

(S5-P5)

**IONIZACIÓN CON RAYOS X COMO TRATAMIENTO
CUARENTENARIO ALTERNATIVO O COMPLEMENTARIO AL FRÍO
PARA EL CONTROL DE LA MOSCA MEDITERRÁNEA DE LA
FRUTA EN MANDARINAS ‘CLEMENULES’**

**LLUÍS PALOU⁽¹⁾, MIGUEL ÁNGEL DEL RÍO⁽¹⁾, MIQUEL ALONSO⁽¹⁾, ALICIA
MARCILLA⁽¹⁾ y JOSEP-ANTON JACAS⁽²⁾**

⁽¹⁾ Centre de Tecnologia Postcollita, Institut Valencià d'Investigacions Agràries (IVIA)
Apartat Oficial, 46113 Montcada, València, España
lluis.palou@ivia.es, Tel. 963424000, Fax. 963424001

⁽²⁾ Unitat Associada d'Entomologia Universitat Jaume I (UJI) - IVIA, UJI
Campus del Riu Sec, 12071 Castelló de la Plana, España
jacas@camn.uji.es, Tel. 964729401, Fax. 964728066

Palabras clave: cítricos – clementinas – poscosecha – *Ceratitis capitata* – radiación ionizante

RESUMEN

Tratamientos ionizantes con rayos X a las dosis de 0 (control), 195 y 395 Gy se han ensayado como tratamientos cuarentenarios contra la mosca mediterránea de la fruta. El ensayo se realizó sobre mandarinas 'Clemenules' (*Citrus reticulata* Blanco) infestadas artificialmente con larvas de tercer estadio de desarrollo de *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). Los resultados se compararon con un tratamiento estándar de cuarentena por frío (14 días a 1,5°C). El porcentaje de larvas de *C. capitata* que no llegaron a pupar fue de 14, 67, 97 y 100%, respectivamente, en frutos sometidos a 0, 195, 395 Gy y frío. El porcentaje de larvas que no llegaron a adultos fue del 16% en el control y del 100% en el resto de tratamientos. En otros ensayos se evaluó la combinación de tratamientos con rayos X a dosis bajas (0, 30, 54 y 164 Gy) con exposiciones a frío de corta duración (1°C durante 0, 2, 4, 6, 8, 10 o 12 días). Aunque la mortalidad de larvas y pupas aumentó con la dosis de rayos X y la duración de la exposición al frío, con la combinación de irradiación a 30 Gy y 2 días de frío ya se anuló completamente la emergencia de adultos. La irradiación con rayos X, como tecnología alternativa o coadyuvante de la refrigeración, se ha mostrado altamente eficaz y podría reducir sensiblemente los tiempos de cuarentena necesarios actualmente para las exportaciones españolas de mandarinas. Previamente a su recomendación como tratamiento de cuarentena comercial, es preciso contrastar estos resultados de laboratorio en ensayos a gran escala y evaluar su efecto sobre la calidad del fruto.

X-RAY IRRADIATION AS ALTERNATIVE OR COMPLEMENTARY TREATMENT TO COLD QUARANTINE FOR THE CONTROL OF THE MEDITERRANEAN FRUIT FLY IN 'CLEMENULES' MANDARINS

Keywords: citrus – clementines – postharvest – *Ceratitits capitata* – ionizing radiation

ABSTRACT

X-ray irradiation at doses of 0 (control), 195, and 395 Gy was tested as a quarantine treatment against the Mediterranean fruit fly. 'Clemenules' clementine mandarins (*Citrus reticulata* Blanco), artificially infested with third instar larvae of *Ceratitits capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae), were exposed to X-rays and, by mean of comparison, to the standard cold temperature quarantine treatment (14 days at 1.5°C). The percentages of third instar larvae that failed to pupariate and failed to reach the adult stage were 14, 67, 97, and 100%, and 16, 100, 100, and 100% on mandarins exposed to 0, 195, and 395 Gy, and cold-treated, respectively. In another set of experiments, the combination of X-rays at low doses (0, 30, 54, and 164 Gy) with short-term cold exposure (1°C for 0, 2, 4, 6, 8, 10, or 12 days) was evaluated. The mortality of both larvae and pupae increased as both the irradiation dose and the duration of cold exposure increased. However, adult emergence was completely prevented after exposure to X-rays at 30 Gy followed by a 2-day exposure to 1°C. Therefore, X-ray irradiation, as an alternative or complementary treatment to cold exposure, is a highly effective technique that could greatly reduce the period of time that is currently needed for quarantine treatment of Spanish citrus exports. Large-scale testing and evaluation of the impact on fruit quality should be conducted before delivery of final commercial recommendations.

INTRODUCCIÓN

España es el principal exportador de cítricos para el consumo en fresco (FAO, 2004). Aunque la mayor parte de las exportaciones españolas se dirigen a países de la UE, cada vez cobran mayor importancia nuevos mercados más lejanos como EE UU y Japón. Por ejemplo, los consumidores norteamericanos están mostrando gran aceptación por las mandarinas clementinas porque no tienen semillas y son muy fáciles de pelar (ERS-USDA, 2003). No obstante, la exportación a estos países exige tratamientos cuarentenarios contra la mosca mediterránea de la fruta *Ceratitits capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) (EPPO/OEPP, 2004), que es una de las plagas de fruta fresca más dañinas del mundo (White y Elson-Harris, 2004). Para satisfacer estas demandas cuarentenarias, los cítricos españoles deben someterse a un tratamiento obligatorio consistente en la exposición de los frutos a temperaturas de 1,1-2,2°C durante 14-18 días (USDA, 2002a). Sin embargo, este tratamiento de frío estándar puede afectar negativamente la calidad de ciertos cultivares que son sensibles a los daños por frío, por lo cual es necesario el desarrollo de nuevos tratamientos cuarentenarios que sustituyan la aplicación de frío (tratamientos alternativos) o permitan reducir su duración (tratamientos complementarios) (Alonso et al., 2002a, 2005; Gosalbes et al., 2004).

Se ha comprobado que las radiaciones ionizantes como los rayos γ , los electrones acelerados (rayos β) o los rayos X, son efectivas contra distintas moscas de la fruta, *C. capitata* incluida, y otras plagas de importancia cuarentenaria (Burditt, 1994; Hallman, 1999), por lo que podrían representar una opción viable para el tratamiento de los cítricos españoles de exportación. La ionización con rayos X se produce cuando electrones de alta energía chocan con un blanco metálico y, respecto a otros tipos de ionización, ofrece las ventajas de una fuente de generación no radioactiva y un alto poder de penetración en el producto

(McLaughlin, 1999). Actualmente, la legislación estadounidense permite la irradiación de frutas y hortalizas frescas a una dosis máxima de 1.000 Gy con rayos X producidos a partir de máquinas aceleradoras de electrones con una energía máxima de 7,5 MeV si el material de choque es el oro o el tántalo (US FDA, 2004). Por otro lado, esta legislación establecía una dosis mínima absorbida de 225 Gy para el tratamiento con fines cuarentenarios de *C. capitata* mediante irradiación (USDA, 2002b), pero a raíz de investigaciones recientes (Follett y Armstrong, 2004), se ha establecido una dosis genérica de 100 Gy (USDA, 2006). No obstante, se ha observado que en aplicaciones prácticas a nivel comercial, en función del tipo de fruto a tratar y de su cantidad y disposición, puede ser necesario aumentar considerablemente la dosis necesaria para conseguir un tratamiento homogéneo y eficaz (Hallman, 1999; Boylston et al., 2002). Por otro lado, también en función del tipo de fruto y tratamiento, la ionización podría afectar a la calidad del producto tratado, por lo que a igualdad de eficacia contra la plaga siempre resulta recomendable la utilización de las menores dosis posibles.

En este trabajo se han ensayado tratamientos de ionización con rayos X como sistema de control de *C. capitata* en mandarinas ‘Clemenules’, el cultivar español más exportado y de mayor importancia económica, con dos objetivos: 1) averiguar si a dosis medias podrían sustituir el tratamiento estándar de frío y 2) evaluar si a dosis bajas podrían complementar tratamientos de frío de duración reducida.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cría de *Ceratitidis capitata*

Los insectos utilizados en los ensayos provenían de una colonia de laboratorio establecida en 2001 en las instalaciones del IVIA, a la que periódicamente se añadieron con individuos salvajes obtenidos de frutos cítricos infestados de forma natural. Los adultos se criaron en cámaras en condiciones controladas de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $75 \pm 5\%$ HR e iluminación de tubos fluorescentes de 2.500 lux encendidos durante 16 h al día, siguiendo procedimientos estándar (Jacas y Viñuela, 1994).

Infestación de los frutos

Mandarinas clementinas cv. ‘Clemenules’ (*Citrus reticulata* Blanco), cosechadas en campos de la zona de Valencia con un índice de madurez comercial se seleccionaron y se distribuyeron al azar. Posteriormente, se trataron con un baño fungicida (2.500 ppm imazalil + 800 ppm guazatina) y, una vez secas, se enceraron en la línea de confección de la planta piloto del IVIA con una cera comercial del 10% de sólidos totales formulada con polietileno, goma laca y un 0,5% de tiabendazol. Las mandarinas se infestaron artificialmente con larvas de tercer estadio de desarrollo de *C. capitata* según la metodología explicada en Alonso et al. (2005). Se ha comprobado que las larvas de tercer estadio son más resistentes que los huevos o las larvas de primero o segundo estadios a distintos tratamientos de cuarentena, incluida la irradiación (Balock et al., 1963; Alonso et al., 2002b). Se colocaron 10 larvas en un agujero de 10 mm de diámetro y 20 mm de profundidad practicado con un sacabocados en la zona ecuatorial de cada fruto y tapado posteriormente con la propia corteza extraída y sellada con parafina caliente. La fruta infestada se distribuyó en lotes de 100 frutos que se colocaron en cajas de cartón comerciales de 40x29x27 cm.

Tratamientos de ionización alternativos al frío

Se aplicaron los siguientes tratamientos a las cajas con fruta infestada: 1) control: las mandarinas se mantuvieron a 25°C y 80% HR hasta la emergencia de adultos; 2) tratamiento de frío estándar: los frutos se expusieron a $1,5^\circ\text{C}$ durante 14 días; 3) ionización con rayos X a 200 Gy; y 4) ionización con rayos X a 400 Gy. Estas dosis, mayores que la dosis genérica

establecida para el control de *C. capitata* (100 Gy), se seleccionaron para simular una posible aplicación comercial. La aplicación de rayos X se realizó en la planta de irradiación de la empresa Beta Gamma Service (BGM, Bruchsal, Alemania) con una energía en el acelerador de electrones de 0,8 MeV y una velocidad de la cinta transportadora de 5 m/min. Para cada dosis teórica de radiación, las dosis reales aplicadas se establecieron colocando dosímetros radiométricos (Gafchromic[®] HD-810, International Specialty Products, Wayne, NJ, EE UU) a tres alturas distintas en el interior de las cajas. Las lecturas se realizaron con un espectrofotómetro a 560 nm, resultando valores medios de 195 y 395 Gy para cada una de las dos dosis aplicadas.

Tratamientos de ionización complementarios al frío

Las cajas con fruta infestada se sometieron a los tratamientos de ionización con rayos X siguiendo la misma metodología explicada en el apartado anterior. En este caso, y como complemento al frío, se seleccionaron dosis alrededor de la dosis genérica de 100 Gy. Las dosis medias reales aplicadas fueron de 0 (control), 30, 54 y 164 Gy. Los frutos control no se irradiaron y se mantuvieron a temperatura ambiental hasta la aplicación de los tratamientos de frío. La fruta irradiada a las distintas dosis se dividió en lotes y se sometió a tratamientos de frío (1°C) de 0 (control), 2, 4, 6, 8 y 12 días de duración.

Determinación de la supervivencia de *Ceratitis capitata*

Una vez completado cada uno de los tratamientos descritos, 10 frutos por tratamiento se colocaron de forma individual en vasos de plástico de 1 L de capacidad tapados con gasa y se almacenaron a 25°C y 80% HR. Transcurridos unos 20-25 días en estas condiciones, tiempo que asegura una emergencia total de adultos en los frutos control, se contabilizaron en cada vaso el número de pupas y adultos de *C. capitata* presentes. Los porcentajes de supervivencia de pupas y adultos se refirieron en ambos casos al número inicial de larvas de tercer estadio infestadas (10 por fruto). Cada fruto se consideró como una repetición.

Análisis estadístico

En cada uno de los ensayos, la supervivencia de *C. capitata* se comparó mediante análisis de la varianza (ANOVA) de uno o dos factores aplicados al arcoseno de la raíz cuadrada del porcentaje de pupas o adultos supervivientes. Cuando aparecieron diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$), las medias se separaron mediante el test de Duncan con un nivel de confianza del 95%. Los análisis se realizaron con el paquete informático Statgraphics Plus 4.1 (Manugistics Inc., Rockville, MD, EE UU).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el ensayo de tratamientos alternativos, tanto la ionización con rayos X como la exposición al frío se mostraron altamente eficaces en el control de la mosca mediterránea en mandarinas ‘Clemenules’. Los resultados del ANOVA indicaron la existencia de diferencias significativas entre tratamientos tanto en lo referente a la pupación de las larvas como a la emergencia de adultos ($F = 1006,5$; $gl = 3$; 697 ; $p < 0,0001$ y $F = 2607,59$; $gl = 3$; 697 ; $p < 0,0001$, respectivamente). Mientras que el porcentaje de larvas de *C. capitata* que no llegaron a pupar fue de 14, 67, 97 y 100% en frutos sometidos a 0 (control), 195, 395 Gy y frío, respectivamente, el porcentaje de larvas que no llegaron a adultos fue del 16% en el control y del 100% en el resto de tratamientos (Tabla 1). Por tanto, aunque la pupación fue significativamente mayor en las mandarinas tratadas con rayos X a 195 Gy, esto no influyó en la mortalidad final del insecto y ninguna de las larvas tratadas con rayos X alcanzó el estado adulto. Resultados similares fueron obtenidos en cítricos tratados con otras tecnologías de

radiación ionizante como los rayos γ (Fésüs et al., 1981; Burditt, 1994) o los electrones acelerados (Alonso et al., 2002b). Este resultado demuestra que la ionización con rayos X a las dosis empleadas es igual de eficaz que el tratamiento cuarentenario estándar de exposición al frío, por lo que podría utilizarse como tratamiento sustitutivo.

En el ensayo de tratamientos de ionización complementarios al frío, en el ANOVA bifactorial de la pupación de *C. capitata* en mandarinas 'Clemenules' se obtuvo una interacción significativa entre los factores dosis de rayos X y tiempo de exposición a 1°C ($F = 2,0$; $gl = 18$; 273 ; $p = 0,0102$). Aunque el porcentaje de larvas de tercer estadio que pasaron a pupas disminuyó al aumentar tanto la dosis de irradiación ($F = 44,95$; $gl = 3$; 273 ; $p < 0,0001$) como la duración del frío ($F = 52,87$; $gl = 6$; 273 ; $p < 0,0001$), una inhibición total de la pupación sólo se consiguió con las condiciones más severas de ionización a 164 Gy y 12 días de frío (Fig. 1). Por el contrario, la emergencia de adultos se inhibió completamente con la combinación de la dosis de rayos X más baja (30 Gy) y la menor exposición al frío (2 días) (Fig. 2). En este caso, el porcentaje de adultos emergidos también disminuyó significativamente al aumentar tanto la dosis de rayos X ($F = 236,17$; $gl = 3$; 270 ; $p < 0,0001$) como la exposición a 1°C ($F = 16,87$; $gl = 6$; 270 ; $p < 0,0001$) y la interacción entre estos dos factores también fue significativa ($F = 15,74$; $gl = 18$; 270 ; $p < 0,0001$). Según estos resultados, la integración de tratamientos de ionización con rayos X a dosis muy bajas con tratamientos de frío muy cortos resulta también una alternativa viable para el tratamiento cuarentenario contra la mosca mediterránea y podrían ser de aplicación en los cultivares de mandarina más sensibles tanto a la irradiación como a los daños por frío.

Antes de su recomendación como tratamientos de cuarentena comercial, es preciso contrastar estos resultados de laboratorio en ensayos a gran escala y evaluar el efecto de la ionización y de los tratamientos combinados en la calidad del fruto. En general, los frutos cítricos son considerados poco tolerantes a las radiaciones ionizantes (Hallman, 1999) y dosis excesivas pueden provocar fitotoxicidades en la piel (Maxie et al., 1969; Mahrouz et al., 2004) y afectar negativamente la calidad de fruto. El efecto, no obstante, depende de la especie y el cultivar (Miller et al., 2000), por lo que sería importante evaluarlo específicamente para nuestros principales cultivares.

CONCLUSIONES

La ionización con rayos X resulta altamente eficaz contra *C. capitata* en mandarinas. Se trata de una tecnología no contaminante que, en función de las características del cultivar a tratar y del mercado de destino, ofrece distintas variantes tecnológicas de aplicación (tratamientos sustitutivos o complementarios) que podrían suponer una mejora sustancial de los protocolos de tratamiento cuarentenario para los cítricos españoles de exportación.

AGRADECIMENTOS

Los autores agradecen a Alfonso Kurtz su asistencia técnica. Este trabajo fue financiado en parte por el MEC y fondos FEDER de la UE (Proyectos INIA RTA03-103-C6-1 y AGL2004-05271/AGR). La autora Alicia Marcilla disfruta de una beca predoctoral concedida por el INIA.

BIBLIOGRAFÍA

Alonso, M.; del Río, MA; Jacas, JA. 2002a. Respuesta del híbrido de mandarina 'Ellendale' infestado con *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) al tratamiento con atmósfera insecticida y calor. Boletín de Sanidad Vegetal y Plagas 28: 427-433.

- Alonso, M.; del Río, MA; Jacas, JA. 2002b. Ionización con electrones acelerados como tratamiento de cuarentena contra *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) en cítricos. Boletín de Sanidad Vegetal y Plagas 28: 419-426.
- Alonso, M.; del Río, MA; Jacas, JA. 2005. Carbon dioxide diminishes cold tolerance of third instar larvae of *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) in 'Fortune' mandarins: Implications for citrus quarantine treatments. Postharvest Biology and Technology 36: 103-111.
- Balock, JW; Burditt Jr., AK; Christenson, LD. 1963. Effects of gamma radiation on various stages of three fruit fly species. Journal of Economical Entomology 56: 42-46.
- Boylston, TD; Reitmeier, CA; Moy, JH; Mosher, GA; Taladriz, L. 2002. Sensory quality and nutrient composition of three Hawaiian fruits treated by X-irradiation. Journal of Food Quality 25: 419-433.
- Burditt, AK. 1994. Irradiation. p. 101-117. In: Sharp, JL. and GJ. Hallman (eds.). Quarantine treatments for pests of fruit plants. Westview Press, Boulder, CO, USA.
- EPPO/OEPP [European Plant Protection Organization]. 2004. Data sheets on quarantine pests. *Ceratitis capitata*.
http://www.eppo.org/QUARANTINE/insects/Ceratitis_capitata/CERTCA_ds.pdf
- ERS-USDA [Economic Research Service-United States Department of Agriculture]. 2003. Commodity Highlight. Fruit and Tree Nuts Outlook/FTS 306: 16-19.
- FAO [Food and Agriculture Organization of the United Nations]. 2004. Faostat. FAO statistical databases. <http://faostat.fao.org/>
- Fésüs, I.; Kádas, L.; Kálmán, B. 1981. Protection of oranges by gamma irradiation against *Ceratitis capitata* Wied. Acta Alimentaria 10: 293-299.
- Follett, PA; Armstrong, JW. 2004. Revised irradiation doses to control Melon fly, Mediterranean fruit fly, and Oriental fruit fly (Diptera:Tephritidae) and a generic dose for Tephritid fruit flies. Journal of Economical Entomology 97: 1254-1262.
- Hallman, GJ. 1999. Ionizing radiation quarantine treatments against tephritid fruit flies Postharvest Biology and Technology 16: 93-106.
- Jacas, JA; Viñuela, E. 1994. Analysis of a laboratory method to test the side effects of pesticides on adult females of *Opius concolor*, a parasitoid of the olive fly *Bactrocera oleae*. Biocontrol Science and Technology 4: 147-154.
- Mahrouz, M.; Lacroix, M.; D'Aprano, G.; Oufedjikh, H.; Boubekri, C. 2004. Shelf life and quality of clementine following a combined treatment with γ -irradiation. Radiation Physics and Chemistry 71: 141-143.
- McLaughlin, WL. 1999. Gamma-ray sources vs. X-ray or electron beams for quarantine treatment. p. 78-89. In: Moy, JH. and L. Wong (eds.). Proceedings of the Workshop: The use of irradiation as quarantine treatment of food and agricultural commodities. Honolulu, HI, USA.
- Miller, WR; McDonald, RE; Chaparro, J. 2000. Tolerance of selected orange and mandarin hybrid fruit to low-dose irradiation for quarantine purposes. HortScience 35: 1288-1291.
- USDA [United States Department of Agriculture]. 2002a. Importation of Clementines from Spain: final rule. Federal Register 67: 64701-64739.
- USDA [United States Department of Agriculture]. 2002b. Irradiation phytosanitary treatment of imported fruits and vegetables: final rule. Federal Register 67: 65016-65029.
- USDA [United States Department of Agriculture]. 2006. Treatments for fruits and vegetables: final rule. Federal Register 71: 4451-4464.
- US FDA [United States Food and Drug Administration]. 2004. Irradiation in the production, processing and handling of food: final rule. Federal Register 69: 76844-76847.

White, IM; Elson-Harris, MM. 2004. Fruit flies of economic significance: their identification and bionomics. CAB International, Eastbourne, UK.

TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Supervivencia de larvas de tercer estadio de desarrollo de *Ceratitis capitata* infestadas artificialmente en mandarinas ‘Clemenules’, expuestas a distintos tratamientos cuarentenarios y almacenadas a 25°C durante 20-25 días.

Tratamiento cuarentenario	Pupación (%) ^z	Emergencia de adultos (%) ^z
Control (sin tratar)	86,1 a	84,4 a
Frío (14 días a 1,5°C)	0,0 c	0,0 b
Rayos X a 195 Gy	33,2 b	0,0 b
Rayos X a 395 Gy	3,1 c	0,0 b

^z Medias seguidas de letras distintas son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p = 0,05$) aplicado tras un ANOVA al arco seno de la raíz cuadrada del porcentaje de supervivencia. Se presentan las medias no transformadas.

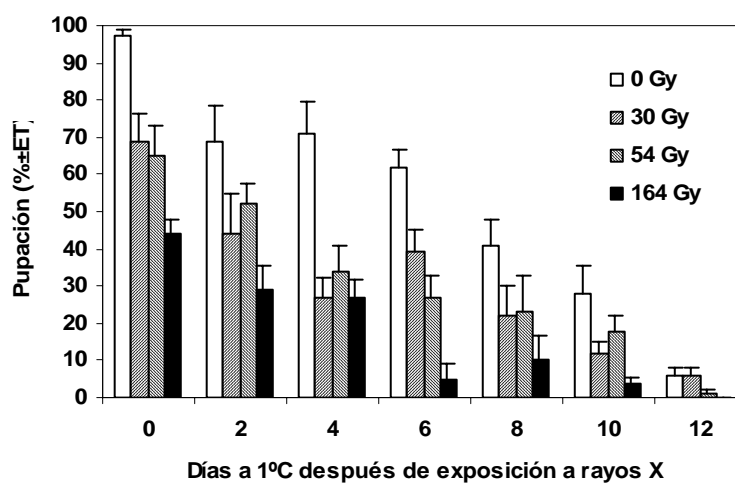


Figura 1. Pupación de larvas de tercer estadio de desarrollo de *Ceratitis capitata* infestadas artificialmente en mandarinas ‘Clemenules’, irradiadas con rayos X a distintas dosis, expuestas a 1°C durante distintos períodos de tiempo y almacenadas a 25°C durante 20-25 días.

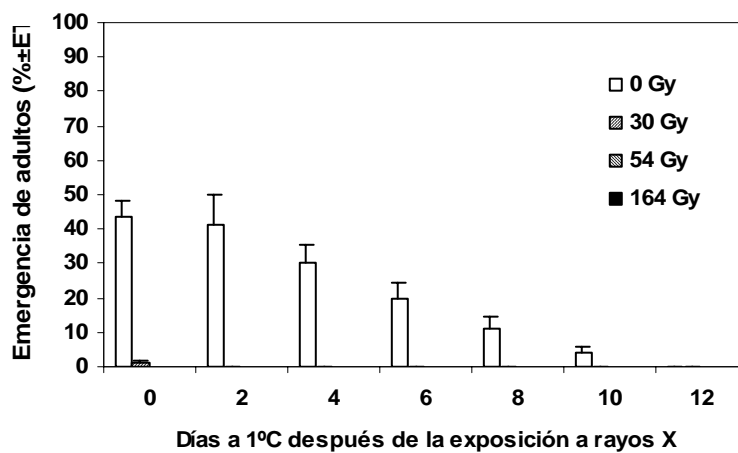


Figura 2. Emergencia de adultos a partir de larvas de tercer estadio de desarrollo de *Ceratitidis capitata* infestadas artificialmente en mandarinas ‘Clemenules’, irradiadas con rayos X a distintas dosis, expuestas a 1°C durante distintos períodos de tiempo y almacenadas a 25°C durante 20-25 días.