



## **Normas Regionales de la NAPPO sobre Medidas Fitosanitarias (NRMF)**

### **NRMF No. 30**

**Directrices para determinar y designar el estatus de una fruta o verdura como hospedante de moscas de la fruta (Diptera: Tephritidae)**

Secretaría de la Organización Norteamericana de Protección a las Plantas  
1431 Merivale Road, 3<sup>rd</sup> Floor, Room 309  
Ottawa, K1A 0Y9 Canadá  
20 de octubre de 2008

## Índice

	Página
Revisión.....	3
Aprobación .....	3
Implementación .....	3
Distribución.....	3
Introducción .....	4
Ámbito .....	4
Referencias .....	4
Definiciones, abreviaturas y siglas.....	6
Perfil de los Requisitos .....	6
Antecedentes.....	7
Requisitos.....	8
1. Diseño experimental.....	9
1.1 Encuestas.....	9
1.2 Moscas de la fruta .....	10
1.3 Producto .....	11
1.4 Hospedante control.....	11
1.5 Análisis de datos .....	12
2. Ensayos.....	12
2.1 Infestación natural determinada a partir de colectas del producto en campo .....	13
2.2 Ensayos en jaulas de campo y en invernadero .....	14
2.3 Ensayos en jaula de laboratorio .....	15
3. Manejo del producto para la emergencia del insecto.....	16
4. Interpretación de Resultados .....	18
5. Mantenimiento de registros .....	18
Apéndice 1: Diagrama de flujo señalando la posición relativa de la determinación del estatus de hospedante en el proceso de análisis de riesgo de plagas.....	20
Apéndice 2: Análisis estadístico opcional en la determinación del estatus de hospedante y la eficacia de las condiciones definidas que se han especificado en la designación de hospedante.....	21


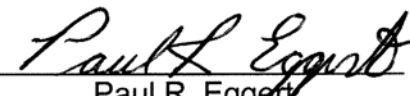
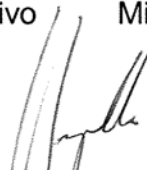
## Revisión

Las Normas Regionales de la NAPPO sobre Medidas Fitosanitarias están sujetas a revisiones y enmiendas periódicas. La fecha de la próxima revisión de esta Norma de la NAPPO es en el año 2013. De solicitarlo un país miembro de la NAPPO, se pueden llevar a cabo revisiones de cualquier Norma de la NAPPO en cualquier momento.

## Aprobación

La presente Norma fue aprobada por el Comité Ejecutivo (CE) de la Organización Norteamericana de Protección a las Plantas (NAPPO) el 20 de octubre de 2008 y entrará en vigor a partir de esta fecha.

Aprobada por:

 _____ Greg Stubbings Miembro del Comité Ejecutivo Canadá	 _____ Paul R. Egger Miembro del Comité Ejecutivo Estados Unidos
 _____ Javier Trujillo Arriaga Miembro del Comité Ejecutivo México	

## Implementación

Para conocer la fecha de implementación en cada país de la NAPPO, consulte los Planes de implementación adjuntos.

## Registro de enmiendas

Las enmiendas a esta norma serán fechadas y archivadas en la Secretaría de la NAPPO.

## Distribución

La Secretaría de la NAPPO distribuye esta norma al Grupo Consultivo de la Industria y los Miembros Asociados, la Secretaría de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF) y otras Organizaciones Regionales de Protección Fitosanitaria (ORPFs).

## Introducción

### Ámbito

Este documento describe los protocolos de los experimentos y los ensayos exhaustivos para determinar el estatus de hospedante de una fruta o verdura para una especie particular de mosca de la fruta (Diptera: Tephritidae) y designa categorías para el estatus del hospedante.

### Referencias

Abbott, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18: 265-267.

Aluja, M., Díaz-Fleisher, F., and J. Arredondo. 2004. Non-host status of *Persea americana* 'Hass' to *Anastrepha ludens*, *Anastrepha obliqua*, *Anastrepha serpentina*, and *Anastrepha striata* (Diptera: Tephritidae) in Mexico. J. Econ. Entomol. 97: 293-309.

Aluja, M., and R. L. Mangan. En prensa 2007. Fruit fly (Diptera: Tephritidae) host status determination: critical conceptual and methodological considerations. Ann. Rev. Entomol. 53.

Análisis de riesgo de plagas para plagas cuarentenarias, incluido el análisis de riesgos ambientales y organismos vivos modificados 2004. NIMF n.º 11. FAO, Roma.

Asia and Pacific Plant Protection Commission (APPPC). 2005. Guidelines for the confirmation of non-host status of fruit and vegetables to tephritid fruit flies. FAO RSPM 4. 18 pp. [www.fao.org/docrep/008/ae942e/ae942e04.htm](http://www.fao.org/docrep/008/ae942e/ae942e04.htm)

Couey, J. M., and V. Chew. 1986. Confidence limits and sample size in quarantine research. J. Econ. Entomol. 79: 887-890.

Cowley, J. M., R. T. Baker, and D. S. Harte. 1992. Definition and determination of host status for multivoltine fruit fly (Diptera: Tephritidae) species. J. Econ. Entomol. 85: 312-317.

*Determinación de la situación de una plaga en un área*, 1998, NIMF n.º 8. FAO, Roma.

Enkerlin W., J. Reyes F., A. Bernabe A., J. L. Sánchez P., J. Toledo A. y M. Aluja S. 1993. El Aguacate "Hass" como hospedante de tres especies de *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae), en condiciones forzadas y naturales. Agrociencia serie Protección Vegetal Vol. 4, Num. 3. ISSN 0188-3046.

*Establecimiento de áreas libres de plagas para moscas de la fruta (Tephritidae)*. 2006. NIMF n.º 26. FAO, Roma.

Follett, P. A. and M. K. Hennessey. 2007. Confidence limits and sample size for determining nonhost status of fruits and vegetables to tephritid (Diptera: Tephritidae) fruit flies as a quarantine measure. *J. Econ. Entomol.* 100: 251-257.

Follett, P.A. and G.T. McQuate. 2001. Accelerated development of quarantine treatments for insects on poor hosts. *J. Econ. Entomol.* 94: 1005-1011.

*Glosario de biotecnología para la agricultura y la alimentación*, 2004. Estudio n.º 9, FAO, Investigación y Tecnología, FAO, Roma. [http://www.fao.org/biotech/index\\_glossary.asp](http://www.fao.org/biotech/index_glossary.asp)

*Glosario de términos fitosanitarios*, 2007, NIMF n.º 5, FAO, Roma.

IAEA. 2003. Organismo Internacional de Energía Atómica. Guía para el trapeo en programas de control de la mosca de la fruta en áreas amplias. 47 p. <http://www-naweb.iaea.org/nafa/ipc/public/trapping-web-sp.pdf>

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: 285-287.

Mangan R.L., Frampton E.R., Thomas D.B., and D. S. Moreno. 1997. Application of the maximum pest limit concept to quarantine security standards for the Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae). *J. Econ. Entomol.* 90: 1433-1440.

NASS. 1991. Standard 155.02.01.08. Specification for determination of fruit fly host status as a treatment. New Zealand National Agriculture Security Service. Ministry of Agriculture and Fisheries, Wellington, New Zealand.

Painter, R. H. 1951. *Insect Resistance in Crop Plants*. Univ. Press Kansas, Lawrence. 1968 reprinting. 520 pp.

Notificación de plagas. 2002. NIMF n.º 17. FAO, Roma.

Robertson, J. L., H.K. Priesler, S.S. Ng, N.A. Hickle, and W.D. Gelernter. 1995. Natural variation: a complicating factor in bioassays with chemical and microbial pesticides. *J. Econ. Entomol.* 88: 1-10.

Santiago G., W. Enkerlin, J Reyes F., y V. Ortiz G. 1993. Ausencia de infestación natural de moscas de la fruta (Diptera:Tephritidae) en aguacate "Hass" en Michoacán, México. *Agrociencia serie Protección Vegetal* Vol. 4 Num 3. ISSN 0188-3046.

Torre-Bueno, J. R. de la. 1978. *A Glossary of Entomology*. New York Entomological Society. 336 pp.

Willard, H. F., A. C. Mason and D. T. Fullaway. 1929. Susceptibility of avocados of the Guatemala race to attack by the Mediterranean fruit fly in Hawaii. *The Hawaiian Forester and Agriculturist* 26: 170-176.

## Definiciones, abreviaturas y siglas

análisis de riesgo de plaga (PRA)	Proceso de evaluación de las evidencias biológicas u otras evidencias científicas y económicas para determinar si un organismo es una plaga, si debería ser reglamentado, y la intensidad de cualesquiera medidas fitosanitarias que hayan de adoptarse contra él (FAO)
factor de resistencia	Cualquier condición en las plantas que las protege de infestación causada por insectos, incluyendo las estructuras, sustancias químicas en la planta o condiciones fisiológicas (Torre-Bueno 1978)
hospedante condicional	Fruta o verdura que es hospedante o no hospedante bajo condiciones permisivas o restrictivas definidas, respectivamente (por ejemplo, estado de madurez, otras condiciones fisiológicas o condiciones físicas) (NAPPO)
hospedante natural	Infestación de una fruta o verdura por una plaga de plantas en la naturaleza (por ejemplo, plantas naturales, cultivadas y/o no manejadas) y la población de la plaga de la planta se mantiene en la fruta o verdura.(NAPPO)
no hospedante natural	No hay una infestación de la fruta o verdura por una plaga de plantas en la naturaleza (por ejemplo, plantas naturales, cultivadas y/o no manejadas) y la población de la plaga de la planta no se mantiene en la fruta o verdura (NAPPO)
no preferencia	Caracteres de la planta y respuestas de insectos que se apartan del uso de una planta o variedad particular para oviposición, alimento o refugio o una combinación de éstos (Painter 1951)
Organización Nacional de Protección Fitosanitaria (ONPF)	Servicio oficial establecido por un gobierno para desempeñar las funciones especificadas por la CIPF (FAO)
registro de una plaga	Documento que proporciona información concerniente a la presencia o ausencia de una plaga específica en una ubicación y tiempo dados, dentro de un área (generalmente un país), bajo las circunstancias descritas (FAO)

## Perfil de los requisitos

Esta norma describe los requisitos para determinar el estatus de una fruta o verdura como hospedante de una especie particular de mosca de la fruta (Diptera: Tephritidae) y designa categorías para el estatus del hospedante.

Los requisitos incluyen:

- la selección de moscas de la fruta, frutas o verduras y controles para los ensayos,
- la definición de los parámetros del ensayo, fruta o verdura y moscas de la fruta para determinar el estatus del hospedante y especificar la(s) condición(es) definida(s) de la fruta o verdura que ha de evaluarse como factor(es) de resistencia,
- mantenimiento de la fruta o verdura para criar moscas de la fruta después de la exposición,
- estado biológico del insecto (larvas, pupas o adultos) que se utilizará como la base para determinar el estatus del hospedante,
- evaluación de los resultados del experimento,
- interpretación de los resultados.

Las designaciones del estatus del hospedante esbozadas en estas directrices incluyen:

- Hospedante natural – Infestación de una fruta o verdura por una plaga de plantas en la naturaleza (por ejemplo, plantas naturales, cultivadas y/o no manejadas) y la población de la plaga de la planta se mantiene en la fruta o verdura. No se requieren ensayos adicionales para confirmar el estatus del hospedante.
- No hospedante natural – No hay infestación de la fruta o verdura por una plaga de plantas en la naturaleza (por ejemplo, plantas naturales, cultivadas y/o no manejadas) y la población de la plaga de la planta no se mantiene en la fruta o verdura.
- Hospedante condicional – Fruta o verdura que es hospedante o no hospedante bajo condiciones permisivas o restrictivas definidas, respectivamente (por ejemplo, estado de madurez, otras condiciones fisiológicas o condiciones físicas).

## Antecedentes

Las moscas de la fruta (Diptera: Tephritidae) son una de las plagas cuarentenarias predominantes que dan lugar a la aplicación de medidas fitosanitarias para que los productos hospedantes se movilicen en el comercio. El estatus de hospedante de un producto para una especie particular de moscas de la fruta es un elemento importante del Análisis de Riesgo de Plagas (*Análisis de riesgo de plagas para plagas cuarentenarias, incluido el análisis de riesgos ambientales y organismos vivos modificados. NIMF n.º 11*) para evaluar la probabilidad de introducción y dispersión de la plaga y para determinar las opciones apropiadas de manejo del riesgo (Apéndice 1). La ONPF del país exportador necesita documentar la distribución de la mosca de la fruta y el estatus del hospedante de la fruta o vegetal (*Notificación de plagas. NIMF n.º 17*).

El Análisis de Riesgo de Plagas está respaldado por los registros de la plaga y los de su interceptación, la literatura científica y otra evidencia pertinente. Los registros y la literatura recientes acerca del estatus del hospedante pueden ser muy completos, exactos y presentar evidencia clara de tal manera que no se requiere realizar ensayos de determinación de estatus del hospedante. Sin embargo, la confiabilidad de los registros históricos y la literatura son frecuentemente cuestionados (*Determinación de la situación de una plaga en un área, NIMF n.º 8*) debido a que:

- las especies de moscas de la fruta pueden haberse identificado incorrectamente y los especímenes muestra no están disponibles para su verificación,

- los registros de las recolecciones pueden estar incompletos, incorrectos o de valor dudoso,
- los detalles de la fruta o verdura pueden no estar disponibles, por ejemplo, variedad y etapa de madurez, la fruta o verdura puede haber sido recolectada del suelo o del árbol, condición física al momento de la recolecta, estatus del huerto y las condiciones climáticas prevalecientes.

Se han documentado los protocolos y ensayos exhaustivos para determinar el estatus de hospedante de moscas de la fruta (Aluja *et al.* 2003, Aluja *et al.* 2004, Enkerlin *et al.* 1993; Willard *et al.* 1929, APPPC 2005; Cowley *et al.* 1992; NASS 1991). Sin embargo, la falta de uniformidad en la terminología y metodologías han contribuido a la variación en la interpretación del riesgo de moscas de la fruta y en la aplicación de medidas fitosanitarias (Folleteo y Hennessey 2007, Aluja y Mangan 2008). La armonización de la terminología y los protocolos para determinar el estatus de hospedante de moscas de la fruta promoverá constancia entre los países miembros de la NAPPO y comunidades científicas de apoyo. Cuando la evidencia clara del estatus de hospedante no esté disponible, entonces podrán detallarse en un acuerdo bilateral los ensayos para determinar el estatus de hospedante, los diseños detallados del experimento y el nivel aceptable de eficacia y confianza estadística necesarios para los ensayos.

Si una fruta o verdura es no hospedante natural, la ONPF del país importador puede permitir su importación. Si la fruta o verdura es un hospedante natural, los estudios adicionales pueden apoyar la designación de hospedante condicional. El estatus de hospedante condicional puede permitir las mitigaciones designadas para minimizar las condiciones conducentes a la infestación.

## Requisitos

El objetivo de realizar los ensayos es demostrar el estatus de hospedante de una fruta o verdura específica con base en datos válidos estadísticamente. Entre los ensayos se pueden incluir, los de laboratorio, jaulas de campo, invernadero (invernadero con malla) y componentes de infestación natural de campo. Los ensayos de campo y laboratorio deberían ser representativos de la variabilidad de la fruta o verdura y las poblaciones de moscas de la fruta para toda el área de cultivo, cosecha y período de exportación, así como para el área. Los experimentos deberían replicarse, analizarse estadísticamente y notificarse los niveles de confianza con base en el tamaño de la muestra, de tal manera que los datos se puedan verificar y replicar.

Los siguientes puntos son importantes al planificar los ensayos para la determinación del estatus de hospedantes:

- identificar la fruta o vegetal (por ejemplo, especie, incluidas todas las variedades, así como las partes de plantas). La fruta o verdura que se utilizará en los ensayos debería ser la misma que la que se propone para la exportación,
- especificar la(s) condición(es) definida(s) de la fruta o verdura que se evaluará como el factor(es) de resistencia,
- recolectar y revisar la información, literatura y los registros relativos al estatus de hospedante de la fruta o verdura y especie de mosca de la fruta,



- identificar la especie de mosca de la fruta de interés,
- describir el origen y estado de cría de la colonia de mosca de la fruta que se utilizará en los ensayos,
- describir el hospedante conocido que se utilizará como control en los ensayos,
- realizar ensayos separados para cada especie de mosca de la fruta para la cual se requiere determinación del estatus de hospedante,
- realizar ensayos separados para cada variedad de fruta o verdura, si las diferencias de variedades son la supuesta fuente de resistencia para la infestación de mosca de la fruta. No se requieren ensayos separados si se ha demostrado el factor de resistencia mediante experimentos a un nivel eficaz para prevenir la infestación en todas las variedades de interés.

## 1. Diseño del experimento

La finalidad de estos experimentos es determinar el estatus de hospedante de una fruta o vegetal bajo condiciones definidas que han sido especificadas.

### 1.1 Muestras

- Los protocolos de muestras deberían basarse en principios de independencia y aleatoriedad, además de ser apropiados para que se calculen las estadísticas.
- Los ensayos deberían ser apropiados para evaluar la(s) condición(es) definida(s) que ha(n) sido especificada(s) para la fruta o verdura como factor(es) de resistencia para la infestación de moscas de la fruta.
- El número de temporadas y de réplicas por temporada para dar cuenta de la variabilidad de moscas y la fruta o verdura, con el tiempo. Esto explicaría las condiciones de cosecha temprana o tardía. Para cumplir con este requisito podrían necesitarse por lo menos dos años.
- El número de réplicas por ensayo para dar cuenta de la variabilidad en moscas y fruta o verdura en toda el área de producción. Esto debería ser representativo del rango de producción actual y de las condiciones del cultivo, por ejemplo, cultivo que crece en alta o baja elevación. Se pueden hacer ajustes con base en la biología de las moscas o de las características de la fruta o verdura
- El nivel deseado de eficacia podrá ser el mismo que el límite máximo de la plaga, menos de 1 par reproductivo por embarque (Mangan *et al.* 1997). Podrá ser diferente si se aplican otras medidas fitosanitarias o si la probabilidad de establecimiento de la especie en el país importador es baja debido al clima, la disponibilidad de hospedantes u otros factores.
- El nivel deseado de confianza debería basarse en el tamaño de la muestra. Generalmente se ha utilizado un nivel de 95% para las medidas independientes (Follet y Hennessey 2007).
- El número y peso de la fruta o verdura requerido por ensayo para determinar la eficacia y el nivel de confianza.
- El número de huevecillos ovipositados, que resulten inmaduros o adultos que se requieran del control en comparación con los tratamientos para determinar el nivel de eficacia y confianza. El nivel de infestación se mide mediante la determinación de la proporción de la fruta o verdura que se infesta y el número de huevecillos, larvas o

adultos que emergen de cada fruta o verdura. Se deberían registrar las notas sobre el comportamiento de oviposición de las hembras en la fruta o vegetal para determinar si hay no preferencia.

- La fruta o verdura de control que se utilizará para los ensayos de laboratorio y jaulas de campo e invernadero.

## 1.2 Moscas de la fruta

- De ser posible, la colonia debería proceder de la misma área que la fruta o verdura.
- La colonia no debería ser mayor de tres generaciones al inicio de los ensayos, sin realmacenarse y mantenida en hospedantes naturales para asegurar un comportamiento normal de oviposición.
- Deberían mantenerse los registros acerca del origen y la cría de la colonia.
- Debería mantenerse la identificación de los especímenes muestra.
- Los períodos de preoviposición y oviposición deberían determinarse a fin de que las hembras sexualmente maduras y copuladas se expongan a la fruta o verdura, durante el nivel máximo de su potencial reproductivo.
- Debería determinarse el número óptimo de hembras necesarias para infestar a la fruta o verdura. Debería justificarse el número exacto por repetición de acuerdo a la biología de la mosca, la cantidad de fruta o verdura que se va a exponer y otras condiciones del experimento.
- Determinar la duración de la exposición de las hembras a la fruta o verdura en los ensayos. El período de exposición debería determinarse por la degradación de la calidad de la fruta o verdura durante el ensayo y el comportamiento de oviposición. El tiempo de exposición puede determinarse por observaciones de los controles. Si las hembras están ovipositando en los controles, pero no en la fruta o verdura del ensayo, está sucediendo la no preferencia o las hembras necesitan más tiempo para aceptar la fruta o verdura del ensayo. Este período de aceptación y oviposición debería determinarse mediante observación. Conforme se alargue el período de exposición, la fruta o verdura cosechada empezará a degradarse, madurarse y a cambiar fisiológicamente. Estos cambios afectan el estatus del hospedante y agrega incertidumbre a los resultados. El número de huevecillos ovipositados en la fruta o verdura puede verificarse mediante disección y conteos visuales de una muestra, después de completar el período de exposición.
- Los ensayos deberían realizarse bajo las condiciones ambientales óptimas para la actividad de las moscas de la fruta:
  - las jaulas deberían ser de un tamaño y construcción apropiados para los ensayos,
  - a los adultos se les debería proporcionar agua y alimento *ad limitum*,
  - las temperaturas mínimas y máximas, humedad relativa y el fotoperíodo deberían registrarse durante el período del ensayo. Los machos podrían mantenerse en jaulas o invernadero con las hembras, si fuera benéfico para estimular la oviposición.
- Debería registrarse el número de adultos muertos que surjan durante el ensayo, y si es un ensayo a menor escala, las moscas muertas deberían reemplazarse con adultos vivos.

Un nivel elevado de mortalidad de adultos puede ser un indicio de que han habido condiciones desfavorables (por ejemplo, temperatura excesiva) o contaminación (por ejemplo, insecticidas) de la fruta o verdura del ensayo. En tal caso, el ensayo debería repetirse. Cabe señalar si se utiliza una sola hembra en más de un ensayo.

### **1.3 Frutas o verduras**

Los ensayos deberían ser apropiados para evaluar las condiciones definidas que se han especificado de la fruta o verdura como factor(es) de resistencia para la infestación causada por moscas de la fruta.

La fruta o verdura utilizada para el ensayo del estatus de hospedante debería:

- ser de la misma variedad y que proceda del mismo lugar que la que se va a exportar, y verificarse como tal (por ejemplo, documentación fotográfica e identificación por un botánico),
- estar libre de contaminantes, plaguicidas, cera, suciedad, defectos, moscas de la fruta y otras plagas (también se aplica para los controles):
  - si la fruta o verdura del ensayo o los hospedantes utilizados como control se asperjan justo antes del ensayo o durante éste, entonces los datos de esos ensayos no deberían considerarse.
- ser de clasificación de exportación comercial de un color, tamaño y condición fisiológica definidos de los cuales se debería evaluar el factor de resistencia:
  - estado de madurez definido en forma apropiada
  - la fruta o verdura que se ha dañado artificialmente debería pincharse en forma uniforme un número determinado de veces a una profundidad determinada, según se describa en el diseño del experimento.

### **1.4 Hospedantes utilizados como control**

Los hospedantes que se utilizan como control son necesarios para todos los ensayos de laboratorio, jaula o invernadero. Debería ser una fruta o verdura que sea un hospedante conocido y que esté libre de infestación anterior. Los hospedantes utilizados como control pueden exponerse a las hembras en una sola capa en situación de preferencia o no preferencia en los ensayos de laboratorio, jaula de campo o invernadero. En las encuestas de infestación natural, los hospedantes utilizados como control podrán colocarse en el campo al lado de la fruta o verdura de los ensayos a una tasa apropiada para determinar el período y la tasa natural de oviposición. Las moscas de la fruta que se utilizan en un control y repetición del experimento deberían provenir todas del mismo grupo, colonia o población y tener todas la edad y condición apropiadas para fomentar la oviposición.

Los controles se usan para:

- verificar que las hembras están sexualmente maduras, copuladas y que exhiben comportamiento normal de oviposición,
- indicar el nivel alto de infestación que podría ocurrir en un hospedante,
- indicar el período de tiempo normal para que llegue a adulto,

- confirmar que las condiciones ambientales fueron apropiadas para la infestación y cría,
- en el caso de muestras de infestación natural, confirmar que las hembras silvestres estuvieron ovipositando en el área en donde crece la fruta o verdura durante el período del ensayo,
- en el caso de moscas monófagas, los controles deberían ser hospedantes conocidos y los ensayos de estatus de hospedante deberían realizarse durante el estado de madurez adecuado.

## 1.5 Análisis de datos

- Calcular los niveles de infestación, la eficacia de factor(es) de resistencia y los niveles de confianza que apoyarán la determinación y designación del estatus de hospedante,
- el número de moscas de la fruta (huevecillos, larvas o adultos) expuestas a la fruta o verdura o la cantidad de fruta o verdura expuesta a las moscas de la fruta, según el tipo de ensayo, determinarán el tamaño de la muestra que se utilice para establecer los niveles de eficacia y confianza. En ensayos de laboratorio y de jaulas de campo para el estatus de hospedante, las hembras sexualmente maduras y copuladas por lo general se exponen a la fruta o verdura hospedante. Pueden determinarse el número de hembras y de huevecillos que depositan en la fruta o verdura. Para determinar la tasa natural de infestación, se recolecta la fruta o verdura en el campo y se disecciona para contar el número de huevecillos y larvas o se conserva para esperar la emergencia de la mosca de la fruta adulta. Se desconoce el número de moscas de la fruta adultas que están presentes en el huerto y el número de fruta o verdura que la mosca de la fruta hembra visita durante un período definido o estado fenológico del fruto. Por lo tanto, el número de frutas o verduras muestreadas se utiliza para determinar el nivel de confianza (Follet y Hennessey 2007),
- la eficacia del factor de resistencia de la fruta o verdura y su nivel de confianza deberían calcularse a partir del nivel de infestación, que es el número de larvas de tercer estadio, pupas y adultos fértiles que se desarrollan en relación con el control (Apéndice 2),
- las correcciones para el control de mortalidad de los tratamientos deberían calcularse conforme a Abbott (1925).

## 2. Ensayos

Se describen los ensayos de infestación natural, jaula de campo, invernadero y jaula de laboratorio para determinar el estatus de hospedante. Los ensayos podrán realizarse en secuencia; sin embargo, podría ser más práctico realizarlos en forma simultánea mientras la fruta o verdura se encuentre disponible. Los ensayos deberían ser apropiados para evaluar la(s) condición(es) definida(s) que se ha(n) especificado para la fruta o verdura como factor(es) de resistencia para infestaciones de moscas de la fruta.

## 2.1 Infestación natural determinada a partir de fruta o verdura recolectada en campo

El estatus del hospedante puede determinarse y designarse basándose en la confirmación de la infestación natural durante el período de cosecha para exportación sin la necesidad de realizar ensayos adicionales (Santiago *et al.* 1993). Este ensayo es obligatorio independientemente de los datos del ensayo de jaula de campo, invernadero o jaula de laboratorio. Sin embargo, si se confirma el estatus de hospedante natural por medio de los ensayos de infestación natural, podrán omitirse los ensayos de jaula de campo, invernadero y jaula de laboratorio.

Los ensayos de infestación natural deberían incluir entre otras cosas lo siguiente:

- vigilancia en las áreas de producción de la fruta o verdura para verificar la presencia de la especie objetivo de mosca de la fruta en el área durante el ensayo y los períodos de cosecha para exportación. La densidad de trampas y el nivel mínimo aceptable de actividad de los adultos en los huertos o en los campos de ensayo podrá ser específico para cada especie y debería delimitarse en un plan de trabajo bilateral (IAEA 2003; *Establecimiento de áreas libres de plagas para moscas de la fruta (Tephritidae)*). NIMF n.º 26),
- los datos de varias temporadas de cosecha podrán ser necesarios para dar cuenta de la variabilidad en las poblaciones de moscas de la fruta y la calidad en la producción (Robertson *et al.* 1995),
- las muestras de infestación natural deberían ser representativas del rango de las áreas de producción, condiciones ambientales, los estados de madurez y niveles de daño natural. Los datos de las muestras de infestación natural deberían analizarse individualmente para determinar la importancia de las variables del experimento. Las muestras naturales pueden incluir, entre otras:
  - frutas o verduras para exportación de las empacadoras inmediatamente después de la cosecha,
  - frutas o verduras cosechadas directamente de los huertos por recolectores comerciales,
  - frutas o verduras que ha pasado por un proceso de exportación (por ejemplo, selección, lavado, enfriado),
  - frutas o verduras de desecho de las empacadoras, dañadas o demasiado maduras del campo,
  - frutas o verduras con condición(es) definida(s) que se ha(n) especificado para ser evaluada(s) como factor(es) de resistencia para infestaciones de moscas de la fruta.
- un hospedante conocido de la especie de mosca de la fruta debería exponerse en el área de cosecha para confirmar la presencia de moscas de la fruta y de la oviposición durante el ensayo y períodos de cosecha para exportación. Los hospedantes utilizados como control pueden recolectarse de plantas que estén presentes de manera natural en la misma área durante el período de ensayo,
- debería mantenerse un registro del procesamiento de las muestras y otras condiciones de éstas, así como los hospedantes utilizados como control.

Entre las ventajas de los ensayos de infestación natural se incluyen:

- proporcionan la evaluación más precisa del estatus de hospedante entre todos los ensayos,
- da cuenta del alto nivel de variabilidad en la fruta o vegetal, el comportamiento de las moscas y los períodos de actividad,
- no interfiere con la preferencia y no preferencia del hospedante.

Entre las desventajas de los ensayos de infestación natural se incluyen:

- no se conoce o controla completamente la variabilidad en las moscas,
- no se conoce o controla completamente la variabilidad en la fruta o verdura,
- los datos pueden ser insuficientes si el nivel de confianza de la encuesta es bajo.

## **2.2 Ensayos en jaulas de campo y en invernadero**

Los ensayos en jaulas de campo y en invernadero deberían realizarse cuando los datos de los ensayos de infestación natural no establecen el estatus de hospedante de la fruta o verdura. Los datos de los ensayos de jaulas de campo y de invernadero realizados bajo condiciones definidas podrán utilizarse para apoyar los resultados obtenidos de las infestaciones naturales y de los ensayos en jaulas de laboratorio.

Las jaulas de campo pueden ser jaulas de malla que encierren a toda una planta o partes de ella incluyendo la fruta o verdura y sobre la cual se liberan las moscas. De manera alternativa, las plantas también podrán exponerse en invernaderos en los que se liberan las moscas. La fruta o verdura puede crecer ya sea en el invernadero o se trae en macetas para los ensayos. Los resultados de los ensayos se interpretan de la misma forma que los ensayos en jaula de laboratorio.

Los ensayos en jaulas de campo y en invernadero deberían incluir, entre otras cosas, lo siguiente:

- monitoreo de temperaturas mínimas y máximas, humedad relativa y otras condiciones ambientales pertinentes en forma diaria durante todo el ensayo,
- debería proporcionarse alimento y agua a las hembras en cada jaula,
- debería tomarse en cuenta el tamaño de la jaula o invernadero para asegurar el confinamiento de los adultos, permitir un buen flujo del aire y la presión de oviposición designada,
- la jaula debería evitar la entrada de hormigas y otros depredadores. Los depredadores deberían retirarse de las jaulas antes de iniciar el ensayo.
- debería llevarse un control repetido utilizando un hospedante conocido en forma simultánea al ensayo de la fruta o verdura. Los hospedantes utilizados como control deberían exponerse a la misma presión de oviposición que en el ensayo,
- los hospedantes conocidos que han utilizado como control no tienen que permanecer adheridos a las plantas,
- la fruta o verdura debería tener la(s) condición(es) definida(s) que se ha(n) especificado que va a evaluarse como factor(es) de resistencia para infestaciones de moscas de la fruta,

- la fruta o verdura permanece adherida a las plantas y podrá exponerse a las moscas de la fruta confinando la fruta o verdura a las jaulas en el campo o utilizando plantas en macetas en invernadero. Las bolsas de malla podrán utilizarse como jaulas en el campo,
- las plantas deberían crecer en condiciones que excluyan el uso de químicos que puedan ser nocivos para las moscas de la fruta,
- una réplica podrá estar compuesta de varias jaulas de preferencia colocadas en una sola planta pero de no ser posible, en plantas adyacentes. Si la réplica está dividida en varias jaulas, el número de hembras por jaula debería distribuirse de manera uniforme entre las jaulas para mantener la presión de oviposición asignada. La mortalidad de las moscas debería monitorearse y podrá ser necesario reemplazar las moscas muertas por vivas para asegurar una presión de infestación adecuada,
- para ensayos en invernadero, la fruta o verdura debería crecer en condiciones comerciales o en contenedores de un tamaño que permita el desarrollo normal de la planta y de la fruta o verdura,
- después del período asignado de oviposición, la fruta o verdura debería retirarse de la planta, y debería pesarse y registrarse el número de cada réplica. También debería registrarse el número de moscas muertas, moscas que han escapado y depredadores por jaula.

Entre las ventajas de los ensayos con jaulas de campo se incluyen:

- el nivel de oviposición es alto,
- la fruta o verdura no se degrada debido a que permanece adherida a la planta durante el ensayo,
- las condiciones ambientales se asemejan más a la naturaleza que los ensayos en jaula de laboratorio.

Entre las desventajas de los ensayos con jaulas de campo se incluyen:

- el comportamiento de la hembra en cuanto a la preferencia de hospedante es más limitado que en el ensayo de infestación natural.

### **2.3 Ensayos en jaula de laboratorio**

Los ensayos en jaulas de laboratorio deberían efectuarse cuando los datos de infestaciones naturales y de infestaciones en jaulas de campo no establecen que la fruta o verdura es un hospedante natural. Los datos de ensayos en jaulas de laboratorio llevados a cabo en condiciones definidas podrán utilizarse para apoyar los resultados que se obtuvieron de infestaciones naturales, jaulas de campo e invernadero. La(s) condición(es) definida(s) de la fruta o verdura se especificará(n) en el caso de evaluaciones de hospedantes condicionales.

Los ensayos en jaulas de campo deberían incluir, entre otras cosas, lo siguiente:

- la fruta o verdura debería exponerse lo antes posible después de la cosecha para evitar cambios (por ejemplo, madurez) que puedan alterar el estatus del hospedante,
- la fruta o verdura debería tener la(s) condición(es) definida(s) que se ha(n) especificado para evaluarse como factor(es) de resistencia para la infestación de moscas de la fruta, incluyendo, entre otras cosas:

- el daño artificial,
- los días posterior a la cosecha,
- el estado de madurez, tamaño, color, calificación,
- otras condiciones fisiológicas importantes (por ejemplo, acidez, presión de turgencia),
- otras condiciones físicas.
- hembras sexualmente maduras y copuladas para oviposición,
- instalaciones con control ambiental para los ensayos y para la retención de la fruta o verdura,
- jaulas para retener las moscas de la fruta y la fruta o verdura durante los ensayos,
- alimento y agua para mantener a las moscas de la fruta durante los ensayos.

Entre las ventajas de los ensayos en laboratorio se incluyen:

- las condiciones están altamente controladas,
- la supervivencia de las moscas es alta,
- el nivel de oviposición es alto.

Entre las desventajas de los ensayos en laboratorio se incluyen:

- limita el comportamiento de la mosca en cuanto a la preferencia de hospedante más que el ensayo de infestación natural, jaula de campo e invernadero,
- la fruta o verdura se degrada rápidamente.

### **3. Manipulación de la fruta o verdura para la emergencia del insecto**

Las frutas o verduras que se ha recolectado para los ensayos de infestaciones naturales, jaulas de campo, invernadero y laboratorio así como la fruta o verdura utilizada como control, deben conservarse hasta que las larvas de las moscas de la fruta hayan emergido. Las condiciones para conservar a la fruta o verdura deberían maximizar la supervivencia de las moscas de la fruta y especificarse en el diseño del experimento.

Los criterios para conservar a la fruta o verdura que deberían considerarse incluyen, entre otras cosas:

- la temperatura,
- la humedad relativa,
- el fotoperíodo,
- la condición del sustrato para pupar,
  - libre de plaguicidas,
  - estéril,
  - sustrato bien drenado para prevenir mortalidad de larvas y adultos por exceso de humedad,
  - sin valor nutritivo,
- acceso restringido a insectos que puedan interferir con cualquiera de los estados de desarrollo de las moscas de la fruta tales como hormigas, cucarachas y *Drosophila* spp
- facilitar el registro preciso del número de larvas, pupas y adultos que emerjan de cada pieza de fruta o verdura para cada réplica,
- número apropiado de piezas de fruta o verdura en cada conjunto.



Los datos que deberían registrarse incluyen, entre otros:

- las condiciones ambientales diarias durante el período en que se conserva la fruta o verdura,
- el número y las fechas de emergencia de larvas que salgan de la fruta o verdura y del hospedante utilizado como control:
  - el sustrato también podrá tamizarse a intervalos antes de que todas las larvas hayan emergido y al final del período de retención (que podrá variar según la temperatura y el hospedante),
  - el período normal de desarrollo debería determinarse a partir del control y de las colonias. Al final del período de retención, la fruta o vegetal debería diseccionarse (pero no eliminarse) para determinar la presencia de larvas vivas y muertas o pupas que permanecieron dentro y si las larvas han tenido suficiente tiempo para emerger. Un hospedante condicional podrá requerir un período prolongado para la emergencia de las larvas, relativo a un hospedante utilizado como control, pero al final pueden hacerlo. Si se encuentran larvas vivas, la fruta o verdura debería retenerse hasta que todas las larvas maduras hayan emergido o hayan sido removidas,
  - la fruta o verdura pueden diseccionarse o cortarse para contar las larvas, como una alternativa para conservarlas. La desventaja con la disección es que el estatus del hospedante entonces se basará en el recuento de larvas, en vez de en adultos, y en la eficacia de la detección de larvas en la fruta o vegetal y en el hospedante utilizado como control. La eficacia de la detección deberá determinarse antes de iniciar la evaluación.
  - número de pupas y fechas de pupación,
    - el número de pupas debería registrarse y mantenerse las pupas en un sustrato de pupación bajo condiciones ambientales apropiadas, junto con las pupas de control, hasta la emergencia de los adultos,
  - el número y las fechas de emergencia de los adultos separados por sexo:
    - todos los adultos que han emergido deberán contarse, sexarse e identificarse después de que se han desarrollado las características morfológicas. Las anomalías deberían registrarse,
  - capacidad de los adultos para reproducirse. Si esto no se determina, y los adultos parecen normales, entonces se supone que los adultos pueden reproducirse normalmente y que la fruta o verdura no puede designarse como no hospedante,
  - desviaciones de la morfología normal de las larvas, pupas y adultos y del comportamiento que podrá indicar efectos de un factor de resistencia en la fruta o verdura,
  - deberían compararse los números de larvas, pupas y adultos que emerjan de la fruta o verdura con los del control,

- el porcentaje de emergencia de adultos del control y de pupas de la fruta o verdura del ensayo deberían compararse al de una colonia, si la colonia está disponible.

#### **4. Interpretación de resultados**

Los siguientes puntos, entre otros, deberían considerarse en la interpretación de los datos de los ensayos de determinación del estatus de hospedantes y la designación del estatus:

- las conclusiones que se puedan sacar del estatus de hospedante a partir de ensayos estadísticamente validados en jaulas de laboratorio, jaulas de campo, invernadero e infestaciones naturales son hospedante natural, no hospedante natural y hospedante condicional,
- la(s) condición(es) definida(s) que se ha(n) especificado de la fruta o verdura (por ejemplo, factor(es) de resistencia) evaluados y confirmados en los ensayos pueden designarse como un requisito para la exportación,
- si ningún adulto viable emerge del control, el ensayo debería repetirse y las condiciones de la prueba puede que requieran modificarse,
- baja emergencia de larvas o adultos del hospedante utilizado como control puede indicar un problema con las condiciones del experimento, la necesidad de incrementar el tamaño de la muestra de la fruta o verdura, el número de hembras en el ensayo o la calidad de las hembras al momento de los ensayos de infestación,
- las observaciones de nula emergencia de adultos en todos los ensayos de fruta o verdura o en todas las réplicas de los ensayos de fruta o verdura de condiciones especificadas podrá indicar que éste es un no hospedante natural o un hospedante condicional,
- la emergencia de un adulto de mosca de la fruta de una fruta o verdura utilizada en el ensayo, de cualquier réplica, indica que ésta puede ser un hospedante.

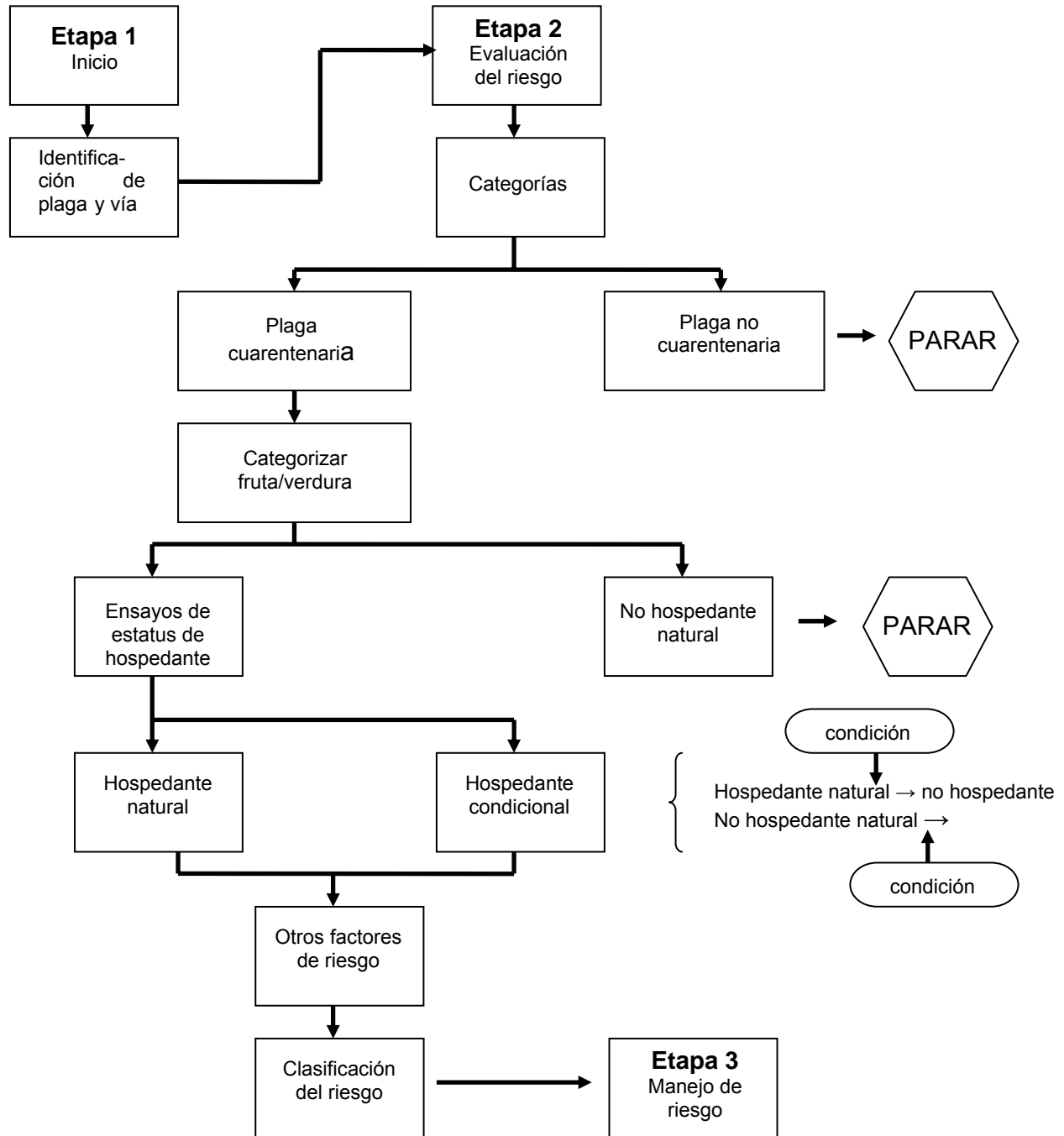
#### **5. Mantenimiento de registros**

La ONPF debería mantener registros apropiados de ensayos de hospedantes. La información que se mantenga debería ser la adecuada para el fin previsto de determinación del estatus de hospedante. La información en los registros debería incluir, entre otras cosas:

- el nombre científico de la mosca de la fruta,
- el nombre científico y la variedad de la fruta o verdura,
- la ubicación de los especímenes muestra,
- la(s) condición(es) definida(s) que se ha(n) especificado para la fruta o verdura como factor(es) de resistencia para infestaciones de moscas de la fruta,
- los ensayos realizados, las condiciones definidas, el diseño del experimento, las fechas, ubicaciones, los datos, cálculos estadísticos y resultados,
- las referencias,
- la información adicional, incluyendo fotografías, que puedan ser específicas para la mosca de la fruta, la fruta o verdura o el estatus de hospedante.

Para cada especie de mosca de la fruta y fruta o vegetal, el exportador debería proporcionar al importador los informes sobre los resultados de los ensayos de estatus de hospedante, de conformidad con esta norma.

**Apéndice 1: Diagrama de flujo señalando la posición relativa de la determinación del estatus de hospedante en el proceso de análisis de riesgo de plagas.**



**Apéndice 2: Análisis estadístico opcional en la determinación del estatus de hospedante y la eficacia de las condiciones definidas que se han especificado en la designación de hospedante.**

La eficacia del factor de resistencia en la fruta o verdura y su nivel de confianza deberían calcularse a partir del nivel de infestación, el cual es el número de larvas del tercer estadio, pupas y moscas que se están desarrollando en relación con el control (Couey y Chew 1986). Al desarrollar tratamientos cuarentenarios para frutas o verduras, como el tratamiento con agua caliente, se determina el nivel de confianza relacionado con el tratamiento que se ofrece a un número de insectos sin ningún superviviente, mediante la siguiente ecuación:

$$C = 1 - (1 - p_u)^n \quad (1)$$

en donde  $p_u$  es la proporción infestación máxima que se permite (por ejemplo, 0.0001 para un 99.99% de mortalidad) y  $n$  es el número de insectos de ensayo (Couey y Chew 1986). La ecuación 1 puede reordenarse para determinar el número de insectos que se necesitan para los ensayos a un nivel de confianza dado.

$$n = [\log(1-0.95)/\log(1- p_u)] \quad (2)$$

La ecuación 2 calcula la cantidad de insectos, fruta o verdura ( $n$ ) que deben haber en los ensayos que no tengan supervivientes, de tal forma que tendríamos un 95% de confianza ( $C$ , como proporción) de que la proporción de supervivencia sea inferior al nivel predeterminado ( $p_u$ ) (Couey y Chew 1986).

Couey y Chew (1986) presentan una ecuación para calcular los niveles de confianza para la eficacia solo cuando algunos insectos sobreviven en el hospedante,

$$\sum_{x=0}^{x=s} e^{-m} m^x / x! = 1 - C \quad (3)$$

en donde  $m$  es  $n \times p_u$ ;  $n$  es el número de insectos o frutas o verduras muestreadas;  $s$  es el número de supervivientes y  $C$  es el nivel de confianza. Esta ecuación utiliza la ley de distribución de Poisson que supone  $n$  grandes y  $p_u$  pequeña (Couey y Chew 1986). Se espera que la mayoría de las frutas y vegetales en ensayos de determinación de hospedante tendrán 0 ó 1 superviviente y una distribución Poisson, los cuales estos modelos suponen pueden ser los más apropiados (Baker *et al.* 1990). Una distribución binomial puede ser más apropiada bajo condiciones diferentes, por ejemplo, infestación elevada y uniforme (Patil 1960). Follett y Hennessey (2007) esbozan, con ejemplos de la literatura, la forma de determinar los niveles de confianza basándose en el tamaño de la muestra utilizada durante los ensayos de estatus del hospedante, de tal forma que se pueda demostrar su equivalencia con los tratamientos cuarentenarios tradicionales.