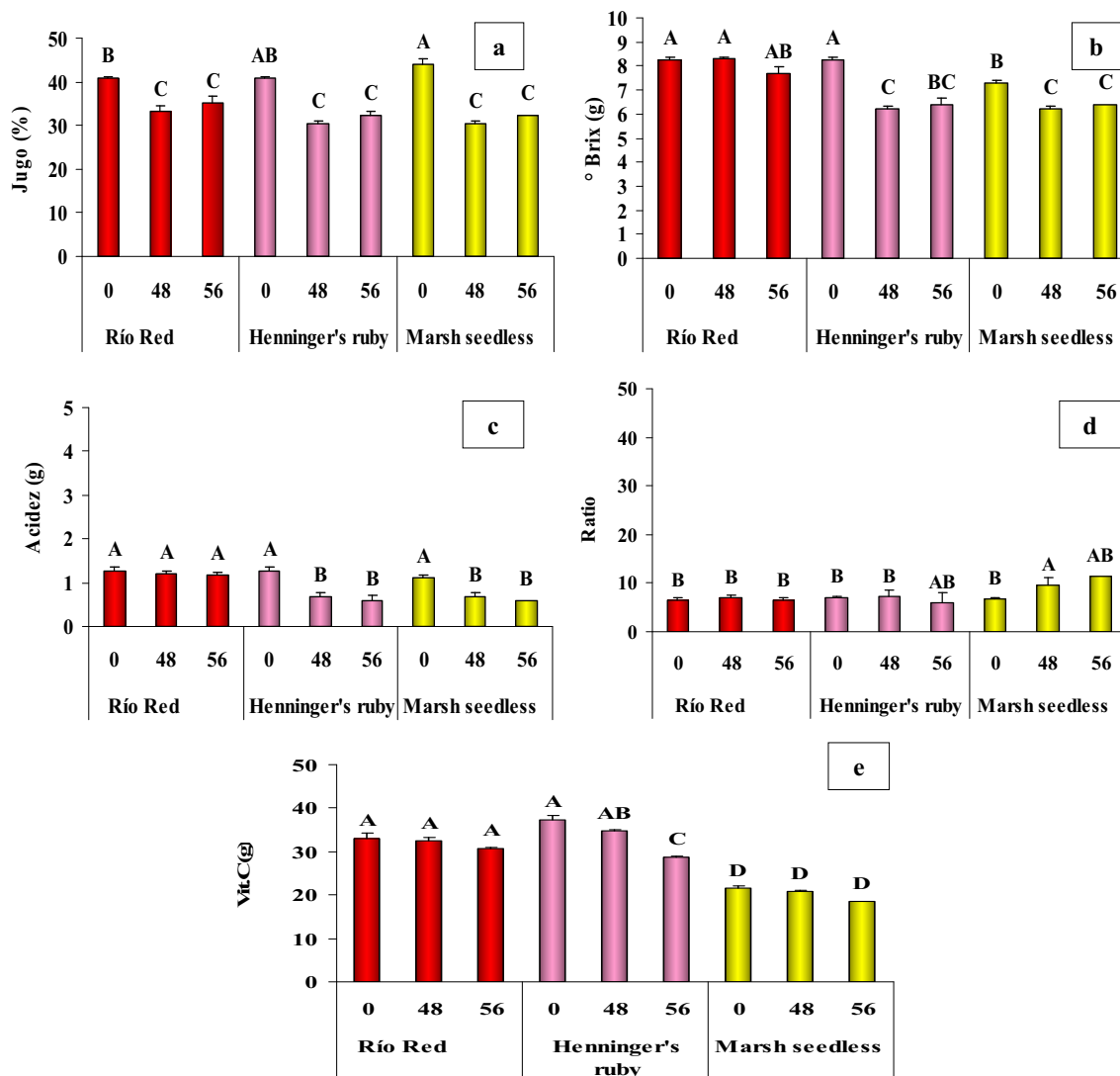


Figura 4.6. Parámetros organoléuticos de tres variedades de pomelos en los tratamientos de 48 y 56 g/m³ de bromuro de metilo durante tres y cuatro horas, a) porcentaje de jugo b) brix c) acidez d) ratio e) vitamina C.

En mandarinas, las variaciones de los parámetros organoléuticos se muestran en el gráfico 4.7. Con respecto al porcentaje de jugo se observaron diferencias significativas entre la fruta sin fumigar y fumigada en las variedades Hernandina, Clemenules y Satsuma ($F=14,81$ $p=0,00001$) (Figura 4.7a). En cuanto a los valores de sólidos solubles (Brix) se observó una disminución en las cuatro variedades fumigadas, manifestándose diferencias significativas entre Ellendale y Satsuma en ambos tratamientos ($F=2,9$ $p=0,02$) (Figura 4.7b). La acidez de la fruta fue aumentando junto con la dosis de fumigación considerada en Satsuma ($F=5,7$; $p=0,0008$), mientras que en Hernandina, Clemenules y Ellendale la situación fue a la inversa (Fig. 4.7c).

Al analizar la relación sólidos solubles/acidez, las cuatro variedades de mandarinas registraron diferencias significativas ($F=2,4$ $p=0,04$) con respecto a la fruta sin fumigar (figura 4.7d). Al observar la expresión de los valores de vitamina C, Hernandina, Ellendale y Satsuma manifestaron diferencias considerables en el tratamiento de 48 g/m^3 ($F=22,7$ $p=0,0003$) con respecto a la fruta sin fumigar de las variedades nombradas (figura 4.7).

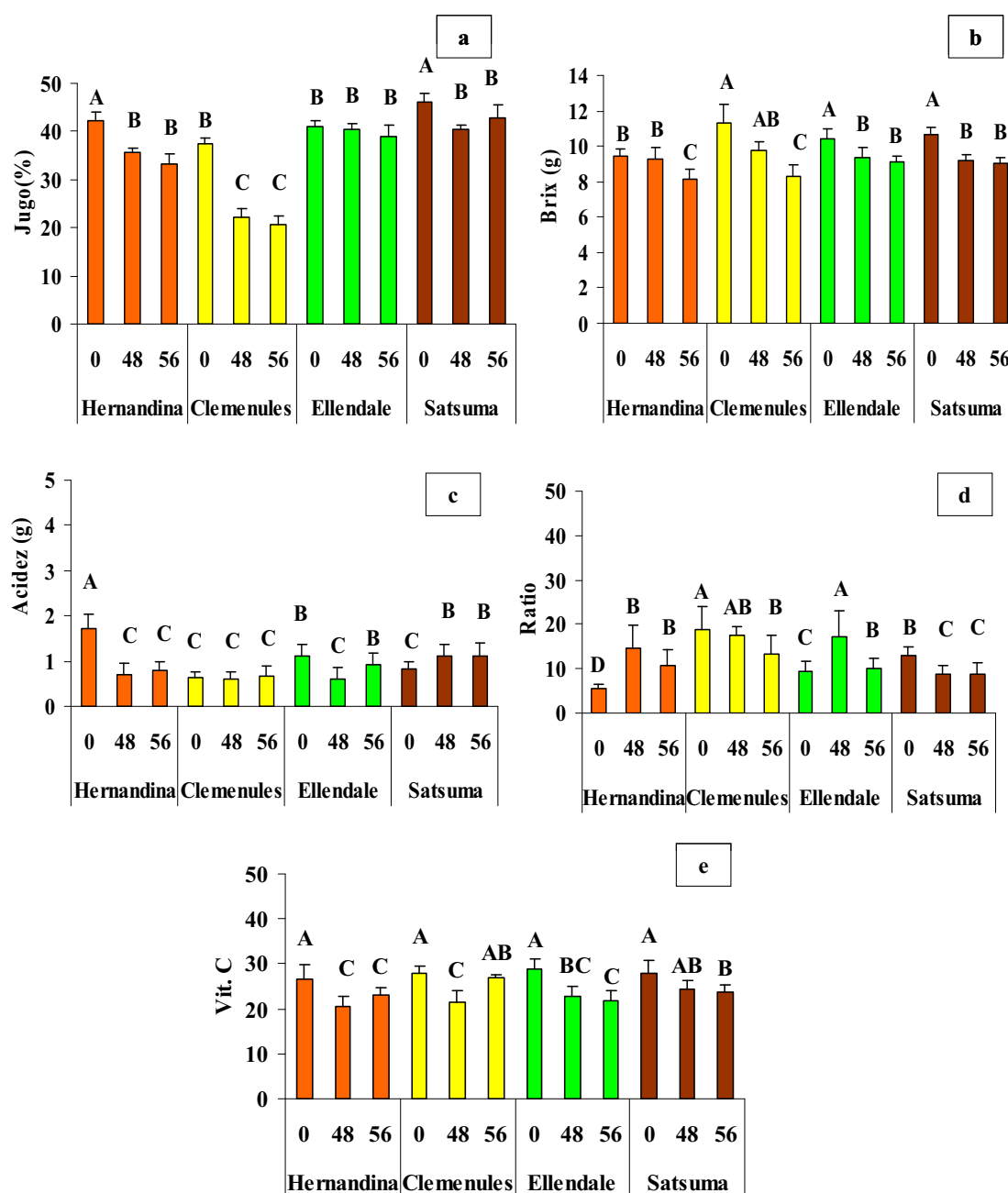


Figura 4.7. Parámetros organoléuticos de cuatro variedades de mandarinas en los tratamientos de 48 y 56 g/m³ de bromuro de metilo durante 3 y 4 horas, a) porcentaje de jugo b) °brix c) acidez d) ratio e) vitamina C.



DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los tratamientos cuarentenarios buscan eliminar una plaga en un determinado producto frutihortícola comercial para lograr el acceso a mercados que no tienen dicha plaga. Sin esta herramienta, muchos procesos comerciales serían imposibles y por lo tanto, las actividades productivas serían de difícil crecimiento. Para el desarrollo de un tratamiento cuarentenario es necesario contemplar distintos aspectos de la biología de la plaga, del tipo de tratamiento a utilizar y del producto que recibirá dicho tratamiento. En este trabajo se desarrollaron las etapas básicas de una fumigación con bromuro de metilo, analizándose el efecto de este fumigante sobre los estados de desarrollo de *C. capitata* y determinándose la influencia de las especies cítricas sobre el estado más tolerante. Se confirmó que el huevo es el estado más tolerante, sin encontrarse efecto de la variedad cítrica sobre dicha tolerancia. Además se logró establecer las dosis y tiempos de fumigación a 15°C efectivos para eliminar dicho estado y evaluar su incidencia sobre la calidad de pomelos y mandarinas de importancia comercial. Los resultados obtenidos permiten recomendar condiciones de temperatura, dosis y tiempo de exposición donde se logra eliminar a la plaga con el menor impacto sobre la calidad de la fruta.

Para determinar el estado de la mosca del Mediterráneo más tolerante al bromuro de metilo, se consideró como criterio de selección la DL 50, con sus respectivos intervalos de confianza. Se observó que el huevo es el estado más tolerante a este fumigante para ambas especies cítricas y que sus DL 50 difieren significativamente de aquellos obtenidos en larvas inmaduras (L1 + L2) y maduras (L3). Estos resultados coinciden con los trabajos realizados por Spitler y Couey (1983) y Armstrong y Couey (1984), quienes desarrollaron fumigaciones cuarentenarias con bromuro de metilo para el control de esta mosca en cerezas, duraznos, peras y ciruelas. Dichos autores encontraron que los huevos son el estado más tolerante y lo atribuyen al hecho que su actividad respiratoria está disminuida y por lo tanto el intercambio gaseoso es lento. Por su parte, Armstrong y Whitehard (2005) obtuvieron los mismos resultados al evaluar la mortalidad de *C. capitata* y *B. dorsalis* utilizando diferentes dosis y temperaturas. Para ambas especies también concluyeron que los huevos fueron

el estado más tolerante al bromuro de metilo, corroborando lo ya reportado para *B. dorsalis* por Balock y Lindaren (1951). En contraste, Marti Silva *et al.* (1992), al trabajar con pomelos Red Blush infestados con *C. capitata*, establecieron que el tercer estadio larval fue el más tolerante, al igual que Yokohama *et al.* (1992) trabajando con *R. completa* en duraznos, establecieron que el tercer estadio larval fue el más tolerante. En lo que respecta a lepidópteros, en fumigaciones desarrolladas en Japón para exportar manzanas a Estados Unidos, se determinó que los huevos de *C. niponensis* y *C. punctiferalis*, fueron el estado más tolerante al bromuro de metilo. Asimismo, Gaunce *et al.* (1981), establecieron que las larvas del quinto estadio en manzanas infestadas con *C. pomonella* fueron las más tolerantes a las fumigaciones.

En las pruebas para determinar si las variedades de pomelos y mandarinas incidían en la tolerancia de los huevos de *C. capitata* al bromuro de metilo, se observó que las DL 50 no presentaron diferencias significativas, por lo tanto las variedades no influyeron en la tolerancia de los huevos. Estos resultados fueron similares a los encontrados por Maindonald *et al.* (1992) para huevos de *C. pomonella* en cuatro variedades de cerezas, y tomando como criterio de selección la DL 99. En la misma línea de evidencia, Willink *et al.* (2007), reportaron que para pomelo, naranja y mandarina las variedades no influyeron sobre la tolerancia al frío de larvas del tercer estadio de *C. capitata*.

El estudio combinado de distintas dosis y tiempos de fumigación permitió identificar un tratamiento que garantice la mortalidad total de los huevos de *C. capitata* a 15°C. A lo largo de esta tesis, se compararon tratamientos donde se utilizaron dosis y tiempos de exposición más elevados que en las pruebas de sensibilidad, encontrándose que los tratamientos de 48 g/m³ durante 4 o 4,5 horas y 56 g/m³ durante 3, 3,5 y 4 horas fueron los más efectivos. Los resultados obtenidos en esta etapa son los primeros reportados para el control de la mosca del Mediterráneo a 15°C en pomelos y mandarinas. Los tratamientos que se proponen aquí no coinciden con las fumigaciones propuestas por Spitler y Couey (1983), ni con los de Armstrong y Couey (1984), quienes utilizaron dosis de 24, 32, y 48 g/m³ y tiempos de fumigación de 1; 1,5; 2 y 2,5

horas a 21°C o más. Tampoco coincidieron con tratamientos desarrollados a 15°C para eliminar otras plagas como *C. niponensis*, *C. punctiferalis*, *T. kanzawai*, *E. sexmanaculatus*, *T. citricidus* y *D. citri*, donde se emplearon dosis de 48 y 50 g/m³ durante 2 horas (Kawakami *et al.* 1994; Katayama *et al.* 2001). Se puede postular entonces que menores temperaturas requieren mayores tiempos de exposición.

En las evaluaciones de calidad, la disminución de peso de pomelos Río Red y Henninger's Ruby no fue significativa, salvo el caso de Marsh Seedless. Sin embargo, a pesar de ello no se debe concluir que las pérdidas no sean considerables ya que aún siendo no significativas siempre hubo una disminución de peso que, seguramente, repercute en el precio final de la fruta. En el caso de las mandarinas, todas las variedades tuvieron un comportamiento diferente entre sí, observándose que la variedad Clemenules tuvo la pérdida de peso más importante. Vazquez (1994) evaluó este parámetro en limones después de un tratamiento con frío y determinó que las disminuciones se debían a una deshidratación de la fruta durante el período de evaluación (10 días a 25°C) sugiriendo la aplicación de ceras para disminuir dicho efecto. En este sentido, las evaluaciones de calidad en este estudio podrían haberse visto influenciadas por el hecho que no se aplicó cera antes de la fumigación por lo que comparar estos resultados con los observados por el mencionado autor podría no ser válido.

Por su parte, los daños fisiológicos observados en pomelos y mandarinas fumigados fueron similares a los descritos por Anthon *et al.* (1975), Benschoter (1979b) y Hinsch *et al.* (1992). Los mismos se manifestaron en mayor porcentaje de daño en el tratamiento más largo. Sin embargo, los frutos que presentaron daños leves y moderados tuvieron valor comercial por lo que las variedades evaluadas presentaron viabilidad económica. Estos resultados coincidieron con los reportados por Hatton y Cubbedge (1979), quienes al evaluar la calidad de naranjas y pomelos determinaron que un incremento en los tiempos de exposición al bromuro de metilo aumentaba los daños en la fruta.

Con respecto a los parámetros organolépticos, las dos especies cítricas mostraron un comportamiento diferente. En pomelo, el porcentaje de jugo disminuyó en las tres variedades con respecto a la fruta sin fumigar. En cuanto al contenido de sólidos solubles y acidez, Henninger's Ruby y Marsh seedless mostraron un comportamiento diferencial con respecto a la fruta sin fumigar. Además, las diferencias en el ratio y vitamina C sólo se manifestaron en Marsh Seedless y Henninger's Ruby respectivamente. En el caso de las variedades de mandarinas, el porcentaje de jugo disminuyó en todas las variedades a excepción de Ellendale, donde no se registraron diferencias entre la fruta fumigada y sin fumigar. No obstante, al analizar los demás parámetros éstos no manifestaron un comportamiento uniforme y por lo tanto la variabilidad fue mayor. En este sentido, el análisis de estos parámetros fue uno de los primeros aportes sobre el comportamiento de variedades de mandarinas y pomelos producidos en Argentina.

En base a lo expuesto, es posible decir entonces que este trabajo de tesis representa una importante contribución al conocimiento del desarrollo de un tratamiento cuarentenario con bromuro de metilo adaptado a las condiciones de producción de los cítricos argentinos. Los resultados obtenidos en los tratamientos de 48 g/m^3 durante 4 ó 4,5 horas y 56 g/m^3 durante 3; 3,5 y 4 horas todos a 15°C son efectivos para eliminar totalmente los huevos de la mosca del Mediterráneo. Las variedades de pomelos y mandarinas evaluadas no vieron afectada su calidad en forma que impida el uso de los tratamientos propuestos. Es posible proponer entonces una evaluación de los mismos a mayor escala. De confirmarse los resultados obtenidos a gran escala, se podría proponer su aplicación en Argentina y evaluar su aplicabilidad en otros cultivos.

Además de aportar información para el conocimiento, estos resultados contribuyen al desarrollo de tratamientos postcosecha, considerando las condiciones de producción del lugar de origen de los productos frutihortícolas. A partir de este trabajo

se conocen las etapas básicas para el establecimiento de un tratamiento cuarentenario con bromuro de metilo, constituyéndose en el primer reporte sobre este tema en la Argentina.

En función de lo expuesto se puede concluir:

1. Las dosis de bromuro de metilo empleadas para eliminar huevos de *C. capitata* eliminan también larvas jóvenes (L1+L2) y maduras (L3) en pomelo y mandarina.
2. Las variedades cítricas no inciden en la tolerancia de los huevos al bromuro de metilo, por lo cual el desarrollo de un tratamiento se puede realizar en una sola variedad o especie cítrica.
3. Los tratamientos a 15°C son efectivos para eliminar *C. capitata*, por lo tanto estos tratamientos son compatibles con la época invernal de cosecha de los cítricos argentinos.
4. Las disminuciones de peso posteriores a los tratamientos fueron importantes en pomelo Marsh seedless y mandarinas Clemenules.
5. Los daños fisiológicos están directamente relacionados con el tiempo de fumigación. Cuanto más largo es el tiempo de fumigación de un tratamiento, mayores son los daños en la fruta.
6. Las variaciones en los parámetros organolépticos dependen de las características intrínsecas de cada variedad, ya que no manifiestan una respuesta uniforme a los tratamientos.



BIBLIOGRAFIA

6. BIBLIOGRAFÍA

- Anthon, E. W.; H. R. Moffitt; H. M. Couey and L. O. Smith. 1975.** Control of Codling moth in harvested sweet cherries with methyl bromide and effects upon quality and taste of treated fruit. *J. Econ. Entomol.* 68 (4): 524-526.
- Armstrong, J. W. 1982.** Development of a hot-water immersion quarantine treatment for Hawaiian-grown “Brazilian” bananas. *J. Econ. Entomol.* 75 (1): 787-790.
- Armstrong, J. W.; E. Schneider; D. Garcia; A. Makamura and E. Linse. 1984a.** Improved Holding Technique for infested Commodities Used for Mediterranean Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) Quarantine Treatment Research. *J. Econ. Entomol.* 77 (2): 553-555.
- Armstrong, J. and M. Couey. 1984b.** Methyl Bromide Treatments at 30°C for California Stonefruits Infested with the Mediterranean Fruit Fly. *J. Econ. Entomol.* 77 (5): 1229-1232.
- Armstrong, J. W. and D. García. 1985.** Methyl Bromide Quarantine Fumigations for Hawaii-grown Cucumbers Infested with Melon Fly and Oriental Fruit Fly (Diptera: Tephritidae). *J. Econ. Entomol.* 78: 1308-1310.
- Armstrong, J.; E. Schneider; D. García and H. Couey. 1989.** High temperature, forced-air quarantine treatment for papayas infested with Tephritidae fruit flies (Diptera: Tephritidae). *J. Econ. Entomol.* 82 (1): 1667-1674.
- Armstrong, J. and L. Whitehard. 2005.** Effects of Methyl Bromide concentration, fumigation, time and fumigation temperature on Med fly and Oriental Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) egg and larval survival. *J. Econ. Entomol.* 98 (4): 1116-1125.
- Balock, J. W. and D. L. Lindgren. 1951.** Toxicity of Various Compounds as Fumigants to Eggs and Larvae of the Oriental Fruit Fly. *J. Econ. Entomol.* 44 (5): 657-659.
- Benchoster, C. 1979a.** Seasonal Variation In Tolerance of Florida “Marsh” Grapefruit To a Combination of Methyl Bromide and Cold Storage. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 62: 166-167.
- Benchoster, C. 1979b.** Fumigation of Grapefruit with Methyl Bromide for Control of *Anastrepha suspensa*. *J. Econ. Entomol.* 72 (3): 401- 402.
- Benchoster, C. 1988.** Methyl Bromide Fumigation and Cold Storage as Treatments for California Stonefruit and Infested with the Caribbean Fruit Fly (Diptera: Tephritidae). *J. Econ. Entomol.* 81 (6): 1665-1667.

- Bond, E. 1975.** Control of Insects with Fumigants at Low Temperatures: Response to Methyl Bromide Over the Range 25° to – 6.7°C. *J. Econ. Entomol.* 68 (4): 539-542.
- Burditt, A. K.; D. Von Windeguth and R. J. Knight. 1974.** Induced infestation of fruit by the caribbean fruit fly, *Anastrepha suspense* (low). *Florida State Horticultural Society* 5608: 386-390.
- Carpenter, A. and M. Potter. 1994.** Controlled Atmospheres. *En:* J. L. Sharp and G. J. Hallman (eds), *Quarantine treatment for pest of food plants*, Westview Press, San Francisco, 171-198.
- Cosenzo, E.; M. Spinetta de Ruiz. y M. D'Angelicola. 1997.** Programa Nacional de Erradicación y Control de Moscas de los Frutos - PROCEM. Actas del I Taller de Trabajo sobre Avances en Investigación y Apoyo Científico al Programa Nacional de Erradicación y Control de Moscas de los Frutos - PROCEM. 27 - 29 de Mayo, Buenos Aires, Argentina.
- Cotton, R. 1932.** The relation of respiratory metabolism of insects to their susceptibility to fumigants. *J. Econ. Entomol.* 25: 1088-1102.
- Cowley, J. M.; R. T. Baker; K.G. Englberger and T.G. Langi. 1991.** Methyl Bromide Fumigation of Tongan Watermelons Against *Bactrocera xanthodes* (Diptera: Tephritidae) and Analysis of Quarantine Security. *J. Econ. Entomol.* 84 (6): 1763-1767.
- Cowley, J. M.; K. D. Chadfield and R. T. Baker. 1992a.** Evaluation of dry heat as a postharvest disinfestation treatment for persimmons. *New Zealand J. Crop and Hortic. Sci.* 20: 209-215.
- Cowley, R. T.; J. Baker and D. S. Harte. 1992b.** Definition and determination of host status for multivoltine fruit fly (Diptera: Tephritidae) species. *J. Econ. Entomol.* 85 (2): 312 - 317.
- Christenson, L. and R. Foote. 1960.** Biology of fruit flies. *Annu. Rev. Entomol.* 5: 171 – 192.
- Claypool, L. D. and H. M. Vines. 1956.** Commodity Tolerance studies o deciduos fruits to moist Heat and Fumigants. *HILGARDIA* 24 (12): 297-325.
- Dentener, P.; S. Alexander; R. Petry; G. O'Connor; K. Bennet and J. Maindonald. 1998.** Effect of a Combined Methyl Bromide Fumigation and Cold Storage Treatment on *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) Mortality on Apples. *J. Econ. Entomol.* 91(2): 528-533.

- De Longo, O.; A. Colombo; P. Gómez Riera and A. Bartolucci. 2000.** The use of massive SIT for the control of the Medfly, *Ceratitis capitata* (Wied.), Strain SEIB 6-96, in Mendoza, Argentina. *En*: Tan, K-H. (ed.). Area-wide control of fruit flies and other insect pests. Penerbit Universiti Sains Malaysia Press, Malasia. Pp. 351-360.
- Domato, J. y H. Aramayo. 1947.** Contribución al estudio de las moscas de las frutas en Tucumán. Boletín de la Estación Experimental Agrícola de Tucumán. 60: 1 - 27.
- Federcitrus (Argentine Citrus Federation). 2011.** La actividad citrícola Argentina. [En línea]. Disponible en <http://www.federcitrus.org.ar/actividad-citricola-2007.pdf>, consultado abril de 2012.
- Fimiani, P. 1989.** Mediterranean region. *En*: Fruit Flies: Their Biology, Natural Enemies and control Vol. 3a (eds. Robinson A. S. and G. H. Hooper), pp. 39–50.
- Finney, D. 1971.** Probit analysis. 3rd. Edition. Cambridge University Press. U. K.
- Frissolo, M.; G. Muñoz; A. Colombo and S. Ovruski. 2006.** Abundance variations of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) in two fruit-growing semidesert areas of La Rioja, Northwestern Argentina. *En*: Proceedings of the 7th International Symposium on Fruit flies of economic importance, Bahia, Brasil. 2006.
- Gastaminza, G.; C. Gramajo; A. Salvatore; E. Willink; A. Macián y M. E. Villagrán. 2001.** Sensibilidad al frío de *Ceratitis capitata* en diferentes variedades de cítricos. *En*: Resúmenes de la IV Reunión del Grupo de Trabajo de moscas de las frutas del Hemisferio Occidental, Mendoza, Argentina, p. 118.
- Gastaminza, G. 2002.** Tratamiento con frío para el control cuarentenario de la mosca del Mediterráneo *C. capitata* Wied. en limones del Noroeste Argentino. Tesis de Magister. Universidad Nacional de la Rioja. Centro regional de investigación científica y transferencia de tecnología de Anillaco. Argentina. p. 103.
- Gaunce, A. P.; H. F. Madsen; R. D. McMullen and J. W. Hall. 1980.** Dosage response of the stage of codling moth, *Caspeyresia pomonella* (Lepidoptera: Olethreutidae), to fumigation with methyl bromide. *Can. Entomol.* 112: 1033-1038.
- Gaunce, A. P.; H. F. Madsen and R. D. McMullen. 1981.** Fumigation with Methyl Bromide to kill Larvae and Eggs of Codling Moth in Labert Cherries. *J. Econ. Entomol.* 74 (2): 154-157.
- Gould, W. P. and J. L. Sharp. 1990.** Cold storage quarantine treatment for carambolas infested with the Caribbean fruit fly (Diptera: Tephritidae) *J. Econ. Entomol.* 83 (29): 458-460.

- Gould, W. and J. Sharp. 1992.** Hot-water immersion quarantine treatment for guavas infested with Caribbean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *J. Econ. Entomol.* 85 (4): 1235-1239.
- Glosser, J. W. 1990.** Hot water dip treatment for mangoes. *Federal register* 55: 39132-39134.
- Gramajo, M. C. 2004.** Comparación de la sensibilidad al frío entre *Anastrepha fraterculus* (Wied.) y *Ceratitidis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) en fruta cítrica. Tesis de Magister. Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo. Universidad Nacional de Tucumán. Argentina.
- Hallman, G. and J. King. 1992.** Methyl Bromide Fumigation Quarantine Treatment for Carambolas Infested with Caribbean Fruit Fly (Diptera: Tephritidae). *J. Econ. Entomol.* 85 (4): 1231-1234.
- Hartsell, P. L.; H. D. Nelson; J. C. Tebbets and P. V. Vail. 1986.** Methyl Bromide Fumigation Treatment for Pistacho Nuts to Decrease Residues and Control Navel Orangeworm, *Amyelois transitella* (Lepitoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.* 79: 1299-1302.
- Hartsell, P. L.; C. M. Harres; P. V. Vail; J. C. Tebbets; J. M. Harvey; V. Y. Yokoyama and R. T. Hinch. 1992.** Toxic Effects and Residues in Six Nectarine Cultivars following Methyl Bromide Quarantine Treatments. *HortScience* 27 (12): 1286-1288.
- Harvey, J. M.; C. M. Harris and P. L. Hartsell. 1982a.** Commodity Treatments: Response of Nectarines, Peaches and Plums To Fumigation with methyl Bromide. United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service. Marketing Research Report Number 1124: 1-11.
- Harvey, J. M. and C. M. Harris. 1982b.** Phytotoxic Responses of Cherries, Nectarines, Peaches, Pears, and Plums Fumigated with Methyl Bromide for Control of Mediterranean Fruit Fly. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 107 (6): 993-996.
- Hatton, T. and R. Cubbedge. 1979.** Phytotoxicity of methyl bromide as a fumigant for florida citrus fruit. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 92: 167-169.
- Heard, T. A.; N. W. Heather and P. M. Peterson. 1992.** Relative Tolerance to Vapor Heat Treatment of Eggs and Larvae of *Bactrocera tryoni* (Diptera: Tephritidae) in Mangoes. *J. Econ. Entomol.* 85 (2): 461-463.
- Hilton, S. J. and H. J. Banks. 1997.** Methyl Bromide Sorption and Residues on Sultanas and Raisins. *J. Stored Res.* 33 (3): 231-249.

- Hinsch, R. T.; C. M. Harris; L. P. Hartsell and J. C. Tebbets. 1992.** Fresh Nectarine Quality and Methyl Bromide Residues after In-package Quarantine Treatments. *Hortscience* 27 (12): 1288-1291.
- Instituto Argentino de Sanidad y Calidad Vegetal. 1993.** Reglamentaciones de frutas frescas cítricas para el mercado interno y la exportación. Buenos Aires. Argentina: 34-44.
- Jang, E. B. 1986.** Kinetics of thermal death in eggs and first instars of three species of Fruit Flies (Diptera: Tephritidae). *J. Econ. Entomol.* 79 (3): 700-705.
- Jang, E. B.; J. T. Nagata; H. T. Chan and W. Laidlaw. 1999.** Thermal death kinetics in eggs and larvae of *Bactrocera latifrons* (Diptera: Tephritidae) and comparative thermotolerance to three other Tephritid Fruit Fly species in Hawaii. *J. Econ. Entomol.* 92 (3): 684-690.
- Kawakami, F.; S. Motoshima; K. Miyamoto; Y. Soma; M. Mizobuchi; M. Nakamura; T. Misumi; K. Sumagawa; M. Moku; T. Akagawa and T. Kato. 1994.** Susceptibility of Each Stage of Peach Fruit Moth, *Carposina niponensis* WALSINGHAM and Yellow Peach Moth, *Conogethes punctiferalis* (GUENÉE) to Methyl Bromide Fumigation."Plant Quarantine Treatment of 'Fuji' Apples for Export to The United States". *Res. Bull. Pl. Prot. JAPAN Supplement* 30: 13-20.
- Katayama, M.; K. Mizutani; H. Kishino; S. Yabuta; H. Matsura and I. Tomita. 2001.** Mortality Tests for Kanzawa Spider Mite, Six-Spotted Mite, Tropical Citrus Aphid and Citrus Psylla on Satsuma Mandarins by Methyl Bromide Fumigation. *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* 37: 27-33.
- Landolt, P. J.; D. L. Chambers and V. Chew. 1984.** Alternative to the Use of Probit 9 Mortality as a Criterion for Quarantine Treatments of Fruit Fly (Diptera: Tephritidae)-Infested Fruit. *J. Econ. Entomol.* 77 (2): 285-287.
- Leesch, J. G.; J. S. Tebbets; D. M. Obenland; P. V. Vail and J. C. Tebbets. 1999.** Dose-Mortality and Large-Scale Studies for Controlling Codling Moth (Lepidoptera: Tortricidae) Eggs on "d'Agen" Plums by Using Methyl Bromide. *J. Econ. Entomol.* 92 (4): 988-993.
- Levaggi, M. 2004.** La posición Argentina frente al deterioro de la capa de ozono y a la eliminación del bromuro de metilo. Seminario Avances en la sustitución / eliminación del bromuro de metilo en la desinfección de suelos y sustratos. INTA-ONUDI. Modulo 1: 2-8.
- Lichtfield, J. D. and D. Wilcoxon. 1949.** A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Exp. Ther.* 96: 99-110.

- Lipton, W. J.; J. S. Tebbets; G. H. Spittler and P.L. Hartsell. 1982.** Commodity Treatments: Response of Tomatoes and Green Bell Peppers to Fumigation With Methyl Bromide o Ethylene Dibromide. U. S. Department of Agriculture, Marketing Research Report N° 1125: 1-8.
- Lins, D. 1982.** Industry's use of ethylene dibromide for fumigation. Proc. Fla. State Hort. Soc. 95: 252-254.
- Marti Silva, E.; R. Silva Vergara; M. Jiménez Torres y M. Loredó Márquez. 1992.** Tratamiento de pomelos con bromuro de metilo como medida cuarentenaria contra la mosca del Mediterraneo, *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae). Ministerio de Agricultura, Servicio Agrícola y Ganadero, Arica, Chile.
- Maindonald, J.; B. Waddell and D. Birtles. 1992.** Response to Methyl Bromide Fumigation of Codling Moth (Lepidoptera: Tortricidae) Eggs on Cherries. J. Econ. Entomol. 85 (4): 1222-1230.
- Maindonald, J.; B., Waddell and R. C., Petry. 2001.** Apple Cultivar effects on Codling Moth (Lepidoptera: Tortricidae) egg Mortality following fumigation with methyl Bromide. Postharvest Biology and Tecnology 22: 99 – 110.
- Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, 1997.** Textbook of plant quarantine treatments. Plant Protection Division Agricultural Production Bureau. Japan p. 1-83.
- Misumi, T.; Y. Soma; H. Nato; I. Matsuoka; T. Oogita and F. Kawakami. 2001.** CT Product and its Variation in Varieties of Commodities Fumigated with Methyl Bromide. Re. Bull. Pl. Prot. Japan 37:9-17.
- Moffitt, H. R.; J. B. Fountain; P. L. Hartsell and D. J. Albano. 1983.** Western Cherry Fruit Fly (Diptera: Tephritidae): Fumigation with Methyl Bromide at Selected Fruit Temperatures. J. Econ. Entomol. 76 (1): 135-138.
- Moffitt, H. R.; S .R. Drake; H. H. Toba and P. L. Hartsell, 1992.** Comparative Efficacy of Methyl Bromide Against Codling Moth (Lepidoptera: Tortricidae) larvae in “Bing” and “Rainier” cherries and Confirmation of efficacy of a quarantine Treatment for “Rainier” cherries. J. Econ. Entomol. 85 (5): 1855-1858.
- Nasca, A. J.; A. L., Teran; R. V., Fernández y A. J., Pasqualini. 1981.** Animales perjudiciales y benéficos a los cítricos en el noroeste argentino. Centro de Investigación y Regulación de Poblaciones de Organismos Nocivos, Argentina. 352 p.

- Rial, E. J.; A. P. Mongabure and C. A. Borges. 2006.** Fruit fly eradication programme in Patagonia-Argentina (PROCEM-Patagonia). *En: Proceedings of the 7th International Symposium on Fruit flies of economic importance*. Bahia, Brasil, 2006.
- Robertson, J. L. and V. Yokoyama. 1998.** Comparison of Methyl Bromide LD50 of Codling Moth (Lepidoptera: Tortricidae) on Nectarine Cultivars as Related to Natural Variation. *J. Econ. Entomol.* 91 (6): 1433-1436.
- Rosillo, A. 1953.** Resultados preliminares de un estudio bioecológico de los dípteros Trypetidae del noroeste argentino. *Revista de investigaciones agrícolas VII* (2): 97-129.
- Salvatore, A.; G. Gastaminza; M. Gramajo; E. Willink; M. Villagran; A. Macian; B. Carrizo y D. Ciancaglini. 2001.** Artificial inoculation techniques for *Ceratitis capitata* Wied. in lemon (*Citrus limon*) *In: 4th Meeting of the working group on fruit flies of the Western Hemisphere*. 190 p.
- Segovia, F. 2003.** Potencial y limitantes de la producción de cítricos en Argentina. Disponible en [http:// www.producirconservando.org.ar](http://www.producirconservando.org.ar).
- SENASA; FUNBAPA; ISCAMEN; DSV SAN JUAN. 2002.** Manual para la Habilitación de Directores Técnicos y Operadores de Cámaras de Fumigación con Bromuro de Metilo. ISCAMEN. 134
- Seo, S. T.; J. W. Balock; A. K. Burditt Jr. And K. Ohinata. 1970.** Residues of Ethylene Dibromide, Methyl Bromide, and Ethylene Chloro bromide Resulting from Fumigation of Fruits and Vegetables Infested with Fruit Fly. *J. Econ. Entomol.* 63 (4):1093-1097.
- Shader, S. A.; A. W. Beshgetoor and V. A. Stenger. 1942.** Determination of Total and Inorganic Bromide in Foods Fumigated with Methyl Bromide. *Industrial and Engineering Chemistry*. Vol. 14 (1):1-3.
- Shoukry, A. and M. Hafez. 1979.** Studies on the biology of the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*. *Ent. Exp. and appl.* 26: 33-39.
- Soma, Y.; K. Sunagawa; T. Misumi; M. Nakamura and F. Kawakami. 1994.** Efficacy of the Storage Conditions of Apples Avoiding Chemical Injury by Methyl Bromide Fumigation. *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* 30: 47-56.
- Soma, Y.; R. Misumi; H. Naito and F. Kawakami. 2000.** Tolerance of several species of fresh fruits to methyl bromide and fosfine fumigation and mortality of peach fruit moth by phosphine fumigations. *Red Bull. Pl. Prot. Japan* 36: 1-4.

- Soma, Y.; T. Akagawa; T. Misumi and F. Kawakami. 2001.** Control of Western Flower Trips in Strawberry Nurseries with Methyl Bromide. Res. Bull. Pl. Prot. Japan 37: 35-38.
- Soma, Y.; I. Matsuoka; H. Naito; Y. Tsuchiya; T. Misumi and F. Kwaka. 2002.** Disinfestations' of export Japanese pears "Nijisseiki by phosphine fumigation. 2 large-scale fumigation of Japanese pears by phosphine generator. Res Bull. Pl. Prot. Japan 38: 9-12.
- Spitler, G. and H. Couey. 1983.** Methyl Bromide fumigation of fruits, infested by the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). J. Econ. Entomol. 76 (3): 547-550.
- SPSS for Windows. Advanced Statistics. Release 5. 1992.**
- StatSoft, Inc. 2007.** STATISTICA (data analysis software system), version 8.0.
- Tebbets, J. S.; P. L. Preston; H. D. Nelson and J. C. Tebbets. 1983.** Methyl Bromide Fumigation of tree Fruits for Control of The Mediterranean Fruit Fly: Concentrations, Sorption and Residues. J. Agric. Food Chem. 31: 247-249.
- Tebbets, J. S.; P. L. Hartsell and H. D. Nelson. 1986.** Dose/response of codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) eggs and nondiapausing and diapausing larvae to fumigation with methyl bromide. J. Econ. Entomol. 79: 1039-1043.
- United Nations Environment Programme (UNEP). 2010.** Report of the Methyl Bromide Technical options committee. Montreal Protocol on Substances that Deplete the Ozone Layer. Vienna Convention, 383 p.
- Urrutia Anabalón, A. 1998.** La cuarentena vegetal en el intercambio comercial internacional. *En: Resúmenes de la II Reunión del Programa de Control y Erradicación de la Mosca de los Frutos, Buenos Aires, Argentina, 1- 8.*
- Vázquez, D. 1994.** Frigoconservación de mandarinas *Ellendale* y *Ortanique* y tratamientos de cuarentena por frío en limón *Fino*. Tesis de Magister. Universidad Politecnica de Valencia. Instituto valenciano de investigaciones agrarias. Instituto nacional de investigación y tecnología agraria y alimentaria. España, 128 p.
- Von Windeguth, D. L.; A. Arner; J. B. Owens and A. K. Burditt. 1982.** Comparison of natural field infestation versus laboratory infestability of 'Marsh' white grapefruit by caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa* (loew). Proc. Fla. State Hort. Soc. 89: 248-249.
- Weddell, B. C.; D.B. Birtles and P. R. Denter. 1989.** Methyl bromide fumigation for the control of codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) on different cherries and nectarines cultivars: a cultivar comparison test Managing Postharvest Horticulture in Australia New Agriculture & Fisheries, 157-165.

- Weems, H. V. 1981.** Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann). Fla. Dept. Agric. And Consumer Serv. Division of Plant Industry. Entomology. Circular N° 230: 1-8.
- Windeguth, D. L. and J. R. King. 1982.** A comparison of ethylene dibromide levels in fumigated Fruit Fly infested grapefruit and insect mortality. Proc. Fla. State Hort. Soc. 95:219-221.
- Willink, E.; G. Gastaminza; M. C. Gramajo; A. Salvatore; M. E. Villagrán; B. Carrizo; A. Macián; R. Ávila y P. Favre. 2007.** Estudios básicos para el desarrollo de tratamientos cuarentenarios con frío para *Ceratitis capitata* y *Anastrepha fraterculus* en cítricos de Argentina. En: Mosca de los frutos y su relevancia cuarentenaria en la citricultura del noroeste de Argentina. Once años de investigaciones 1996-2007. Willink, E.; G. Gastaminza; L. Augier y B Stein (eds.) Pp. 3: 1-6, Tucumán, Argentina.
- Yokoyama, V.; G. Miller and P. Hartsell. 1987.** Methyl Bromide fumigation to control the Oriental Fruit Moth (Lepidoptera: Tortricidae) in nectarines. J. Econ. Entomol. 80 (6): 1226-1228.
- Yokoyama, V.; G. Miller and P. Hartsell. 1990a.** Evaluation of Methyl Bromide Quarantine Treatment to Control Codling Moth (Lepidoptera: Tortricidae) on nectarine cultivars Proposed for Export to Japan. J. Econ. Entomol. 83 (2): 466-471.
- Yokoyama, V.; G. Miller and P. Hartsell. 1990b.** A Methyl Bromide Quarantine Treatment to control Codling Moth (Lepidoptera: Tortricidae) on nectarines packed in shipping containers for export to japan and effect on fruit attributes. J. Econ. Entomol. 83 (6): 2335-2339.
- Yokoyama, V.; G. Miller and P. Hartsell. 1992.** Pest-Free Period and Methyl Bromide fumigation for control of Walnut Husk Fly (Diptera: Tephritidae) in stonefruits exported to New Zealand. J. Econ. Entomol. 85 (1): 150-156.
- Yokoyama, V.; G. Miller and P. Hartsell. 1994a.** Fumigation. "Quarantine Treatment for Pests of Food Plant". J. Sharp and G. Hallman (Eds). USA. 283 (67-88).
- Yokoyama, V.; G. T. Miller and P. L. Hartsell. 1994b.** Methyl Bromide Efficacy and Residues in Large-Scale Quarantine Tests to Control Codling Moth (Lepidoptera: Tortricidae) on Nectarines in Field Bins and Shipping for Expot to Japan. J. Econ. Entomol. 87 (3): 730-735.
- Yokoyama, V.; J. H. Hatchell and G. T. Miller. 1994c.** Hessian Fly (Diptera: Cecidomyiidae) Mortality Related to Moisture, Season, Temperature and

Harvesting Practices for compressed and Fumigated Hay exported to Japan. *J. Econ. Entomol.* 87 (5): 1266-1271.

Yokoyama, V.; G. Miller; P. Hartsell and J. Leesch. 2000. Large-Scale, On-site Confirmatory, and Varietal Testing of a Methyl Bromide Quarantine Treatment to Control Codling Moth (Lepidoptera: Tortricidae) in Nectarine Exported to Japan. *J. Econ. Entomol.* 93 (3): 1025-1030.

Zettler, L.; P. Follet and R. Gill. 2002. Susceptibility of *Maconellicoccus hirsutus* (Homoptera: Pseudococcidae) to Methyl Bromide. *J. Econ. Entomol.* 95 (6): 1169-1173.