

PREDICTION OF SURVIVING LARVAE OF MEXICAN FRUIT FLY AFTER HEATING IN A BLOCK SYSTEM

PREDICCIÓN DE LA SUPERVIVENCIA DE LARVAS DE LA MOSCA MEXICANA DE LA FRUTA DESPUÉS DEL CALENTAMIENTO EN UN SISTEMA DE BLOQUES

Lorena Caro-Corrales¹, José Caro-Corrales^{1*}, José López-Valenzuela¹, Ángel Valdez-Ortiz¹, Cuauhtémoc Reyes-Moreno¹, Emilio Hernández-Ortiz²

¹Maestría en Ciencias y Tecnología de Alimentos y Programa Regional del Noroeste para el Doctorado en Biotecnología. Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, México.

²Programa Moscafrut SAGARPA-IICA, Subdirección de Desarrollo de Métodos, Metapa de Domínguez, Chiapas, México.

ABSTRACT

Modeling thermal death kinetics and heat transfer can allow the prediction of temperature-time combinations for a thermal process, which will facilitate successful development of thermal treatments for pest control. The objectives of this study were: 1) to predict the number of surviving third-instar *Anastrepha ludens* after heating in a block system using a thermal death kinetic model, 2) to validate predictions of surviving larvae, determining survival of malformed puparia and, 3) to assess heat resistance by gender of eclosed adults. Exposure times for 44, 46, and 48 °C were calculated for 30, 50, 70, 90, and 99 % mortality. Predictions of surviving larvae were successfully validated; for all temperature-time combinations the difference was lower than one larva. Larvae that survived heat treatment and pupariated were scored as surviving larvae. Nevertheless, not all puparia eclosed to adults; some developed as malformed puparia. Adults from treated puparia that did not show malformations emerged at least 24 h later than adults from control puparia. Heat treatment also induced larviform, bottlenose and incompletely-eclosed puparia, but none of them eclosed as adult flies. From treated normal puparia, male larvae were more tolerant to heat in two of the eight temperature-time combinations where there was fly production. The thermal death kinetic model satisfactorily predicted the number of surviving third-instar *A. ludens* after heating in a block system at the studied sublethal temperature-time combinations.

Key words: *Anastrepha ludens*, puparia, heating block system.

RESUMEN

El modelado de la cinética de muerte térmica y de la transferencia de calor puede permitir la predicción de combinaciones de temperatura y tiempo para un proceso térmico, lo cual facilitará el desarrollo exitoso de tratamientos térmicos para el control de plagas. Los objetivos de este estudio fueron: 1) predecir el número de sobrevivientes de larvas de *Anastrepha ludens* en el tercer estadio, después del calentamiento en un sistema de bloques utilizando un modelo cinético de muerte térmica, 2) validar las predicciones de larvas sobrevivientes, determinando la sobrevivencia de pupas deformes, y 3) evaluar la resistencia al calor por género de los adultos eclosionados. Los tiempos de exposición a 44, 46 y 48 °C se calcularon para 30, 50, 70, 90 y 99 % de mortalidad. Las predicciones de larvas sobrevivientes se validaron con éxito; para todas las combinaciones de temperatura y tiempo, la diferencia fue menor a una larva. Las larvas que sobrevivieron el tratamiento térmico y formaron pupas se calificaron como larvas sobrevivientes. No obstante, no todas las pupas eclosionaron a adultos; algunas se desarrollaron como pupas deformes. Los adultos de pupas tratadas que no mostraron deformaciones emergieron al menos 24 h después que los adultos de las pupas control. El tratamiento térmico también indujo pupas larviformes, con nariz de botella y con eclosión incompleta, pero ninguna de ellas eclosionó a moscas adultas. A partir de pupas normales tratadas, las larvas macho fueron más tolerantes al calor en dos de las ocho combinaciones de temperatura y tiempo donde hubo producción de moscas. El modelo cinético de muerte térmica predijo satisfactoriamente el número de sobrevivientes de *A. ludens* del tercer estadio, después del calentamiento en un sistema de bloques a las combinaciones de temperatura y tiempo subletales estudiadas.

* Author for correspondence ♦ Autor responsable.

Received: June, 2013. Approved: February, 2014.

Published as ARTICLE in *Agrociencia* 48: 211-223. 2014.

INTRODUCTION

Fruit flies of the genus *Anastrepha* are one of the three main problems of fruit production in México (Ibañez-Palacios *et al.*, 2010). Temperature is one of the main factors delimitating survival and natural mortality in pest populations and offers a rich potential that can be exploited for developing environmentally safe pest management strategies (Hallman and Denlinger, 1998). Heat treatments are relatively short, and the heating rate is affected by many factors; for example, heterogeneity in mangoes' (*Mangifera indica* L.) shape and size produces variations in heat penetration, and different temperature-time combinations are needed to disinfest them (Matias-Hernandez *et al.*, 1998). Hence, developing a heat treatment strategy for a commodity has typically been specific to pest and commodity variety, and even to the shape, size and weight of the commodity (Hallman *et al.*, 2005).

Research to develop treatments for pest control has used millions of immature flies (Hernández *et al.*, 2007; NAPPO, 2010). *Anastrepha ludens* (Loew) (Diptera: Tephritidae) is a quarantine pest and among its hosts there are important fruits such as citrus (*Citrus sinensis* L. (Osbeck), *C. aurantium* L.) and mangoes (Aluja *et al.*, 1987); it is more attracted to green orange and mango fruits than to yellow ones (Garcia-Ramirez *et al.*, 2004). Importing mangoes to the USA from México where this fly is indigenous, either requires disinfestation treatments with chemicals such as methyl bromide or non-chemical treatments such as irradiation, vapor heat, steam, cold, and hot water immersion. In hot water immersion treatments, the dip time at 46.1 °C depends on the shape and size of the fruit. For instance, rounded varieties of mangoes in weight bands up to 500 g, 501 to 700 g, and 701 to 900 g are immersed 75, 90, and 110 min, in water at 46.1 °C (NOM-075-FITO-1997, USDA-APHIS 2011) to disinfest the fruit. However, if hydro-cooling starts immediately after the hot water immersion treatment, the dip time must be extended for 10 min. To disinfest the fruit of tephritid immatures, USDA-APHIS (2011) quarantine restrictions mandate a treatment efficacy at the Probit 9 level, equivalent to 99.9968 % mortality (Follet and Neven, 2006).

One promising route to reduce the time and cost needed to develop phytosanitary heat treatments is

Palabras clave: *Anastrepha ludens*, pupas, sistema de bloques de calentamiento.

INTRODUCCIÓN

Las moscas de la fruta del género *Anastrepha* son uno de los tres problemas principales de la producción de fruta en México (Ibañez-Palacios *et al.*, 2010). La temperatura es uno de los factores principales que delimitan la sobrevivencia y la mortalidad natural en las poblaciones de plaga y ofrece un gran potencial que puede ser explotado para desarrollar estrategias de manejo de plagas ambientalmente seguras (Hallman y Denlinger, 1998). Los tratamientos térmicos son relativamente cortos y la rapidez de calentamiento es afectada por muchos factores; por ejemplo, la heterogeneidad en la forma y el tamaño de mangos (*Mangifera indica* L.) produce variaciones en la penetración del calor, y son necesarias distintas combinaciones de temperatura y tiempo para desinfestarlos (Matias-Hernandez *et al.*, 1998). Por ende, el desarrollo de una estrategia de tratamiento térmico para un producto normalmente ha sido específico para una variedad de plaga y producto, e incluso para la forma, el tamaño y el peso del producto (Hallman *et al.*, 2005).

Las investigaciones para desarrollar tratamientos para el control de plagas han utilizado millones de moscas inmaduras (Hernández *et al.*, 2007; NAPPO, 2010). *Anastrepha ludens* (Loew) (Diptera: Tephritidae) es una plaga de cuarentena y entre sus hospederos hay frutos importantes como cítricos (*Citrus sinensis* L. (Osbeck), *C. aurantium* L.) y mangos (Aluja *et al.*, 1987), con mayor atracción hacia frutos de naranja y mango verdes que hacia los amarillos (Garcia-Ramirez *et al.*, 2004). La importación de mangos a EE.UU. desde México, de donde esta mosca es nativa, requiere ya sea tratamientos de desinfestación con químicos como bromuro de metilo o tratamientos no químicos como irradiación, calor por vapor, frío, e inmersión en agua caliente. En los tratamientos de inmersión en agua caliente, el tiempo para sumergir a 46.1 °C depende de la forma y el tamaño del fruto. Por ejemplo, las variedades redondas de mangos en categorías de hasta 500 g, 501 a 700 g, y 701 a 900 g se sumergen 75, 90 y 110 min, en agua a 46.1 °C (NOM-075-FITO-1997, USDA-APHIS 2011) para desinfestar el fruto. Sin embargo, si el enfriamiento con agua comienza inmediatamente después del

by modeling thermal death kinetics for quarantine pests coupled with heat transfer modeling inside commodities (Jang, 1996). The first step is having an adequate thermal death kinetic model for sublethal temperature-time combinations to be validated using *in vitro* experiments. A quarantine treatment should be effective against the most tolerant stage. Mangan *et al.* (1998) reviewed several studies and concluded that third-instar *A. ludens* was the most heat tolerant stage based on tests with eggs and larvae inside mangoes and *in vitro* hot water immersion. A fractional order thermal death kinetic model fits heat mortality of *A. ludens* (Aispuro-Coronel, 2007; personal communication); thermal constants at 44, 46, 48, and 50 °C are shown in Table 1.

The objectives of this study were: 1) to predict the number of surviving third-instar *A. ludens* after heating in a block system using a thermal death kinetic model; 2) to validate predictions through surviving larvae, determining survival of malformed puparia; and, 3) to assess heat resistance by gender.

MATERIALS AND METHODS

Insects

Larvae of *A. ludens* were obtained from the Moscafrut Facility at Metapa de Domínguez, Chiapas, Mexico, and grown on an artificial diet according to the methodology described by Stevens (1991) and Domínguez *et al.* (2010). Rearing conditions for larval development were 26 °C, 70±10 % RH, and photoperiod of 14:10 h (L:D). When the larvae were at third instar, they were separated from the diet using steel tweezers. Larval stages were observed with a stereomicroscope (Motic, SMZ-140-N2GG, USA) with software (Motic Images 2000, USA) to capture and

tratamiento de inmersión en agua caliente, el tiempo de inmersión debe extenderse 10 min. Para desinfestar el fruto de tefrítidos inmaduros, las restricciones de cuarentena de USDA-APHIS (2011) exigen una eficacia del tratamiento al nivel Probit 9, equivalente a 99.9968 % de mortalidad (Follet y Neven, 2006).

Una ruta prometedora para reducir el tiempo y el costo requeridos para desarrollar tratamientos térmicos fitosanitarios es modelar la cinética de muerte térmica para plagas de cuarentena junto con el modelado de la transferencia de calor dentro de los productos (Jang, 1996). El primer paso es tener un modelo cinético de muerte térmica adecuado, para combinaciones de temperatura y tiempo subletales, validado con experimentos *in vitro*. Un tratamiento de cuarentena debe ser efectivo contra la etapa más tolerante. Mangan *et al.* (1998) revisaron varios estudios y concluyeron que el tercer estadio de *A. ludens* era la etapa más tolerante al calor, con base en pruebas con huevos y larvas dentro de mangos e *in vitro* por inmersión en agua caliente. Un modelo cinético de muerte térmica de orden fraccionario se ajusta a la mortalidad por calor de *A. ludens* (Aispuro-Coronel, 2007; comunicación personal); las constantes térmicas a 44, 46, 48 y 50 °C se muestran en el Cuadro 1.

Los objetivos de este estudio fueron: 1) predecir el número de sobrevivientes de larvas de *A. ludens* de tercer estadio después del calentamiento en un sistema de bloques, con un modelo cinético de muerte térmica; 2) validar las predicciones de larvas sobrevivientes, determinando la sobrevivencia de pupas deformes; y 3) evaluar la resistencia al calor por género.

MATERIALES Y MÉTODOS

Insectos

Larvas de *A. ludens* se obtuvieron de la Planta de Producción Moscafrut en Metapa de Domínguez, Chiapas, México, y se desarrollaron con una dieta artificial basada en la metodología descrita por Stevens (1991) y Domínguez *et al.* (2010). Las condiciones de producción para el desarrollo de las larvas fueron 26 °C, 70±10 % HR, y fotoperiodo de 14:10 h (L:O). Cuando las larvas llegaron a su tercer estadio, se separaron de la dieta usando pinzas de acero. Las etapas larvales se observaron con un estereomicroscopio (Motic, SMZ-140-N2GG, EUA) con un programa (Motic Images 2000, EUA) para capturar y registrar imágenes en una computadora. El análisis de las imágenes confirmó el tercer estadio cuando el gancho de la boca era negro, la

Table 1. Thermal death constants for third-instars of *A. ludens*.

Cuadro 1. Constantes de muerte térmica para larvas del tercer estadio de *A. ludens*.

<i>T</i> (°C)	<i>N</i>	<i>k'</i>	<i>c'</i>
44	0.45	0.0098	0.9919
46	0.55	0.0339	1.0200
48	0.55	0.1097	0.8779
50	0.65	0.3793	0.9466

Source: Aispuro-Coronel F. J. (2013. Personal communication)

❖ Fuente: Aispuro-Coronel F. J. (2013. Comunicación personal).

record images in a computer. Analysis of the images confirmed the third instar when the mouth hook was black, the larva and anterior spiracle were well developed and showed high mobility.

Prediction of surviving larvae

Prediction of surviving third-instar larvae of *A. ludens* was made using the thermal death kinetic model described by Gazit *et al.* (2004) based on the following equation:

$$\frac{d(N/N_0)}{dt} = -k(N/N_0)^n \quad (1)$$

where N_0 and N are the initial and surviving numbers of larvae, t is the exposure time (min), k is the thermal death rate constant (min^{-1}) when temperature is constant, and n is the kinetic order of death. The integration form of this equation for a fractional order is:

$$\begin{aligned} (N/N_0)^{1-n} &= -k(1-n)t + c(1-n) \\ (N/N_0)^{1-n} &= -k't + c' \end{aligned} \quad (2)$$

where c' is the ordinate at origin and k' is the slope in a $(N/N_0)^{1-n}$ versus t graph.

Since the purpose of this study was to predict the number of surviving larvae, at each temperature for a given mortality percentage $[(N_0-N)/N_0]100$, the exposure time was calculated using thermal death constants (Table 1) and the number of surviving larvae for that exposure time was predicted using the initial number of larvae. Therefore, every temperature-time combination is associated with a given mortality. For instance, when the aim is to achieve a 30 % mortality, then $[(N_0-N)/N_0]100 = 30$, from here the survival ratio was $N/N_0=0.70$. After using the thermal death kinetic model, the calculated exposure time at 46 °C ($n=0.55$, $k'=0.0339$, and $c'=1.0200$, Table 1) was 4.96 lethal min. From the survival ratio, since the initial number of larvae was $N_0=80$, the predicted number of surviving larvae for that exposure time was $N=56$ larvae. After all predictions were made, they were experimentally validated at each temperature by applying the calculated exposure time for a given mortality and registering the number of surviving larvae.

Experimental design and treatment application

A completely random design was used; factors were temperature (44, 46, and 48 °C) and time associated to 30, 50, 70, 90, and 99 % mortality. For these mortality levels, the calculated

larva y el espiráculo anterior estaban bien desarrollados y mostraban movilidad alta.

Predicción de larvas sobrevivientes

La predicción de larvas sobrevivientes del tercer estadio de *A. ludens* se realizó utilizando el modelo cinético de muerte térmica descrito por Gazit *et al.* (2004) y basado en la siguiente ecuación:

$$\frac{d(N/N_0)}{dt} = -k(N/N_0)^n \quad (1)$$

donde N_0 y N son los números de larvas inicial y de sobrevivientes, t es el tiempo de exposición (min), k es la constante de rapidez de muerte térmica (min^{-1}) cuando la temperatura es constante, y n es el orden cinético de muerte. La forma integrada de esta ecuación para un orden fraccionario es:

$$\begin{aligned} (N/N_0)^{1-n} &= -k(1-n)t + c(1-n) \\ (N/N_0)^{1-n} &= -k't + c' \end{aligned} \quad (2)$$

donde c' es la ordenada al origen y k' es la pendiente en un gráfico $(N/N_0)^{1-n}$ contra t .

Dado que el objetivo de este estudio fue predecir el número de larvas sobrevivientes, a cada temperatura, para un porcentaje de mortalidad dado $[(N_0-N)/N_0]100$, el tiempo de exposición se calculó con las constantes de muerte térmica (Cuadro 1) y el número de larvas sobrevivientes para ese tiempo de exposición se predijo con el número inicial de larvas. Por lo tanto, cada combinación de temperatura y tiempo está asociada con una mortalidad específica. Por ejemplo, cuando la meta es lograr 30 % de mortalidad, entonces $[(N_0-N)/N_0]100=30$; de aquí, la fracción de sobrevivencia fue $N/N_0=0.70$. Después de usar el modelo cinético de muerte térmica, el tiempo de exposición calculado a 46 °C ($n=0.55$, $k'=0.0339$ y $c'=1.0200$, Cuadro 1) fue 4.96 min letales. A partir de la fracción de sobrevivencia, ya que el número inicial de larvas fue $N_0=80$, el número predicho de larvas sobrevivientes para ese tiempo de exposición fue $N=56$ larvas. Después de que se hicieron todas las predicciones, se validaron experimentalmente a cada temperatura al aplicar el tiempo de exposición calculado para una mortalidad específica y registrar el número de larvas sobrevivientes.

Diseño experimental y aplicación del tratamiento

Se utilizó un diseño totalmente aleatorio; los factores fueron temperatura (44, 46 y 48 °C) y tiempo asociado a 30, 50, 70, 90

exposure times at 44 °C were 17.35, 31.52, 48.59, 72.46, and 93.11 min; at 46 °C they were 4.96, 8.49, 12.93, 19.62, and 26.37 min; at 48 °C calculated exposure times were 0.24, 1.33, 2.70, 4.76, and 6.85 min, respectively. The response variables were the number of surviving larvae (N), the ratio of number of surviving larvae to the initial number of larvae raised to the $(1-n)$ power, i.e. $(N/N_0)^{1-n}$, the number of eclosed males and females, and the type of puparia (normal, larviform, bottlenose, and incompletely-eclosed puparia). Thomas and Mangan (1995) found that in the bottlenose malformation the anterior-most segment of the puparium is abnormally constricted, otherwise morphologically asymptomatic. Larviform malformation was characterized by a failure to constrict into a typical barrel shape (Thomas, 1985). Incompletely-eclosed pupariation is the phenomenon where larvae form normal puparia and develop to adult, but these fail to emerge from puparium.

Five replicates for the 15 combinations were made with 80 third instars per treatment giving a total of 6000 larvae. For every response, an analysis of variance was accomplished and the Tukey's test ($p \leq 0.05$) was used to obtain differences between means of the responses.

A heating block system built as described by Ikediala *et al.* (2000) was used to heat third instar larvae. Two aluminum blocks (25×25×2 cm) and an intermediate thin aluminum slab of 25×25×0.3 cm with four square holes of 5×5 cm located symmetrically near the center could fit together. This achieved four closed square chambers where the larvae could be placed. One T type thermocouple was inserted in each holding chamber and connected to a data acquisition module (Omega, OMB-DAQ-55, Stamford, CT, USA) to record temperature histories. Heat was supplied by electric heating pads attached to the upper and lower surfaces of each plate, connected to a voltage regulator (ISB Sola Basic, microvolt inet, Mexico) and controlled by a standard rheostat through a T type thermocouple.

The bottom block and intermediate slab were joined together and 80 third instar larvae (20 per chamber) along with 7 mL of rearing medium were placed on them and closed with the upper block. Initial temperature was set at 25 °C and temperature was raised at 1 °C min⁻¹. Temperature was recorded every 3 s and treatment time initiated when temperature reached the target temperature (44, 46, and 48 °C), which was held for the selected exposure times. Immediately after the exposure time, the upper aluminum block was removed and larvae along with new rearing medium were transferred to plastic containers by gentle brushing. These were then sealed with a mesh to allow air to pass through, sprayed every day with water and placed in a room at 26 °C, 80 % RH, and a photoperiod of 14:10 h (L:D). Treated larvae were observed for 5 d, because dead larvae are not always obvious (Hallman *et al.*, 2005). If the larva had turned

y 99 % de mortalidad. Para estos niveles de mortalidad, los tiempos de exposición calculados a 44 °C fueron 17.35, 31.52, 48.59, 72.46 y 93.11 min; a 46 °C fueron 4.96, 8.49, 12.93, 19.62 y 26.37 min; y a 48 °C los tiempos de exposición calculados fueron 0.24, 1.33, 2.70, 4.76 y 6.85 min, respectivamente. Las variables de respuesta fueron el número de larvas sobrevivientes (N), la fracción del número de larvas sobrevivientes respecto al número inicial de larvas elevada a la potencia $(1-n)$, es decir $(N/N_0)^{1-n}$, el número de machos y hembras eclosionados, y el tipo de pupa (normal, larviforme, con nariz de botella, y pupas con eclosión incompleta). Thomas y Mangan (1995) encontraron que en la deformación de nariz de botella el segmento más anterior del pupario está anormalmente constreñido, por lo demás es morfológicamente asintomático. La deformación larviforme se caracterizó por no poder adoptar una forma de barril típica (Thomas, 1985). La pupación con eclosión incompleta es el fenómeno donde las larvas forman pupas normales y se desarrollan a adultos, pero éstos no pueden emerger del pupario.

Con 80 individuos del tercer estadio por tratamiento, se hicieron cinco réplicas para las 15 combinaciones, dando un total de 6000 larvas. Para cada respuesta, se llevó a cabo un análisis de varianza y la prueba de Tukey $p \leq 0.05$ se utilizó para obtener las diferencias entre las medias de las respuestas.

Un sistema de bloques de calentamiento construido según lo describieron Ikediala *et al.* (2000) se utilizó para calentar larvas del tercer estadio. Consiste en dos bloques de aluminio (25×25×2 cm) y una placa intermedia delgada de aluminio de 25×25×0.3 cm con cuatro orificios cuadrados de 5×5 cm ubicados simétricamente cerca del centro. Se obtuvieron cuatro celdas cuadradas cerradas donde se podían colocar las larvas. Un termopar tipo T se insertó en cada celda de retención y se conectó a un módulo de obtención de datos (Omega, OMB-DAQ-55, Stamford, CT, EUA) para registrar las historias de temperaturas. El calor lo proporcionaron almohadillas térmicas sujetas a las superficies superior e inferior de cada bloque, conectadas a un regulador de voltaje (ISB Sola Basic, microvolt inet, México) y controladas por un reóstato estándar a través de un termopar tipo T.

El bloque inferior y la placa intermedia se unieron y se colocaron 80 larvas en el tercer estadio (20 por celda) junto con 7 mL de medio de reproducción, y se cerró con el bloque superior. La temperatura inicial se estableció a 25 °C y se elevó 1 °C min⁻¹. La temperatura se registró cada 3 s y el tiempo de tratamiento comenzó cuando se alcanzó la temperatura objetivo (44, 46 y 48 °C), la cual se mantuvo durante el tiempo de exposición seleccionado. Inmediatamente después del tiempo de exposición, el bloque superior de aluminio se retiró y las larvas, junto con nuevo medio de reproducción, se transfirieron a contenedores de plástico por medio de cepillado suave. Estos después se sellaron con una malla para permitir que pasara el aire, se rociaron todos

dark, had not initiated pupariation, or did not respond to gentle stimulation, it was considered dead. Control insects were treated the same way but without heat at 25 °C. Abbott's equation for calculating control mortality (Abbott, 1925) was applied.

Five days after treatments, surviving larvae and puparia were transferred to different plastic containers with pupariation medium (slightly moistened sterile vermiculite, Strong-lite fine, Sun Gro Horticulture, Seneca, IL, USA) using steel tweezers at the same room conditions for 14 d.

Normal and damaged puparia were separated and held for emergence. Puparia were placed into 2 L plastic containers sealed with a white nylon mesh in the cover to facilitate access to the flies after they emerged. Three days after treated normal puparia eclosed, larviform and bottlenose puparia were discarded. Adults were continuously fed with a 3:1 mixture of sugar and hydrolyzed enzymatic yeast ICN[®] (Biomedicals, Costa Mesa, CA) (Message and Zucoloto, 1989). Water was supplied into 50 mL bottles with a filter paper which was impregnated by capillarity at a maximum of 10 d.

RESULTS AND DISCUSSION

Control mortality for the third larval instars of *A. ludens* was less than 2 %. Predicted and experimental survival of third-instars of Mexican fruit fly is shown in Table 2. Experimental values are the mean of five replicates (each with $N_0=80$ larvae) and were rounded to one decimal. At each temperature, from regression analyses between predicted and experimental numbers of surviving larvae, the coefficients of determination were $R^2>0.99$ ($p\leq 0.01$). At 44 °C, the largest difference between predicted and experimental number of larvae corresponded to 30, 90, and 99 % mortality and this difference was 0.4 larvae. However, for 50 and 70 % mortality, the difference was less than or equal to 0.2 larvae. At 46 °C, the model generates a better estimation, except for 30 % mortality where the difference was 0.4 larvae. At 48 °C, the largest difference between predicted and experimental numbers is 0.4 larvae corresponding to 30, 50, 90, and 99 % mortality. For all the temperature-time combinations the difference was lower than one larva. The thermal death kinetic model predicted satisfactorily the number of surviving larvae for the studied sublethal temperature-time combinations. As exposure time is increased at a constant temperature, the number of surviving larvae decreased. Johnson *et al.* (2004) found that red flour beetle larvae from dried fruit

los días con agua y se colocaron en un cuarto a 26 °C, 80 % HR, y un fotoperiodo de 14:10 h (L:O). Las larvas en tratamiento se observaron durante 5 d, porque no siempre es evidente cuando la larva está muerta (Hallman *et al.*, 2005). Si la larva se había puesto oscura, no había comenzado la pupación, o no respondía a estimulación suave, se consideró muerta. Los insectos testigo fueron tratados de la misma manera pero sin calor a 25 °C. Se aplicó la ecuación de Abbott para calcular la mortalidad del testigo (Abbott, 1925).

Cinco días después de los tratamientos, las larvas y pupas sobrevivientes se transfirieron a distintos contenedores de plástico con medio para pupación (vermiculita estéril ligeramente humedecida, Strong-lite fine, Sun Gro Horticulture, Seneca, IL, EUA), utilizando pinzas de acero en las mismas condiciones ambientales durante 14 d.

Las pupas normales y dañadas se separaron y se conservaron hasta la emergencia. Las pupas se colocaron en contenedores de plástico de 2 L sellados con una malla de nylon blanca en la cubierta para facilitar el acceso a las moscas una vez emergidas. Tres días después de que las pupas normales tratadas eclosionaron, se descartaron las pupas larviformes y con nariz de botella. Los adultos se alimentaron continuamente con una mezcla 3:1 de azúcar y levadura enzimática hidrolizada ICN[®] (Biomedicals, Costa Mesa, CA) (Message y Zucoloto, 1989). El agua se proporcionó en botellas de 50 mL con un papel filtro que se impregnó por capilaridad a un máximo de 10 d.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La mortalidad control para las larvas del tercer estadio de *A. ludens* fue menos de 2 %. La sobrevivencia predicha y experimental de larvas del tercer estadio de la mosca mexicana de la fruta se muestra en el Cuadro 2. Los valores experimentales son la media de cinco réplicas (cada una con $N_0=80$ larvas) y se redondearon a un decimal. A cada temperatura, a partir de los análisis de regresión entre los números de larvas sobrevivientes predichos y experimentales, los coeficientes de determinación fueron $R^2>0.99$ ($p\leq 0.01$). A 44 °C, la diferencia más grande entre el número de larvas predicho y experimental corresponde a 30, 90 y 99 % de mortalidad, y la diferencia fue de 0.4 larvas. Sin embargo, para la mortalidad de 50 y 70 %, la diferencia fue menor o igual a 0.2 larvas. A 46 °C, el modelo genera una estimación mejor, excepto para la mortalidad de 30 % donde la diferencia fue de 0.4 larvas. A 48 °C, la diferencia más grande entre los números predicho y experimental es de 0.4 larvas, que corresponde a 30, 50, 90 y 99 % de mortalidad. Para

Table 2. Predicted and experimental surviving third-instars of *A. ludens*.
Cuadro 2. Sobrevivientes predichos y experimentales de larvas del tercer estadio de *A. ludens*.

Temperature (°C)	Mortality (%)	Time (min)	Predicted surviving larvae	Experimental surviving larvae [†]
44	30	17.35	56	55.6 e
	50	31.52	40	40.0 d
	70	48.59	24	23.8 c
	90	72.46	8	7.6 b
	99	93.11	1	0.6 a
46	30	4.96	56	55.6 e
	50	8.49	40	40.0 d
	70	12.93	24	24.2 c
	90	19.62	8	7.8 b
	99	26.37	1	0.8 a
48	30	0.24	56	55.6 e
	50	1.33	40	39.6 d
	70	2.70	24	24.2 c
	90	4.76	8	7.6 b
	99	6.85	1	0.6

[†]Five replicates of $N_0 = 80$ larvae, 6000 larvae. Different letters indicate significant difference (HSD=1.94 larvae; Tukey, $p \leq 0.05$). ♦ Cinco réplicas de $N_0=80$ larvas, 6000 larvas. Distintas letras indican diferencia significativa (HSD=1.94 larvas; Tukey, $p \leq 0.05$).

and nuts were very tolerant at 48 °C (77 min), but at 50 and 52 °C the exposure times (9 and 1.6 min) were more acceptable. At a constant temperature, all ratios of surviving number of larvae to the initial number of the population raised to the $(1-n)$ were different. The slope increased sharply as temperature increased, resulting in lower times to achieve 100 % kill (Figure 1). This result is in agreement with that reported by Wang *et al.* (2002). At each temperature, from regression analyses between predicted and experimental $(N/N_0)^{1-n}$ values, the coefficients of determination were $R^2 > 0.99$ ($p \leq 0.01$). According to the thermal death model, with a kinetic order of death $n=0.55$, the exposure time to reach Probit 9 (99.9968 % mortality) is 100.2, 29.8, 7.9, and 2.5 min for 44, 46, 48, and 50 °C, respectively. For every 2 °C of temperature increase, the lethal (exposure) time to accomplish this mortality decreased by about 70 %. A regression analysis between the log of lethal time (LT) and temperature (T) led to a temperature increase of $z=3.7$ °C for a 10-fold decrease in lethal time required to achieve the same level of mortality (99.9968 %). The z value

todas las combinaciones de temperatura y tiempo la diferencia fue menor a una larva. El modelo cinético de muerte térmica predijo satisfactoriamente el número de larvas sobrevivientes para las combinaciones de temperatura y tiempo subletales estudiadas. Conforme aumentó el tiempo de exposición a temperatura constante, el número de larvas sobrevivientes disminuyó. Johnson *et al.* (2004) encontraron que larvas del escarabajo castaño de la harina de frutos secos y nueces fueron muy tolerantes a 48 °C (77 min), pero a 50 y 52 °C los tiempos de exposición (9 y 1.6 min) fueron más aceptables. A temperatura constante, todas las fracciones del número de larvas sobrevivientes al número inicial de la población elevadas a $(1-n)$ fueron diferentes. La pendiente aumentó drásticamente conforme la temperatura incrementó, resultando en tiempos más cortos para lograr la muerte al 100 % (Figura 1). Este resultado coincide con lo reportado por Wang *et al.* (2002). A cada temperatura, a partir de los análisis de regresión entre los valores $(N/N_0)^{1-n}$ predichos y experimentales, los coeficientes de determinación fueron $R^2 > 0.99$ ($p \leq 0.01$). De acuerdo al modelo cinético de muerte térmica, con un orden

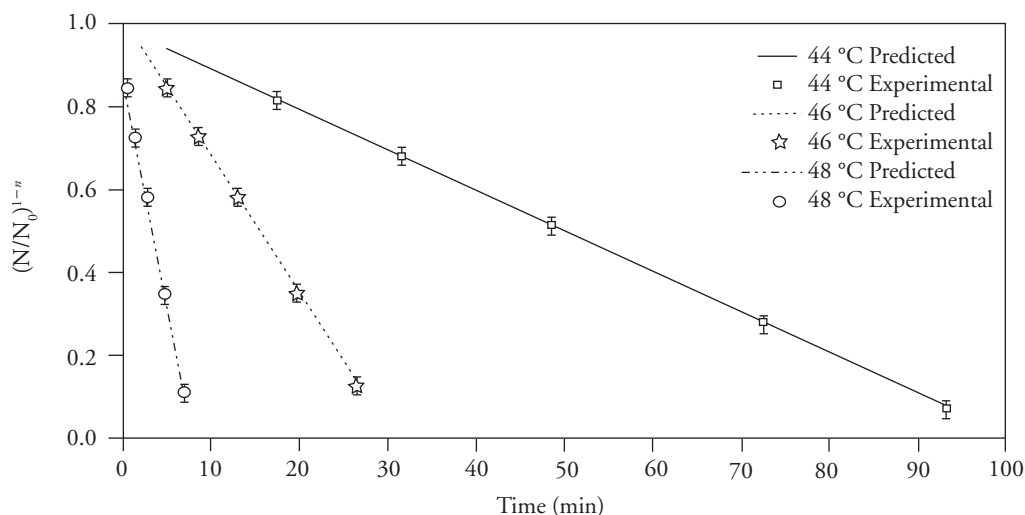


Figure 1. Predicted and experimental thermal death curves of third-instars of *A. ludens*. Vertical bars indicate the HSD=0.0754 (Tukey, $p \leq 0.05$).

Figura 1. Curvas de muerte térmica predichas y experimentales de larvas de *A. ludens* del tercer estadio. Las barras verticales indican HSD=0.0754 (Tukey, $p \leq 0.05$).

is practically the same independently of any fixed kinetic order of death taken from Table 1. The lowest and highest values are $z=3.702$ °C and $z=3.704$ °C. This result is similar to the value of 3.5 °C reported by Hallman *et al.* (2005) for third instars of Mexican fruit fly. The regression equation was $\log(LT_{99.9968}) = -0.27 T + 13.9$, where z is the negative reciprocal of the slope of the thermal death curve. The coefficient of determination was $R^2=0.9994$ ($p \leq 0.01$), which indicates that lethal time decreases exponentially with temperature in the studied range.

The heating block is a homogenous heating system. However, in practice the variability in heat transfer inside the fruit should be taken into account as commodity variety, shape, thickness, and size of the fruit have an effect on heat transfer. At a selected temperature, the thermal death kinetic model can be used to predict the lethal time required to achieve a given mortality. From temperature histories inside the fruit, the process (dipping) time to get that given lethal time (or mortality) can be calculated from a heat penetration analysis.

Thomas and Mangan (1995) showed that larval mortality rate increased sharply for 1 h of immersion in hot water at 42 °C for *A. ludens*. They also reported that 2.5 % of larvae survived after 1 h of immersion in hot water at 44 °C. We found that after 72.46

cinético de muerte $n=0.55$, el tiempo de exposición para alcanzar Probit 9 (mortalidad 99.9968 %) es 100.2, 29.8, 7.9 y 2.5 min para 44, 46, 48 y 50 °C, respectivamente. Para cada incremento de temperatura de 2 °C, el tiempo (de exposición) letal para lograr esta mortalidad disminuyó aproximadamente 70 %. Un análisis de regresión entre el log del tiempo letal (LT , por sus siglas en inglés) y la temperatura (T) llevó a un aumento en temperatura de $z=3.7$ °C para una disminución de 10 veces en el tiempo letal requerido para lograr el mismo nivel de mortalidad (99.9968 %). El valor z es prácticamente el mismo independientemente de cualquier orden cinético de muerte constante del Cuadro 1. Los valores menor y mayor son $z=3.702$ °C y $z=3.704$ °C. Este resultado es similar al valor de 3.5 °C reportado por Hallman *et al.* (2005) para larvas del tercer estadio de la mosca mexicana de la fruta. La ecuación de regresión fue $\log(LT_{99.9968}) = -0.27 T + 13.9$, donde z es el recíproco negativo de la pendiente de la curva de muerte térmica. El coeficiente de determinación fue $R^2=0.9994$ ($p \leq 0.01$), lo cual indica que el tiempo letal disminuyó exponencialmente con la temperatura en el rango estudiado.

El bloque de calentamiento es un sistema de calentamiento homogéneo. Sin embargo, en la práctica la variabilidad en la transferencia de calor dentro del

min at 44 °C, using a heating block system, 9.5 % of larvae survived while the thermal death kinetic model estimated a value of 10 %. Most surviving larvae recovered their mobility within 24 h and some without movement pupariated 5 or 6 d after treatment. Hansen and Sharp (1994) used the terms acute and chronic deaths. Acute death is characterized by the death of the larvae immediately after the treatment and chronic death is based on the number of larvae unable to survive to the adult stage. The temperature at which acute death is present is called temperature-mortality threshold.

Development of puparia from surviving larvae of *A. ludens* after heat treatment at 44, 46, and 48 °C is shown in Table 3. Number of dead larvae represents acute death, and chronic death corresponded to malformed puparia (larviform and bottlenose) and incompletely-eclosed puparia.

Treated normal puparia successfully emerged as adults. At each temperature, except for 0 vs. 0 and 0 vs. 0.2 comparisons, all numbers of treated normal puparia were different. Larvae of *A. ludens* treated using a heating block system showed acute and

fruto debe tomarse en cuenta ya que la variedad del producto, la forma, el espesor y el tamaño del fruto tienen un efecto en la transferencia de calor. A una temperatura seleccionada, el modelo cinético de muerte térmica puede usarse para predecir el tiempo letal requerido para lograr una mortalidad específica. A partir de las historias de temperatura dentro del fruto, el tiempo del proceso (de inmersión) para lograr ese tiempo letal específico (o mortalidad) puede calcularse con un análisis de penetración de calor.

Thomas y Mangan (1995) mostraron que la rapidez de mortalidad de las larvas incrementó drásticamente durante 1 h de inmersión en agua caliente a 42 °C para *A. ludens*. También reportaron que 2.5 % de las larvas sobrevivieron después de 1 h de inmersión en agua caliente a 44 °C. Encontramos que después de 72.46 min a 44 °C, usando un sistema de bloques de calentamiento, 9.5 % de las larvas sobrevivieron mientras que el modelo cinético de muerte térmica estimó un valor de 10 %. La mayoría de las larvas sobrevivientes recuperaron su movilidad dentro de las 24 h siguientes, y algunas sin movimiento formaron pupas 5 o 6 d después del tratamiento.

Table 3. Puparia from surviving larvae of *A. ludens*.
Cuadro 3. Pupas de larvas sobrevivientes de *A. ludens*.

Temp (°C)	Mortality (%)	Dead larvae	Total puparia	Puparia [†]			
				Normal	Larviform	Bottlenose	Incompletely
44	30	24.4 a	55.6 e	43.0 h	5.4 h	7.2 d	1.6 b,c
	50	40.0 b	40.0 d	22.4 e	5.4 h	12.2 e	3.4 d
	70	56.2 c	23.8 c	13.8 c	3.4 g	6.6 c,d	0.8 a,b
	90	72.4 d	7.6 b	0.2 a	3.0 f,g	4.4 b	0.2 a
	99	79.4 e	0.6 a	0.0 a	0.2 a,b	0.4 a	0.0 a
46	30	24.4 a	55.6 e	39.0 g	5.6 h	11.0 e	2.8 d
	50	40.0 b	40.0 d	18.6 d	1.8 c,d,e	19.6 h	1.8 c
	70	55.8 c	24.2 c	4.6 b	2.6 e,f,g	17.0 g	0.8 a,b
	90	72.2 d	7.8 b	0.0 a	2.8 e,f,g	5.0 b,c	0.0 a
	99	79.2 e	0.8 a	0.0 a	0.2 a,b	0.6 a	0.0 a
48	30	24.4 a	55.6 e	35.0 f	5.6 h	15.0 f	2.8 d
	50	40.4 b	39.6 d	15.0 c	1.2 b,c,d	23.4 i	0.6 a
	70	55.8 c	24.2 c	0.2 a	1.0 a,b,c	23.0 i	0.2 a
	90	72.4 d	7.6 b	0.0 a	2.2 d,e,f	5.4 b,c,d	0.0 a
	99	79.4 e	0.6 a	0.0 a	0.0 a	0.6 a	0.0 a

[†]Five replicates of 80 larvae, 6000 larvae. Total puparia included treated normal, larviform and bottlenose puparia. Incompletely-eclosed puparia emerged from treated normal puparia. Different letters within a column indicate significant difference (Tukey, $p \leq 0.05$). HSD=1.94 larvae, 1.94, 1.49, 1.08, 1.91, and 0.83 puparia for dead larvae, total, treated normal, larviform, bottlenose, and incompletely-eclosed puparia, respectively. ♦ Cinco réplicas de 80 larvas, 6000 larvas. Las pupas totales incluyeron pupas tratadas normales, larviformes y con nariz de botella. Las pupas con eclosión incompleta emergieron de pupas normales tratadas. Distintas letras dentro de una columna indican diferencia significativa (Tukey, $p \leq 0.05$). HSD=1.94 larvas, 1.94, 1.49, 1.08, 1.91 y 0.83 pupas, para larvas muertas, pupas totales, normales, larviformes, con nariz de botella y con eclosión incompleta, respectivamente.

chronic death at 44, 46, and 48 °C. The percentage of incompletely-eclosed puparia in the control was very low (less than 1 %) compared to that from treatments.

The number of treated normal puparia decreased continuously while the number of malformed puparia (larviform and bottlenose), at each temperature, increased from 30 to 50 % mortality and then decreased as exposure time increased. Bottlenose puparia frequency was higher than larviform or incompletely-eclosed puparia frequency. This could be due to heat damage preventing larvae from completing metamorphosis. After heat treatment, surviving larvae pupariate; however, not all of them produce adults, some will develop as malformed or incompletely-eclosed puparia. In our study none of the malformed puparia produced adults three days after the first fly emerged from treated puparia. At 46 °C and 70 % mortality, from 400 initial larvae 121 (24.2×5) puparia were produced and 23 (4.6×5) developed to adults, meaning only 5.75 % emerged as adults and finally 377 larvae did not arise to adults, and this is scored as 279 dead larvae. At conditions near 100 % mortality (90 and 99 % mortality) less than 10 % of puparia were produced; they were malformed or incompletely-eclosed puparia and were unable to develop to adults. Therefore, at these conditions the percentage of dead larvae and puparia was 100 % as they did not develop to adults, and it is scored as 90 or 99 % of larval mortality.

The number of bottlenose puparia decreased as mortality percentage increased from 50 to 99 % at a constant temperature. Larviform malformation did not show the same tendency, except from 90 to 99 % mortality. There were not incompletely-eclosed puparia in controls. At 90 and 99 % mortality, we did not observe incompletely-eclosed puparia, except at 44 °C and 90 % mortality, where only one incompletely-eclosed puparium was found.

During heating in the block system, layers that form the puparium dried up and were abnormally constricted forming smaller layers leading to bottlenose puparia. When larvae survived the heat treatment, but did not reach entire metamorphosis, a hard outer layer was formed which characterizes the puparium stage producing larviform puparia. When metamorphosis of the larva is achieved and a part of its body remains inside the puparium, the fly is unable to break the layer of the puparium giving

Hansen y Sharp (1994) usaron los términos muertes aguda y crónica. La muerte aguda se caracteriza por la muerte de las larvas inmediatamente después del tratamiento y la muerte crónica se basa en el número de larvas incapaces de sobrevivir hasta la etapa adulta. La temperatura a la cual la muerte aguda se presenta se llama umbral de temperatura-mortalidad.

El desarrollo de pupas a partir de larvas sobrevivientes de *A. ludens* después del tratamiento térmico a 44, 46 y 48 °C se muestra en el Cuadro 3. El número de larvas muertas representó la muerte aguda, y la muerte crónica correspondió a pupas deformes (larviforme y con nariz de botella) y pupas con eclosión incompleta.

Las pupas normales tratadas emergieron con éxito como adultos. A cada temperatura, excepto por las comparaciones 0 vs. 0 y 0 vs. 0.2, todos los números de pupas normales tratadas fueron distintas. Las larvas de *A. ludens* tratadas usando un sistema de bloques de calentamiento mostraron muerte aguda y crónica a 44, 46 y 48 °C. El porcentaje de pupas con eclosión incompleta en el control fue bajo (menos de 1 %), en comparación con el de los tratamientos.

El número de pupas normales tratadas disminuyó continuamente mientras el número de pupas deformes (larviforme y con nariz de botella), en cada temperatura, aumentó de 30 a 50 % de mortalidad y después disminuyó conforme el tiempo de exposición incrementó. La frecuencia de pupas con nariz de botella fue mayor que la frecuencia de larviformes o con eclosión incompleta. Esto se puede deber a que el daño por calor evitó que las larvas completaran la metamorfosis. Después del tratamiento térmico, las larvas sobrevivientes forman pupas; sin embargo, no todas producen adultos, algunas se desarrollarán como pupas deformes o con eclosión incompleta. En nuestro estudio ninguna de las pupas deformes produjeron adultos tres días después de que la primera mosca emergió de las pupas tratadas. A 46 °C y 70 % de mortalidad, de 400 larvas iniciales se produjeron 121 (24.2×5) pupas y 23 (4.6×5) se desarrollaron en adultos, lo que significa que sólo 5.75 % emergieron como adultos y finalmente 377 larvas no surgieron como adultos, y esto se calificó como 279 larvas muertas. Con condiciones cercanas a 100 % de mortalidad (90 y 99 % de mortalidad), se produjeron menos de 10 % de las pupas; eran pupas deformes o con eclosión incompleta y fueron incapaces de desarrollarse en adultos. Por lo tanto, a estas condiciones

rise to incompletely-eclosed puparia. This could be attributed to heat affecting some morphological structures related to the locomotion efficiency of flies and the muscle contractions were insufficient for successful eclosion.

Eclosed adults by gender are shown in Figure 2. Adults from treated normal puparia emerged at least 24 h later than adults from control puparia and showed a normal physiological maturation. The amount of eclosed females was higher in the control at 44 and 46 °C. (Figure 2). Folk *et al.* (2006) found that females had higher survivorship, as they had more heat-shock proteins than males. There was no adult fly production when total puparia were less than 10 % of initial larvae. At temperature-time combinations where there was fly production, both males and females eclosed and means of adult males were higher ($p \leq 0.05$) for combinations of 44 °C, 70 % and 46 °C, 30 % mortality. The number of adult females and males was not different for all other treatments.

CONCLUSIONS

The thermal death kinetic model satisfactorily estimated the number of surviving third-instar *A. ludens* after heating in a block system at the studied sublethal temperature-time combinations. Therefore,

el porcentaje de larvas y pupas muertas fue 100 %, ya que no se desarrollaron en adultos, y se califica como 90 o 99 % de mortalidad de larvas.

El número de pupas con nariz de botella bajó conforme el porcentaje de mortalidad aumentó de 50 a 99 % a temperatura constante. La malformación larviforme no mostró la misma tendencia, excepto de 90 a 99 % de mortalidad. No hubo pupas con eclosión incompleta en los controles. A 90 y 99 % de mortalidad, no observamos pupas con eclosión incompleta, excepto a 44 °C y 90 % de mortalidad, donde sólo se encontró una pupa de eclosión incompleta.

Durante el calentamiento en el sistema de bloques, las capas que forman el pupario se secaron y se constriñeron de manera anormal formando capas más delgadas que originan la pupa nariz de botella. Cuando las larvas sobrevivieron el tratamiento térmico, pero no alcanzaron la metamorfosis entera, se formó una capa externa dura que caracteriza el estado de la pupa, produciendo pupas larviformes. Cuando la metamorfosis de la larva se alcanza y una parte de su cuerpo permanece dentro del pupario, la mosca es incapaz de romper la capa del pupario que da origen a las pupas con eclosión incompleta. Esto se puede atribuir a que el calor haya afectado algunas estructuras morfológicas relacionadas con la eficiencia en la locomoción de las moscas y que las contracciones musculares fueran insuficientes para una eclosión exitosa.

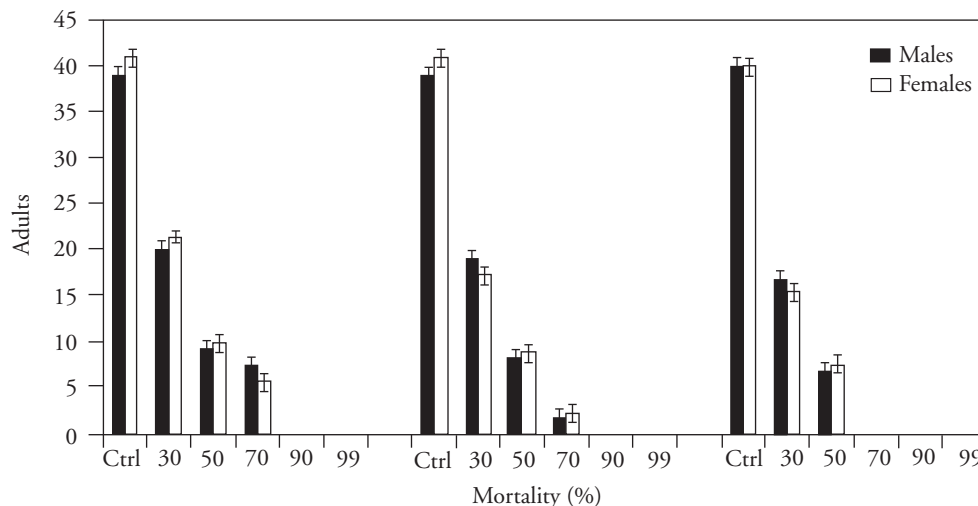


Figure 2. Eclosed adults by gender (*A. ludens*). Columns represent the mean of five replicates. Vertical bars indicate the HSD=1.43 adults (Tukey, $p \leq 0.05$).

Figura 2. Adultos eclosionados por género (*A. ludens*). Las columnas representan la media de cinco réplicas. Las barras verticales indican HSD=1.43 adultos (Tukey, $p \leq 0.05$).

at a selected temperature, the lethal time can be estimated from the thermal death kinetic model (and its appropriate parameter values) for a target sublethal mortality level.

The thermal susceptibility of larvae to temperature change is characterized by the z value and a significant advantage of this value is the ability to estimate the efficacy of a thermal treatment based on temperature histories in host fruits. Therefore, the lethality of a thermal treatment can be estimated from the obtained z value and temperature histories inside host commodities. This will facilitate successful development of thermal treatments for pest control.

Larviform, bottleneck, and incompletely-eclosed puparia were unable to produce adult flies. From treated normal puparia, male larvae were more tolerant to heat in two of the eight temperature-time combinations where there was fly production.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación [PROFAPI 2010/027]: Universidad Autónoma de Sinaloa.

LITERATURE CITED

- Abbott, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 265-267.
- Aluja, M., J. Guillen, G. De la Rosa, M. Cabrera, H. Celedonio, P. Liedo, and J. Hendrichs. 1987. Natural host plant survey of the economically important fruit flies (*Diptera: Tephritidae*) of Chiapas, Mexico. *Fla. Entomol.* 70: 329-338.
- Dominguez, J., T. Artiga-López, E. Solís, y E. Hernández. 2010. Métodos de Colonización y Cría Masiva. In: Montoya, P., J. Toledo, y E. Hernandez (eds). *Moscas de la Fruta: Fundamentos y Procedimientos para su Manejo*. S & G Editores, México D.F. pp: 259-276.
- Folk, D. G., P. Zwollo, D. M. Rand, and G. W. Gilchrist. 2006. Selection on knockdown performance in *Drosophila melanogaster* impacts thermotolerance and heat-shock response differently in females and males. *J. Exp. Biol.* 209: 3964-3973.
- Follet, P. A., and L. G. Neven. 2006. Current trends in quarantine entomology. *Annu. Rev. Entomol.* 51: 359-385.
- García-Ramírez, M. J., J. Cibrián-Tovar, R. Arzuff-Barrera, J. López-Collado, and M. Soto-Hernández. 2004. Preference of *Anastrepha ludens* (Loew) (Diptera: Tephritidae) to volatiles of green and yellow mango and orange fruits. *Agrociencia* 38: 423-430.
- Gazit, Y., Y. Rossler, S. Wang, J. Tang, and S. Lurie. 2004. Thermal death kinetics of egg and third instar Mediterranean fruit fly (*Diptera: Tephritidae*). *J. Econ. Entomol.* 97: 1540-1546.

Los adultos de pupas normales tratadas emergieron al menos 24 h más tarde que los adultos de las pupas testigo y mostraron una maduración fisiológica normal. La cantidad de hembras eclosionadas fue mayor en el testigo a 44 y 46 °C (Figura 2). Folk *et al.* (2006) encontraron que las hembras tuvieron una sobrevivencia mayor, ya que tenían más proteínas de choque térmico que los machos. No hubo producción de moscas adultas cuando las pupas totales fueron menos de 10 % de las larvas iniciales. Con combinaciones de temperatura y tiempo en las que hubo producción de moscas, tanto machos como hembras eclosionaron y las medias de los adultos machos fueron mayores ($p \leq 0.05$) para las combinaciones de 44 °C, 70 % y 46 °C, 30 % de mortalidad. El número de adultos hembras y machos no fue diferente para todos los otros tratamientos.

CONCLUSIONES

El modelo cinético de muerte térmica estimó satisfactoriamente el número de larvas de *A. ludens* del tercer estadio después del calentamiento en un sistema de bloques a las combinaciones de temperatura y tiempo subletales estudiadas. Por lo tanto, a una temperatura seleccionada, el tiempo letal puede estimarse a partir del modelo cinético de muerte térmica (y sus valores de los parámetros apropiados) para un nivel de mortalidad subletal específico.

La susceptibilidad térmica de las larvas al cambio de temperatura está caracterizada por el valor z y una ventaja significativa de este valor es la habilidad de estimar la eficacia de un tratamiento térmico basado en historias de temperatura en frutos hospederos. Por lo tanto, la letalidad de un tratamiento térmico puede estimarse a partir del valor z obtenido y de las historias de temperatura dentro de los productos hospederos. Esto facilitará el desarrollo exitoso de tratamientos térmicos para el control de plagas.

Las pupas larviformes, con nariz de botella y con eclosión incompleta no fueron capaces de producir moscas adultas. De las pupas normales tratadas, las larvas macho fueron más tolerantes al calor en dos de las ocho combinaciones de temperatura y tiempo en las que hubo producción de moscas.

—Fin de la versión en Español—



- Hallman, G. J., and D. L. Denlinger. 1998. Introduction: Temperature sensitivity and integrated pest management. *In*: Hallman, G. J., and D. L. Denlinger (eds). Temperature Sensitivity in Insects and Application in Integrated Pest Management. Westview Press, Boulder, CO. pp: 1-5.
- Hallman, G. J., S. Wang, and J. Tang. 2005. Reaction orders for thermal mortality of third instars of Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae). *J. Econ. Entomol.* 98: 1905-1910.
- Hansen, J. D., and J. L. Sharp. 1994. Thermal death in third instars of the Caribbean fruit fly (Diptera: Tephritidae): Temperature-time relationships. *J. Econ. Entomol.* 87: 736-740.
- Hernández, E., R. Mangan, S. Neck, P. Rivera, y J. Toledo. 2007. Mortalidad de *Anastrepha ludens* (Loew) (Diptera: Tephritidae) en mangos utilizando tratamiento hidrotérmico e hidrogenfriado. *Folia Entomol. Mex.* 46: 53-64.
- Ibañez-Palacios, J., A. Garcia-Velazquez, C. S. Zepeda-Cisneros, and T. Corona-Torres. 2010. Karyotype analysis and differentiation of sex chromosomes in four *Anastrepha* species (Diptera: Tephritidae). *Agrociencia* 44: 691-700.
- Ikediala, J. N., J. Tang, and T. Wig. 2000. A heating block system for studying thermal death kinetics of insect pest. *Trans ASAE.* 43: 351-358.
- Jang, E. B. 1996. Prospects for generic quarantine heat treatments in the Pacific region. *In*: Proceedings, Management of Fruit Flies in the Pacific. A regional symposium, Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, 28-31 October, Nadi, Fiji. pp: 256-258.
- Johnson, J. A., K. A. Valero, S. Wang, and J. Tang. 2004. Thermal death kinetics of red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae). *J. Econ. Entomol.* 97: 1868-1873.
- Mangan, R. L., K. C. Shellie, S. J. Ingle, and M. J. Firko. 1998. High temperature forced-air treatments with fixed time and temperature for 'Dancy' tangerines, 'Valencia' oranges, and 'Rio Star' grapefruit. *J. Econ. Entomol.* 91: 933-939.
- Matias-Hernandez, D. M., E. Hernandez-Ortiz, and L. C. Silva-Villarreal. 1998. Mortality of third instar *Anastrepha striata* by immersion in hot water as a function of exposure time and temperature. *Agrociencia* 32: 261-265.
- Message, G. M., and F. S. Zucoloto. 1989. Effect of some artificial diet on egg production by *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae). *Rev. Bras. Biol.* 49: 699-701.
- [NAPPO] North American Plant Protection Organization. 2010. Normas Regionales de la NAPPO sobre Medidas Fitosanitarias (NRMF). NRMF No. 34 Directrices para la elaboración de protocolos de tratamiento fitosanitario para artrópodos plagas de frutos o verduras frescas. Ottawa, Canada. 18 p.
- NOM-075-FITO-1997. Norma Oficial Mexicana. 1997. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Diario Oficial de la Federación, 16 Marzo 1998. México.
- Stevens, L. 1991. Manual of standard operating procedures (SOP) for the mass-rearing and sterilization of the Mexican fruit fly, *Anastrepha ludens* (Loew). USDA-APHIS, South Central Region, Mission Texas. 39 p.
- Thomas, D.B. 1985. Phenology of intra-pupal metamorphosis in horn fly and stable fly; a note on the diapause stage of the horn fly. *Southwest Entomol.* 10: 139-149.
- Thomas, D. B., and R. L. Mangan. 1995. Morbidity of the pupal stage of the Mexican and west Indian fruit flies (Diptera: Tephritidae) induced by hot-water immersion in the larval stage. *Fla. Entomol.* 78: 235- 246.
- [USDA-APHIS] United States Department of Agriculture - Animal and Plant Health Inspection Service. 2011. Plant Protection and Quarantine Treatment Manual. APHIS/PPQ. Frederick, MD.
- Wang, S., J. N. Ikediala, J. Tang, and J. D. Hansen. 2002. Thermal death kinetics and heating rate effects for fifth-instar *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Stored Prod. Res.* 38: 441-453.