



**AGRICULTURA**  
SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL



**SENASICA**  
SISTEMA NACIONAL DE SANIDAD VEGETAL

---

## **DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL**

---

**Dirección del Programa Nacional de Moscas de la Fruta**

### **MANUAL TÉCNICO PARA LAS OPERACIONES DE CAMPO DE LA CAMPAÑA NACIONAL CONTRA MOSCAS DE LA FRUTA**

#### **SECCIÓN IV: CONTROL BIOLÓGICO**

**Autorizó:**

**Ing. Francisco Ramírez y Ramírez  
El Director General de Sanidad Vegetal**

**Aprobó**

**M.C. Maritza Juárez Durán  
La Directora del Programa Nacional de Moscas de la Fruta**

**Elaboró:**

**Grupo Técnico del Programa Nacional de Moscas de la Fruta**

**Septiembre, 2019**





**CONTENIDO**

1.INTRODUCCIÓN	4
2. OBJETIVO	4
3. RECEPCIÓN, EMPAQUE Y LIBERACIÓN DE <i>DIACHASMIMORPHA LONGICAUDATA</i>	5
3.1 Materiales y equipo	5
3.2 Instalaciones	5
3.3 Procedimientos	5
3.3.1 Traslado y recepción de parasitoides	5
3.3.2 Empaque de pupas de parasitoides para su emergencia	6
3.3.3 Empaque de pupas de parasitoide en "Arturitos"	6
3.3.4 Mantenimiento del material biológico	7
3.4 Mantenimiento de adultos pre-liberación	7
3.5 Criterios para elegir las zonas de liberación	8
3.6 Liberación del parasitoide en campo	9
4. EVALUACIONES DE CAMPO POR MUESTREO DE FRUTOS	9
4.1 Materiales y equipo	9
4.2 Procedimiento	10
4.3 Tratamiento de la muestra en el laboratorio	11
4.3.1 Materiales y equipo	11
4.3.2 Procedimiento	11
4.4 Mantenimiento de estados inmaduros y emergencia	11
4.4.1 Materiales y equipo	12
4.4.2 Procedimiento	12
4.5 Cálculos de emergencia y parasitismo	13
4.5.1 Materiales y equipo	13
4.5.2 Procedimiento	13
5. CONTROL DE CALIDAD	14
5.1 Recepción del material biológico en el aeropuerto.	14
5.2 Recepción del material biológico en el Centro de Empaque	14
5.3 Muestreo	15
5.3.1 Materiales y equipo	15
5.3.2 Procedimiento y cálculo	15
5.4 Determinación del volumen de pupas por unidad de empaque	15
5.4.1 Materiales y equipo	15

Handwritten signatures and initials in blue ink on the right margin, including a large signature that spans across the table's right edge.



5.4.2 Procedimiento y cálculo	16
5.4.3 Reporte	17
5.5 Emergencia y proporción de sexos	17
5.5.1 Materiales y equipo	17
5.5.2 Procedimiento y cálculo	17
5.6 Longevidad sin agua y sin alimento (Inanición)	20
5.6.1 Materiales	20
5.6.2 Procedimiento y cálculo	20
5.6.3 Reporte	22
6. ANEXOS	23

*[Handwritten signatures and initials in blue ink]*



## 1. Introducción

El Control Biológico por Aumento (CBA), se define como aquella estrategia donde “un número muy grande de enemigos naturales son criados y liberados en periodos críticos para la supresión de poblaciones plaga a corto plazo”. Este tipo de control puede ser integrado junto con la Técnica del Insecto Estéril en programas que se desarrollen bajo el concepto de “área extensa”.

En el caso de México, el CBA es una de las estrategias empleadas por la Campaña Nacional contra Moscas de la Fruta para la supresión de poblaciones de moscas silvestres, su aplicación se basa en la cría masiva, empaque y liberación del parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata*, el cual ha demostrado una alta eficiencia en la reducción de poblaciones de moscas de la fruta del género *Anastrepha*, debido a su gran adaptabilidad a diversas condiciones climáticas, una respuesta funcional densodependiente, una capacidad de búsqueda y orientación que le permiten localizar a su huésped en diferentes circunstancias, así como una capacidad de discriminación que lo continúan posicionando como una especie de primera elección para programas de control biológico por aumento.

La aplicación exitosa del CBA requiere de dos requisitos fundamentales. El primero es el establecimiento de la cría masiva de la especie a liberar, la cual debe proporcionar individuos altamente competitivos a costos razonables. El segundo requisito corresponde al desarrollo de las metodologías de empaque de estos insectos y de su liberación en campo, las cuales deben garantizar el mantenimiento de sus atributos y el desempeño óptimo de los mismos una vez que sean liberados.

## 2. Objetivo

Presentar la metodología que llevará a cabo el personal técnico de los Organismos Auxiliares de Sanidad Vegetal para la recepción, empaque y liberación del parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata*.

**3. Recepción, Empaque y Liberación de *Diachasmimorpha longicaudata***

Una vez efectuada en laboratorio la cría masiva del parasitoide *D. longicaudata*, el material biológico en estado de pupa es enviado a los diferentes centros de empaque del país en donde bajo condiciones controladas se procede a realizar el empaque para su emergencia y posterior liberación en campo.

**3.1 Materiales y equipo**

Recepción	Empaque	Liberación
-Vehículo acondicionado para transporte de material biológico	-Charolas de plástico de 60 x 50 x 10 cm -Vaso de precipitado de 250 ml -Mesas de trabajo -Liberadores tipo "Arturito" -Bolsas de papel kraf No.20 con base reforzada KP 80-68 de 12x38cm -Almohadilla ó esponja -Rollo de papel de estraza de 58 x 33.6 x 24 cm -Papel higiénico sin aroma -Miel de abeja -Gel insecticida -Placa de plástico o cartón plegado -Báscula -Timer para control de fotoperiodo -Datalogger para humedad y temperatura o higrómetro y termómetro -Refrigerador -Equipo de aire acondicionado	-Vehículo apropiado para zonas geográficas de liberación. -GPS -Mapas de las zonas de liberación

**3.2 Instalaciones**

Las instalaciones del centro de empaque preferentemente debe contar con las siguientes secciones: recepción, empaque de pupas, área de emergencia de adultos y control de calidad.

Las salas de emergencia deben proporcionar condiciones ambientales con rango de temperatura mínimo de 21°C y máximo de 26°C, con humedad relativa (HR) mínima de 65% y máxima de 75%. Es recomendable contar con una planta generadora de energía en caso de fallas en el suministro de energía eléctrica.

**3.3 Procedimientos****3.3.1 Traslado y recepción de parasitoides**

- a) La recepción del material biológico se realiza en la sala de entrega de envíos del aeropuerto o directamente en la planta de producción.
- b) El personal asignado a esta actividad deberá manejar las cajas con cuidado para evitar golpes y condiciones desfavorables como altas temperaturas y humedad por lluvia.

*[Handwritten signatures and initials in blue ink]*



- c) Las pupas de parasitoides deben trasladarse al centro de empaque en un vehículo con capacidad de mantener el rango de temperatura de 15-20° C y una humedad relativa de 50+60%.
- d) Se debe realizar una inspección de las cajas, reportando en el formato correspondiente (formato CBO1) el número de cajas recibidas, el número de bolsas tipo salchicha y el estado general en que éstas llegaron.

### 3.3.2 Empaque de pupas de parasitoides para su emergencia

Después de romper la hipoxia de la pupa, mediante la apertura de las bolsas, se inicia el empaque. Empleando para ello el siguiente procedimiento:

### 3.3.3 Empaque de pupas de parasitoide en "Arturitos"

- Por cada "Arturito" se coloca el volumen necesario de pupas, para tener en total de 10,000 pupas viables, de acuerdo al apartado de control de calidad (técnica de determinación de mililitros por unidad de empaque).
- En el interior del contenedor se colocan materiales que sirvan como áreas de reposo y apareamiento, tales como papel corrugado, tiras de plástico o cartón (Figura 1).
- Para alimentar a los adultos emergidos se aplica papel con miel, el cual se coloca en la malla de las ventanas del contenedor. Esta actividad se realiza desde el primer día de emergencia de los adultos hasta el día de la liberación y supervisando la disponibilidad del alimento diariamente.
- La hidratación constante de los parasitoides reduce la mortalidad, para lo cual se coloca una esponja en la tapa o parte superior del contenedor. La esponja se debe mantener húmeda todo el tiempo antes de la liberación de adultos.

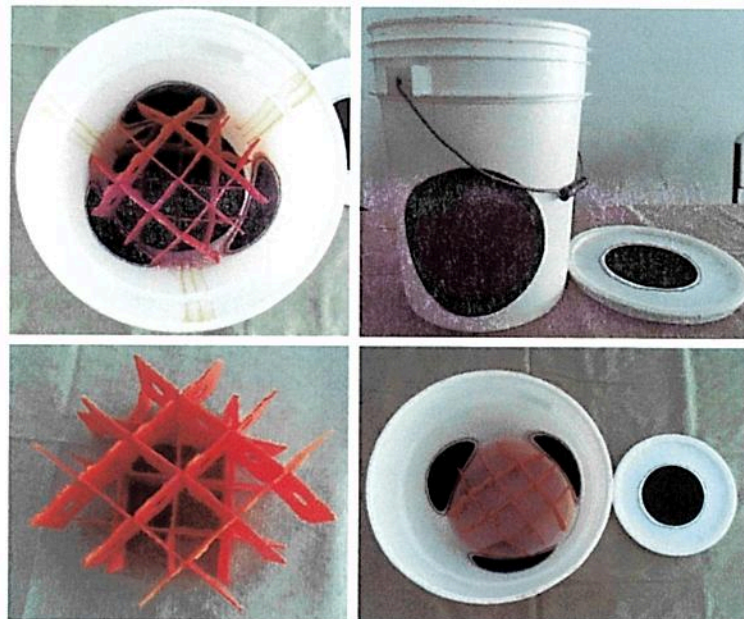


Figura 1. Interior y partes que conforman una unidad de empaque tipo "Arturito".

Handwritten signature and initials in blue ink.



### 3.3.4 Mantenimiento del material biológico

- Una vez que las pupas parasitadas se empacan, se trasladan al área de emergencia, la cual deberá contar con un fotoperiodo de 12:12 horas luz-obscuridad, una temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 1$  y  $70 \pm 5$  % de HR. La emergencia de adultos se cubre en un tiempo promedio de tres días, inicialmente emergen los machos, dos días después empiezan a emerger hembras (Figura 2).
- Posteriormente los contenedores deben ser movidos a la segunda sala de emergencia con temperatura de  $21 \pm 1^{\circ}\text{C}$  y empleando el mismo fotoperiodo de 12:12 horas luz-obscuridad. Durante esta segunda parte se cubre mayormente la emergencia y hay mayor probabilidad de cópula.
- La liberación en campo se lleva a cabo a los 7 días después del envío, cuando el mayor número de hembras haya emergido (no menos del 40% de adultos).
- Se coloca una etiqueta por anaquel (formato CBO2) para facilitar el orden de la liberación.



Figura 2. Traslado de unidades de empaque tipo "Arturito" a áreas de emergencia.

### 3.4 Mantenimiento de adultos pre-liberación

Durante el tiempo de emergencia del parasitoide se debe mantener una vigilancia y supervisión constante de las condiciones ambientales e incluir la revisión de las áreas para prevenir el ataque de hormigas y la fuga de adultos.

El proceso de emergencia del parasitoide después del empaque se resume en el Cuadro No. 1.

*[Handwritten signatures and marks in blue ink on the right margin]*

**Cuadro No. 1. Proceso de emergencia del parasitoide.**

Día 0	Recepción de la pupa y empaque
Día 1	Inicio de emergencia de machos
Día 2	Continúa la emergencia de machos
Día 3	Inicia la emergencia de hembras e inicio de cópulas
Día 4	Continúa la emergencia de hembras y cópulas
Día 5 o 6	Una vez que se alcanza el 40% de emergencia, se procede a la liberación al día siguiente

En caso de no alcanzar la emergencia indicada, al octavo día, se debe liberar el material disponible con el porcentaje de emergencia que se tenga, con el fin de evitar su desperdicio.

Por diferentes razones (desarrollo, fisiología, temperatura, etc.) es muy frecuente la variabilidad en los tiempos de emergencia del parasitoide, por lo cual es importante programar la liberación con base en la obtención de la mayor emergencia. Esto puede ser antes o después de los días mencionados en el Cuadro No.1. En consecuencia es recomendable apoyarse con las evaluaciones de emergencia para la liberación a fin de tomar esta decisión (Control de Calidad).

### **3.5 Criterios para elegir las zonas de liberación**

Antes de realizar la liberación del parasitoide en campo es necesario definir las zonas donde se llevará dicha actividad, a fin de que los individuos liberados reduzcan las poblaciones de moscas silvestres y en consecuencia se evite que la plaga se multiplique e invada áreas de hospederos comerciales, para ello, se recomienda dirigir las liberaciones en los siguientes lugares:

- a) Áreas con difícil acceso para implementar aspersiones aéreas, terrestres o de control mecánico a gran escala.
- b) Áreas marginales con hospederos silvestres de la plaga, donde los productores difícilmente implementarían acciones de control.
- c) Áreas con fruticultura orgánica, en las cuales el uso convencional de agroquímicos está sumamente restringido.
- d) Áreas y estaciones del año con altas precipitaciones, en donde sería poco eficiente un control químico aéreo o terrestre.
- e) Áreas urbanas cercanas a huertos comerciales.
- f) Huertos de traspatio.
- g) Huertos comerciales abandonados.
- h) Huertos que al final de la cosecha no se realiza ningún tipo de control.





### 3.6 Liberación del parasitoide en campo

- La liberación se realiza con base en un plan previo diseñado bajo principios técnicos, estableciendo áreas, puntos, cantidades y temporadas de liberación.
- Es conveniente que el personal que realice las liberaciones cuente con un mapa o GPS donde ubiquen los polígonos y bloques de liberación establecidos. Se recomienda emplear personal que conozca muy bien la zona.
- El proceso de liberación se inicia movilizándolo el material en las unidades de empaque mediante vehículos para llevarlos hasta los puntos de liberación. Esto se realiza en las primeras horas de la mañana.
- Se destapan los recipientes en los puntos de liberación o bien haciendo un recorrido con vehículo si el área lo permite, llevando los recipientes destapados (esto aplica para vehículos tipo pick up). El objetivo es cubrir la mayor parte del área del punto establecido. Si las condiciones del área no permiten el acceso de los vehículos, el desplazamiento se debe realizar a pie.
- Las pupas que no emergieron y quedaron en el fondo del recipiente, se colocan dentro de una bolsa papel kraft No. 20 abierta, la cual se deja en el campo para que los parasitoides tengan oportunidad de emerger posteriormente.
- El horario de liberación no debe exceder de las 11:00 a.m., para evitar mortalidad por altas temperaturas ambientales durante el traslado o la liberación.
- Es importante que se lleve un control y seguimiento del material liberado, para lo cual se deberá llenar el formato CBO3 que contiene los datos de: zona de liberación, superficie, puntos de liberación, "Arturitos" utilizados, cantidad de parasitoides liberados y fecha de liberación.

### 4. Evaluaciones de campo por muestreo de frutos

Mediante el muestreo de frutos se puede inferir el grado de infestación (número de larvas por fruto o el porcentaje de frutos con larvas) y el parasitismo. Se considera el paso básico para lograr obtener información certera acerca del efecto de las liberaciones de parasitoides.

#### 4.1 Materiales y equipo

**Materiales:** Bolsas de polietileno de 5 kg de capacidad  
Cuchillo de acero inoxidable  
Guantes de plástico  
Etiquetas

**Equipo:** Mapa o GPS  
Vehículo pick up apropiado para zonas geográficas de liberación

*[Handwritten signatures and marks on the right margin]*



#### 4.2 Procedimiento

- Identificación de la zona de muestreo. Inicialmente se deben analizar en el laboratorio dos aspectos importantes:
  - a) Conocer con ayuda de mapas y georreferenciadores la zona donde se llevará a cabo el muestreo, haciendo especial énfasis en el área de liberación.
  - b) Planificar el muestreo con base en las referencias previas (incluyendo datos históricos) y apoyándose en datos de trapeo de la zona. Lo anterior permite proponer una cantidad práctica de frutos a muestrear durante la estación correspondiente.
- Recolección de muestras
  - a) Colectar frutos de un punto de liberación considerando la cantidad recomendada en el párrafo de tamaño de muestra de este apartado. Los frutos serán recolectados del suelo y aquellos que presenten síntomas de estar infestados con larvas de tercer estadio.
  - b) Registrar los siguientes datos conforme a lo previsto en el formato CB04: fecha de colecta, lugar de colecta, especie y variedad de fruto, así como tipo de fruta.
- Tamaño de muestra. El número de frutos dependerá de su tamaño y el área de liberación. Los frutos hospedantes de moscas del género *Anastrepha* se pueden clasificar, desde el punto de vista práctico, en tres grupos.
  - a) Frutos pequeños: Se incluyen especies y variedades de frutas del género *Spondias* spp., guayabas de variedades pequeñas, caimito, etc. La muestra en este caso debe ser de 500 g a un kilogramo, lo cual incluye un número de alrededor de 20 a 30 frutos por muestra.
  - b) Frutos medianos: En este grupo se consideran a las guayabas de tamaño mediano, chicozapotes y mangos de variedades pequeñas, naranja, etc. Se recomienda una muestra de 3 a 5 kg, lo cual incluye de un número entre 10 a 20 frutos.
  - c) Frutos grandes: Frutos como mangos y chicozapotes de variedades grandes, toronja, mamey, etc. En este caso la muestra debe ser mayor de 5 kg, alrededor de 10 frutos.

Las muestras de frutos serán colocadas en bolsas de plástico para su traslado. Se clasifican en bolsas por especie o variedad de fruto, también se pueden hacer las separaciones con base en otros criterios (árbol, región, lugar de la toma de muestra, etc.), aunque es recomendable mantener la separación por especie o variedad de fruto. Las muestras se deben mantener en lugares frescos, evitando el calentamiento.

- Traslado de muestras. Se trasladarán lo más pronto posible a los laboratorios de disección. Para evitar mortalidad de larvas por sobrecalentamiento de las frutas, se recomienda emplear camionetas con aire acondicionado o en su defecto realizar esta actividad por la mañana y proteger las muestras del calor directo.



### 4.3 Tratamiento de la muestra en el laboratorio

El tratamiento de las muestras es el segundo paso obligatorio para asegurar que la información que se obtenga sea confiable. El principal parámetro que se pretende obtener después del tratamiento de las muestras es el grado de infestación de las frutas. Durante este procedimiento se deben tomar las mayores precauciones para evitar la mortalidad inicial de larva y posteriormente durante el proceso de desarrollo en forma de pupa.

#### 4.3.1 Materiales y equipo

**Materiales:** Arena fina o vermiculita fina grado I (suelo artificial)  
Pinzas entomológicas  
Pinzas de disección  
Cuchillo de acero inoxidable  
Charolas de disección  
Bolsas de polietileno de alta densidad de 5 kg de capacidad

**Equipo:** Balanza con capacidad para 10 kg.

#### 4.3.2 Procedimiento

- 1) Contar el número de frutos y pesar el total de la muestra, los datos obtenidos, así como los de identificación de cada muestra se registran en el formato CB05. Los datos de importancia son: Especie y variedad de fruto, fecha de colecta, lugar de colecta, número de frutos y peso de frutos.
- 2) Disectar en laboratorio los frutos muestreados el mismo día de su colecta, para ello se cortará en pedazos el material vegetal con ayuda de un cuchillo sobre una charola.
- 3) Buscar con una pinza entomológica o pinza de disección las larvas de tercer estadio desarrolladas al interior de los frutos.
- 4) Contar y colocar las larvas colectadas en contenedores con vermiculita húmeda para continuar su desarrollo, registrar el número de larvas muertas o pupas encontradas. Se complementa el formato CB05 con los datos del número de larvas colectadas por muestra.

#### 4.4 Mantenimiento de estados inmaduros y emergencia

El desarrollo posterior de los estados inmaduros es un proceso que requiere cuidados especiales para poder obtener el mayor número de adultos emergidos. El porcentaje de emergencia de adultos (moscas o parasitoides) es el principal logro de esta parte. Un porcentaje de emergencia adecuado (40 - 60 %) permite cubrir la segunda parte de los objetivos del muestreo. Se puede considerar como la parte final del proceso de muestreo y de donde se pueden calcular parámetros importantes como el porcentaje de emergencia y el porcentaje de parasitismo.



#### 4.4.1 Materiales y equipo

**Materiales:** Contenedores cilíndricos de plástico de 7 cm de diámetro por 8 de alto con tapa de tela de organza.  
Vermiculita fina  
Atomizador de plástico de 500 ml  
Tamiz del No. 10  
Charola de disección

**Equipo:** Contador manual de tres dígitos

#### 4.4.2 Procedimiento

- Las larvas colectadas por disección de fruta son distribuidas en contenedores cilíndricos de plástico (7 x 8 cm) con una capa de vermiculita de 2 cm de grosor.
- Colocar las larvas en cada contenedor, los cuales se deben mantener organizados con la referencia del número de muestra de acuerdo al etiquetado previo.
- Etiquetar los contenedores de manera individual con los datos del número de muestra, fruto, número de larvas y fecha de disección.
- Colocar los contenedores a 26°C y 60-80% de H. R. El desarrollo de los estados inmaduros hasta la emergencia será variable lo cual dependerá de la especie en desarrollo. La mayor parte de las especies de moscas del género *Anastrepha* y el parasitoide *D. longicaudata* emergen entre 15 a 20 días después de la pupación del hospedante.
- Durante el desarrollo es necesario mantener húmeda la vermiculita mediante la aplicación de agua por medio de un atomizador hasta dejar un sustrato húmedo y homogenizado. En este proceso se debe evitar la formación de grumos que puede propiciar la formación de hongos y la consecuente mortalidad de las larvas o pupas en desarrollo.
- De acuerdo a los tiempos mencionados previamente, el día 14 después de la pupación del hospedante, se recomienda separar las pupas de la vermiculita con la ayuda de un tamiz No. 10. Las pupas se regresan al contenedor el cual se mantiene cerrado.
- Los adultos emergidos (moscas o parasitoides) deben permanecer en el contenedor cerrado una vez iniciada la emergencia. Debido a los diferentes tiempos de desarrollo, es necesario mantener los adultos sin agua y sin alimento por un tiempo de 10 días, para acelerar la mortalidad y poder contar los insectos emergidos con mayor facilidad.
- Cubierta la emergencia de adultos en cada recipiente, el contenido es vertido sobre una charola para contabilizar el número de moscas y parasitoides emergidos por sexo. Los datos se registran en el formato CBO6.



#### 4.5 Cálculos de emergencia y parasitismo

Los parámetros de emergencia y parasitismo son los principales indicadores obtenidos del procesamiento de las muestras colectadas en campo. Estos datos pueden ser útiles para realizar un análisis integral en donde se incluya el efecto de las liberaciones de *D. longicaudata* como un factor más de supresión de moscas en la región.

Con los resultados obtenidos se puede facilitar la toma de decisiones sobre la cantidad de parasitoides a liberar, el número representativo de muestras en campo, desarrollo de otras actividades aplicadas en el control de moscas en la región, etc.

##### 4.5.1 Materiales y equipo

Equipo: Computadora y calculadora

##### 4.5.2 Procedimiento

- Cálculo de parámetros
- a) Porcentaje de emergencia. El número total de adultos emergidos, incluyendo moscas y parasitoides es relacionado con el número de larvas y/o pupas obtenidos de cada muestra. Se aplica la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de emergencia} = \frac{(\text{Número de adultos emergidos}) (100)}{\text{Número de larvas} + \text{Número de pupas}}$$

El porcentaje de emergencia es muy variable, depende de muchos factores; sin embargo, un porcentaje entre el 60-80% se puede considerar como satisfactorio.

- b) Porcentaje de parasitismo. Los parasitoides emergidos son relacionados con el número total de adultos emergidos (la suma de moscas y parasitoides), con la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de parasitismo} = \frac{(\text{Número de parasitoides emergidos}) (100)}{\text{Número de moscas y parasitoides emergidos}}$$

El porcentaje de parasitismo es variable en los diferentes tipos de fruto, el grado de infestación y la temporada. No obstante, se considera que niveles superiores al 50% indican un efecto importante de los parasitoides sobre las poblaciones de moscas de la fruta.

- Registro de datos. Los datos se registran en el formato CB06. La información se puede representar de diferentes maneras: la relación entre el porcentaje de larvas por fruto y parasitismo, relación entre el porcentaje de fruta infestada y parasitismo, etc. De la misma manera los datos de emergencia y parasitismo se pueden clasificar por fruto, por período o por área.
- a) Tiempo de muestreo. Los muestreos se deben mantener todo el período de liberación y se debe extender por un período de un mes, después de finalizar la liberación de parasitoides.



b) Recomendaciones generales. La información generada debe ser archivada para poder crear un historial de estos parámetros. La información histórica del parasitismo en cada área es la herramienta más importante para llevar a cabo un buen análisis de los efectos de los parasitoides en la región.

## 5. Control de calidad

### 5.1 Recepción del material biológico en el aeropuerto.

El personal del Organismo Auxiliar de Sanidad Vegetal es el encargado de recibir las cajas con pupa de *D. longicaudata*, ya sea por parte de la agencia de carga en el aeropuerto o por medio de recepción terrestre. Las actividades a realizar posteriormente son:

1. Verificar la temperatura del 11% de las bolsas tipo salchicha recibidas en cada envío; este porcentaje establece la posibilidad de monitorear la temperatura de una bolsa salchicha, en caso de recibir únicamente una caja por envío de nueve salchichas.
2. La medición se realiza insertando un termómetro digital de vástago corto tanto en la parte superior como inferior de la bolsa tipo salchicha. Temperaturas menores a 24°C, se consideran aceptables.
3. Registrar las temperaturas por envío.
4. Trasladar el material biológico hacia el Centro de Empaque, en un vehículo equipado con aire acondicionado para proporcionar temperaturas entre 15 y 20°C.

### 5.2 Recepción del material biológico en el Centro de Empaque

La recepción del material biológico en los Centros de Empaque, se debe llevar a cabo de la siguiente manera:

1. Registrar la temperatura del interior de las bolsas tipo salchicha utilizando un termómetro digital de vástago.
2. Mantener un registro de las temperaturas por envío.
3. Verificar los datos del envío contenidos en la caja #1 de cada envío, referido en el Anexo B, formato CBO7. Este formato generado en la Planta Moscafrut especifica la calidad y la cantidad de la pupa enviada, así como la hora de inicio de hipoxia.
4. Abrir las bolsas tipo salchicha, registrar el término de la hipoxia.
5. Iniciar a la brevedad el empaque del material biológico. En caso de no ser posible el empaque inmediato, romper la hipoxia y mantener la pupa a 22±1°C, colocar la pupa en charolas de plástico de 60 x 50 x 10 centímetros, con una capa máxima de pupa de 3 centímetros de grosor, proceder al empaque antes de que inicie la emergencia.
6. Durante el empaque, el área deberá mantenerse a 24±1°C y 75±5% de humedad relativa. Para registrar las condiciones ambientales se puede hacer uso de un equipo Datalogger de temperatura y humedad en el cuarto de empaque.



### 5.3 Muestreo

#### 5.3.1 Materiales y equipo

Materiales: Vaso de precipitado de plástico de 1 L.  
Cuchara para muestreo  
Abatelengua

#### 5.3.2 Procedimiento y cálculo

- El muestreo debe realizarse al azar en el 11% de las bolsas tipo salchicha recibidas, este porcentaje indica la posibilidad de muestrear una bolsa salchicha en caso de recibir una caja por envío (de nueve salchichas); sin embargo, el porcentaje debe estar en función de la cantidad de material recibido y a la precisión que se requiera en cada caso.
- La muestra debe ser representativa del lote recibido, homogénea y al azar, para lo cual se procederá a abrir la bolsa salchicha de manera longitudinal, de extremo a extremo (Figura 3); y se tomará la muestra tanto de la parte superior como de la inferior, además de las partes extremas y del centro de la bolsa, al abrir la bolsa se debe romper solamente el plástico evitando al máximo el daño a la pupa cercana a abertura.
- Obtener una muestra de 500 ml de pupas por envío.



Figura 3. Muestreo de pupas en bolsas tipo salchicha

#### 5.4 Determinación del volumen de pupas por unidad de empaque

El resultado se utiliza para asegurar que cada unidad de empaque (contenedor tipo "Arturito") contenga un volumen de pupas viables necesarias para obtener la cantidad adecuada de adultos por recipiente.

##### 5.4.1 Materiales y equipo

Materiales: Vaso de precipitado de 1 L  
Probeta graduada de plástico de 500 ml

Equipo: Balanza semianalítica

*[Handwritten signatures and marks in blue ink on the right margin]*



**5.4.2 Procedimiento y cálculo**

a) Contenedores "Arturitos"

- Obtener una muestra de acuerdo a lo descrito en el punto 5.3 de este manual.
- Debido a la presencia de vermiculita número III con porcentaje de granulometría de 77% (tamiz #4, 6 y 9 ASTM), es necesario considerar el volumen que representa la vermiculita en la muestra. Para descontar la vermiculita presente en la muestra de pupas del parasitoide, se mide 100 ml, se separan las pupas de la vermiculita y se pesan ambos.

Pupa	22.65 g
Vermiculita número III	3.39 g
Total	26.04 g

- Del peso total obtenido, determinar el porcentaje en peso que le corresponde a la vermiculita y a la pupa.

Pupa	86.98
Vermiculita	13.02

- Para determinar la cantidad de pupas que se deben colocar por unidad de empaque, se procede de la siguiente manera:

En cada contenedor tipo "Arturito" se colocarán 10,000 pupas viables, las cuales se distribuyen en el fondo del recipiente. Por lo tanto, para determinar la cantidad de pupas, consideraremos como ejemplo que de la mezcla recibida se obtuvo 75% de viabilidad, el dato de viabilidad se obtendrá del formato CB07 enviado por la Planta Moscafrut. Así tenemos que:

$$\text{No. de pupas por contenedor} = \frac{10,000 \times 100}{75} = 13,333$$

- Si consideramos que la mezcla se recibió con 75,529 pupas por kilogramo, mediante la regla simple de tres, tenemos:

75,529 pupas	1,000 g	x = 176.53 g
13,333 pupas	x	

- Mediante la regla de tres simple tenemos:

176.53 g	100.00 %	x = 22.98 g
x	13.02 %	

- Se suman 176.53 g + 22.98 g = 199.51 g, se redondea al inmediato superior (200 g) y se pesa esta cantidad de material biológico (pupa + vermiculita, como fue recibido).
- Una vez pesada la cantidad de pupa requerida se mide en una probeta de 500 ml para obtener el volumen a utilizar (Figura 4).

*[Handwritten blue ink marks and signatures on the right margin]*



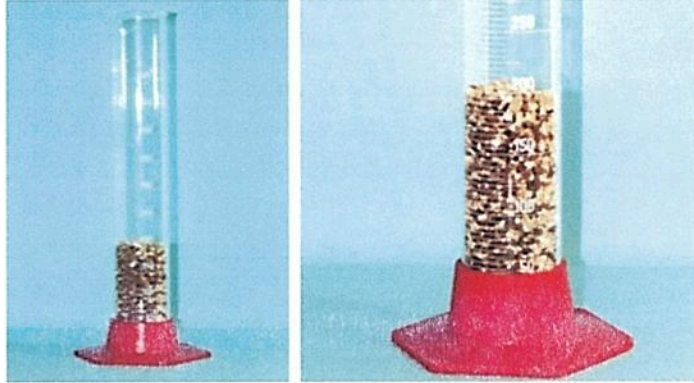


Figura 4. Determinación de peso y volumen

#### 5.4.3 Reporte

- Los resultados obtenidos se registran en el CB08 del Anexo B y se reportan a la DGSV y a la Planta Moscafrut vía Internet utilizando el formato CB01.

#### 5.5 Emergencia y proporción de sexos

Esta prueba aplica para decidir el momento adecuado de liberación, la emergencia total de parasitoides y la proporción de sexos.

##### 5.5.1 Materiales y equipo

Materiales: Vaso de precipitado de 1 L  
Celdillas (ver características en Anexo A)  
Cinta masking-tape de 2 pulgadas  
Contador manual

Equipo: Higrotermógrafo.

##### 5.5.2 Procedimiento y cálculo

La pupa del parasitoide *D. longicaudata* se envía a 48 horas para la emergencia, por lo que una vez empacado se espera que primero emerja el macho y dos días después la hembra, por lo cual la liberación debe realizarse dos días después de la emergencia de las hembras para asegurar el mayor número de cópulas posibles. En términos prácticos, se debe liberar el parasitoide en un tiempo promedio de siete días después de haberse empacado. Para la emergencia total del parasitoide se debe mantener las celdillas dos días más después de la liberación.

##### Procedimiento

- Obtener una muestra de acuerdo a lo descrito en el punto 5.3 de este manual.

Handwritten blue ink marks and signatures on the right margin of the page.



- Eliminar las impurezas y homogeneizar la muestra tomada, contabilizar cinco repeticiones de 100 pupas y colocar una pupa por cada compartimiento de celdillas (Figura 5), la muestra restante se retorna para su empaque.
- Trasladar las celdillas a las salas de emergencia, donde se tiene el material biológico empacado.

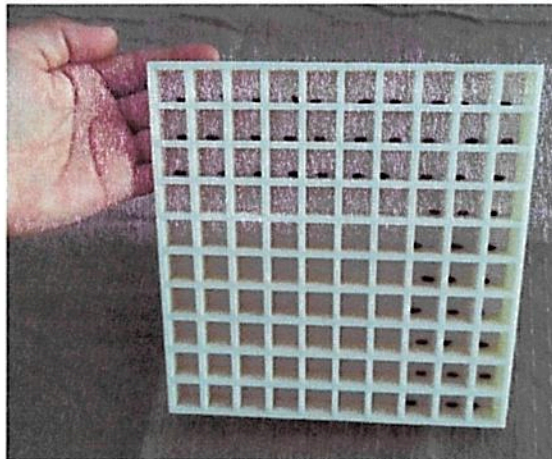


Figura 5. Colocación de pupas en celdillas

- A partir del cuarto día de haberse empacado las pupas parasitadas, se revisa diariamente la emergencia. Cuando se alcance como mínimo el 40% de emergencia, con una proporción mayor de hembras, se considera adecuado para liberar al siguiente día.
- En las salas de emergencia, se deben registrar permanentemente las condiciones ambientales (revisar mantenimiento del material de Empaque y Liberación). Los registros de las condiciones ambientales permiten detectar cualquier anomalía en la emergencia del material biológico y con anticipación, de ser necesario, reprogramar la fecha de liberación de los insectos.
- Dos días después de la liberación realizar la lectura de la emergencia total; si las emergencias son bajas se recomienda dejar la pupa no emergida para verificar si se debe a un atraso en la madurez de la pupa. Además contabilizar el número de hembras y machos presentes en cada celdilla.

**Cálculo**

- Emergencia para liberación = Número de machos + Número de hembras (Cuadro 2).

Cuadro No. 2. Calculo del porcentaje de emergencia del parasitoide.

Repetición	Cuarto día	Quinto día	Sexto día
01	13 ♂ + 3 ♀ = 16	15 ♂ + 15 ♀ = 30	15 ♂ + 24 ♀ = 39
02	11 ♂ + 5 ♀ = 16	17 ♂ + 18 ♀ = 35	17 ♂ + 23 ♀ = 40
03	14 ♂ + 3 ♀ = 17	14 ♂ + 16 ♀ = 30	14 ♂ + 23 ♀ = 37
04	10 ♂ + 4 ♀ = 14	16 ♂ + 13 ♀ = 29	16 ♂ + 27 ♀ = 43
05	15 ♂ + 2 ♀ = 17	14 ♂ + 15 ♀ = 29	15 ♂ + 25 ♀ = 40

Handwritten notes and signatures in blue ink on the right margin, including a large 'A' and several checkmarks.



- Se considera como el porcentaje de emergencia para liberación, el promedio obtenido de las cinco repeticiones, en este caso sería 40%, con lo cual se toma la decisión de iniciar la liberación de parasitoides.
- La proporción sexual y total de parasitoides emergidos, se obtiene promediando los resultados obtenidos en cada repetición (Cuadro 3):

Cuadro No. 3. Calculo de la proporción sexual del parasitoide.

Número de repetición	Número de hembras	Número de machos	Total de parasitoides emergidos	Relación M/H
01	44	19	63	1/2.32
02	48	15	63	1/3.20
03	42	26	68	1/1.62
04	40	30	70	1/1.33
05	47	20	67	1/2.35
Promedio			66.2	1/2.16

$$\text{Relación Macho: Hembra} = \frac{\text{Número de machos}}{\text{Número de hembras}}$$

- Por lo que, se asume que la proporción sexual es de 1 / 2.16, lo que significa que por cada macho se liberaron 2.16 hembras.

Reporte:

- Los resultados obtenidos se registran en el CB09 del Anexo B y se reportan a la DGSV y a la Planta Moscafrut vía correo electrónico en el formato CB01.

**NOTA IMPORTANTE:**

Los siguientes datos indican un porcentaje aceptable de emergencia total:

	Porcentaje promedio de emergencia	Desviación estándar
<i>Diachasmimorpha longicaudata</i>	51.41	8.78

Cuando los valores de emergencia sean inferiores a los antes referidos, el Coordinador Estatal de la Campaña Nacional contra Moscas de la Fruta deberá notificar esa situación a la Planta Moscafrut para su atención procedente.

Otro factor importante a considerar para interpretar los resultados obtenidos en esta prueba es el tiempo de hipoxia al que está expuesto el material biológico durante el proceso de traslado de la pupa desde la Planta Moscafrut al Centro de Empaque. En el Cuadro No. 4 se muestra el efecto de la hipoxia sobre la emergencia del parasitoide a diferentes temperaturas.

Cuadro 4. Porcentaje de emergencia de *D. longicaudata* a diferentes tiempos de hipoxia y distintas temperaturas.

Porcentaje de emergencia del Parasitoide	Temperatura °C	Tiempo de hipoxia (Hrs.)				
		6	12	24	48	72
15		70%	69%	67%	72%	70%
20		67%	65%	62%	64%	63%
25		65%	62%	59%	60%	50%

**5.6 Longevidad sin agua y sin alimento (Inanición)**

El resultado de esta prueba proporciona información sobre el tiempo de vida probable del insecto liberado en el campo, sin que haya obtenido agua ni alimento y además nos puede permitir inferir el intervalo de tiempo entre liberaciones.

**5.6.1 Materiales**

Materiales: Vaso de precipitado de plástico de 1 L  
Charola de plástico de 35 x 45 cm  
Celdillas (ver características en Anexo A)  
Abatelengua  
Contador manual

**5.6.2 Procedimiento y cálculo****Procedimiento:**

- Obtener una muestra de acuerdo a lo descrito en el punto 5.3 de este manual.
- Eliminar las impurezas y homogeneizar la muestra tomada, contabilizar cinco repeticiones de 100 pupas y colocar una pupa por cada compartimiento de celdillas. La muestra restante se retorna para su empaque.
- Revisar diariamente las celdillas, contabilizando y anotando en el formato CB10 del Anexo B el número de parasitoides emergidos y el número de parasitoides muertos; la prueba termina cuando exista el 50% de mortalidad del total de adultos emergidos (Figura 6).

Handwritten notes and signatures in blue ink on the right margin, including a large 'A' and several checkmarks.

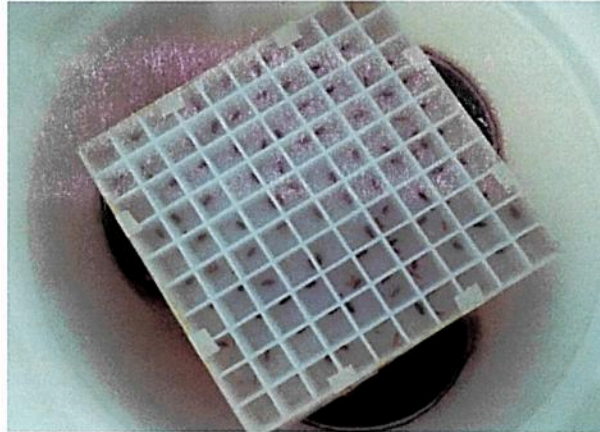


Figura 6. Cálculo de longevidad de parasitoides

**Cálculo**

**Tiempo a la emergencia:**

- El tiempo a la emergencia es el periodo desde que se rompe la hipoxia del material biológico hasta que se obtiene el 50% de emergencia.

Considerando un ejemplo, tenemos:

- Si la emergencia total (100%) es de 73 parasitoides, entonces el 36.50 de parasitoides representa el 50%; toda vez que para fines prácticos, se redondea al número inmediato inferior, por lo tanto, 36 parasitoides representará el 50% de emergencia.
- Para obtener la fecha y la hora en la que emergió el 50% de parasitoides, obtenemos del formato CB10 la siguiente información:

	Hora de lectura	de	Parasitoides emergidos
Inicio de prueba (Ruptura de la hipoxia)	08:00		0
Día uno	08:00		1
Día dos	08:00		4
Día tres	08:00		10
Día cuatro	07:00		38

- Por lo tanto el 50% de emergencia (36 parasitoides) lo obtendremos entre el día tres y el día cuatro. El día tres a las 08:00 horas habían emergido 10 parasitoides y el día cuatro a las 07:00 horas había 38 parasitoides emergidos.
- Para realizar el cálculo se debe solicitar la hoja electrónica para la medición de tiempo a la emergencia al Departamento de Control de Calidad de la Planta Moscafrut. Este

Handwritten blue ink marks and signatures on the right side of the page, including a large 'A' and several smaller marks.



formato electrónico está programado para que de manera automática se obtengan los resultados.

**Tiempo de longevidad sin agua y sin alimento**

- La longevidad es el periodo que sobrevive el insecto desde que emergió el 50% de los parasitoides hasta que se presenta el 50% de mortalidad.
- Siguiendo el ejemplo anterior, para obtener la fecha y la hora del 50% de mortalidad, consideremos que si la emergencia total (100%) 73 parasitoides, entonces el 36.50 de parasitoides representa el 50%; toda vez que para fines prácticos, se redondea al número inmediato inferior, por lo tanto, 36 parasitoides representará el 50% de mortalidad.
- Del formato CB10 obtenemos la siguiente información:

	Hora de lectura	Número de parasitoides muertos
Inicio de prueba (Ruptura de la hipoxia)	08:00	0
Día uno	08:00	0
Día dos	08:00	0
Día tres	08:00	0
Día cuatro	07:00	1
Día cinco	08:00	1
Día seis	08:00	1

	Hora de lectura	Número de parasitoides muertos
Día siete	08:00	2
Día ocho	08:00	3
Día nueve	08:00	5
Día diez	08:00	11
Día once	08:00	18
Día doce	08:00	33
Día trece	08:00	47

- Por lo tanto, el 50% de mortalidad (36 parasitoides) lo obtendremos entre el día doce y el día trece. El día doce a las 08:00 horas había 33 parasitoides muertos y el día trece a las 08:00 horas había 47 parasitoides muertos.
- Para realizar el cálculo se debe solicitar la hoja electrónica para la medición de tiempo de longevidad del parasitoide al Departamento de Control de Calidad de la Planta Moscafrut. Este formato electrónico está programado para que de manera automática se obtengan los resultados.

**5.6.3 Reporte**

- Los resultados obtenidos se registran en el CB10 del Anexo B y se reportan a la DGSV y a la Planta Moscafrut vía correo electrónico utilizando el formato CB01.

*[Handwritten signatures and marks in blue ink on the right side of the page]*



## 6. Anexos

### Anexo A. Materiales

#### Contenedores tipo "Arturito"

Bote de plástico con tapa de 20 litros de capacidad, con tres ventanas laterales circulares opuesta la una de la otra, cada una de 20 cm de diámetro para mantener la ventilación dentro del contenedor, las cuales se cubren con malla mosquitera de fibra de vidrio pesada, color gris de 1.5 milímetros de luz; la tapa del bote debe tener un corte circular de 15 cm de diámetro, el cual estará cubierto con el mismo tipo de malla que las ventanas laterales (Figura 7).

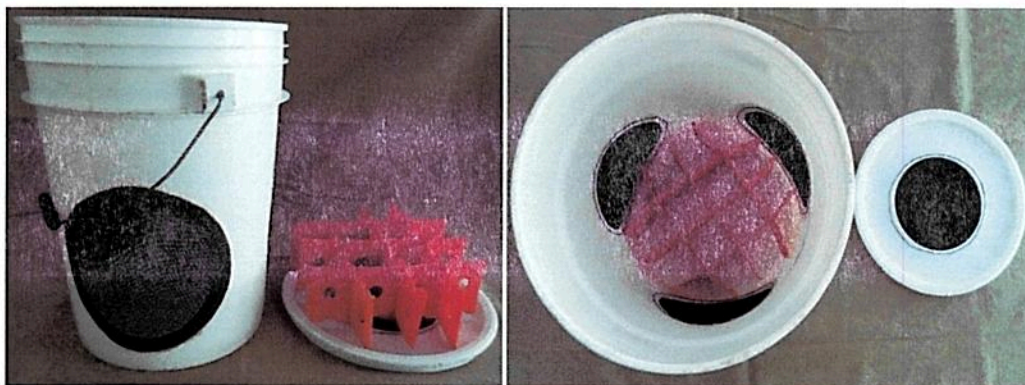


Figura 7. Unidad de empaque tipo "Arturito"

#### Alimento del parasitoide:

- a) Elaborar una mezcla con miel de abeja y papel higiénico: Cortar o desmenuzar el papel en trozos pequeños (Figura 8), colocar una capa de papel en el fondo de un recipiente y cubrir con miel, alternar de esta manera capas de papel y miel, hasta completar la cantidad requerida a una proporción 1 litro de miel por 1 rollo de papel higiénico (Figura 9), mezclar ambos ingredientes en una batidora o bien de forma manual hasta obtener una mezcla de consistencia pastosa y homogénea (Figuras 10 y 11) y conservar a temperatura ambiente en recipientes tapados (se puede conservar en refrigeración). Cuando la miel no sea espesa, se podrá usar una proporción de un litro por dos rollos de papel.



Figura 8

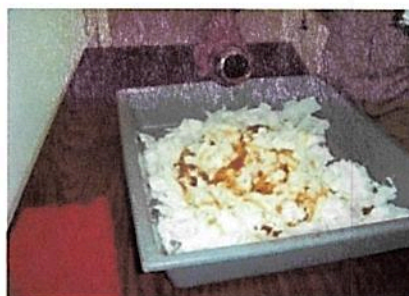


Figura 9

Handwritten blue ink marks on the right margin, including a large checkmark and several smaller symbols.



Figura 10



Figura 11

b) Elaboración de mezcla de miel: Se mezcla la miel cristalizada con miel líquida en una proporción de 1:1 (Figuras 12 y 13) hasta obtener una mezcla de consistencia pastosa y homogénea (Figura 14), mantener en refrigeración por 20 días, después se puede conservar a temperatura ambiente en recipientes tapados.



Figura 12

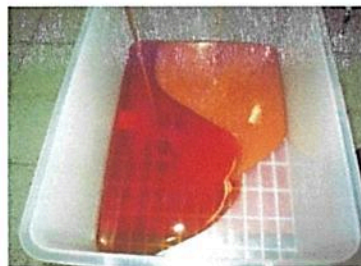


Figura 13



Figura 14

**Celdillas:** consisten en rejillas cuadradas de plástico que se construyen con rejilux de  $\frac{1}{2} \times \frac{1}{2} \times \frac{1}{2}$  pulgadas utilizado como base en las lámparas fluorescentes de techo, se corta en tramos de 10 x 10 celdas, se pega la base de acrílico blanco opaco (16 x 16 cm) con pegamento liquido de resina sintética y para taparla se utiliza una hoja de acrílico transparente (16 x 16 cm), la cual es asegurada con cinta masking tape durante las evaluaciones (Figuras 15 y 16).

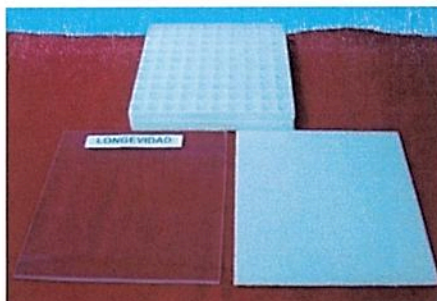


Figura 15

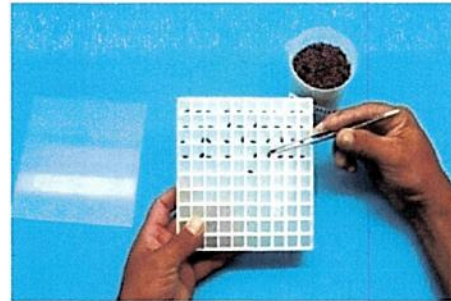


Figura 16

Handwritten blue scribbles and lines on the right margin.









**Formato CB02. Registro de pupa empacada**

Número de anaquel	Número de unidades empacadas	Número de pupas	Fecha de envío	Fecha de probable emergencia	Fecha de liberación	Zona de liberación

**Formato CB03. Control y seguimiento del material liberado**

Fecha de envío	Fecha de liberación	Número de unidades de empaque	Cantidad de parasitoides liberados	Zona de liberación	Superficie	Puntos de liberación

**Formato CB04. Registro de muestras colectadas**

No. de muestra	Fecha de colecta	Lugar de colecta	Especie de Fruto	Variedad de fruto	No. de frutos	Peso de frutos

*[Handwritten signatures and marks in blue ink on the right margin]*



**Formato CB05. Registro de larvas obtenidas de los frutos**

No. de muestra	Fecha de colecta	Fruto	No. de frutos	Peso de frutos	Larvas colectadas	Pupas colectadas	Larvas + pupas/fruta	Larvas + pupas /Kg de fruta

**Formato CB06. Registro de emergencia de adultos**

No. de muestra	Fruto	No. de larvas + pupas colectadas	Emergencia de moscas				Emergencia de parasitoides				% Emergencia	% Parasitismo
			Hembra	Macho	Total	Prop. sexual	Hembra	Macho	Total	Prop. sexual		

Handwritten signatures and initials in blue ink on the right margin of the page.



**Formato CB07. Hoja de envío del material biológico**

**MOSCAFRUT**

Planta productora de moscas de la fruta  
estériles y parasitoides

Módulo de producción de *Diachasmimorpha longicaudata*

**Envío de pupas a los estados**

Hipoxia		
	Fecha	Hora
Inicio		
Final		

Envío	
Fecha	
Número	
Destino	

Fecha de exposición	Pupación a las 72 hrs.	Fecha de emergencia	Kilogramos de pupas	Pupas por Kilogramo	Cantidad de pupa	Pupa viable (%)	Peso de pupa (mg)	Observaciones

Total de envío	Kilogramos	Millones de pupas
----------------	------------	-------------------

No. de cajas: \_\_\_\_\_

No. de salchichas: \_\_\_\_\_

Responsable de producción

Control de calidad

Responsable de envíos

Si se presenta algún problema con el material biológico, favor de comunicarse al teléfono 01 (962) 643 50 29, 3 50 30 Ext. 129. Departamento de Control de Calidad; Metapa de Domínguez, Chiapas, México.

*[Handwritten signatures and marks on the right side of the page]*



**Formato CB08. Mililitros por unidad de empaque**

Fecha de envío	Fecha de recepción	No. de envío		Peso (gr)	Porcentaje
			Vermiculita III		
			Pupa		
			<b>Total</b>		100

Pupas viables por método de empaque	Porcentaje de viabilidad	Peso de pupa (mg)	Pupas por kilogramo	gr. para empaque	ml. para empaque

**Formato CB09. Emergencia para liberación, emergencia total y proporción de sexos**

Fecha de envío	Fecha de recepción	No. de envío	No. de recepción	Emergencia para liberación									Emergencia total (2 días después de la liberación) (%)	Proporción de sexos		
				Cuarto día			Quinto día			Sexto día				No. de machos	No. de hembras	Proporción sexual
				No. de machos	No. de hembras	Emergencia (%)	No. de machos	No. de hembras	Emergencia (%)	No. de machos	No. de hembras	Emergencia (%)				
			1													
			2													
			3													
			4													
			5													
			Promedio													

*[Handwritten signatures and marks]*



**Formato CB10. Longevidad sin agua y sin alimento (Inanición)**

Especie: <i>D. longicaudata</i>
Fecha de envío:
Fecha de recepción:

Fin de la hipoxia (día):
Fin de la hipoxia (hora):

	Fecha	Hora
No. de celdilla	No. de parasitoides emergidos	No. de parasitoides muertos
01		
02		
03		
04		
05		
Suma		

	Fecha	Hora
No. de celdilla	No. de parasitoides emergidos	No. de parasitoides muertos
01		
02		
03		
04		
05		
Suma		

	Fecha	Hora
No. de celdilla	No. de parasitoides emergidos	No. de parasitoides muertos
01		
02		
03		
04		
05		
Suma		

	Fecha	Hora
No. de celdilla	No. de parasitoides emergidos	No. de parasitoides muertos
01		
02		
03		
04		
05		
Suma		

	Fecha	Hora
No. de celdilla	No. de parasitoides emergidos	No. de parasitoides muertos
01		
02		
03		
04		
05		
Suma		

	Fecha	Hora
No. de celdilla	No. de parasitoides emergidos	No. de parasitoides muertos
01		
02		
03		
04		
05		
Suma		

	Fecha	Hora
No. de celdilla	No. de parasitoides emergidos	No. de parasitoides muertos
01		
02		
03		
04		
05		
Suma		

	Fecha	Hora
No. de celdilla	No. de parasitoides emergidos	No. de parasitoides muertos
01		
02		
03		
04		
05		
Suma		

	Fecha	Hora
No. de celdilla	No. de parasitoides emergidos	No. de parasitoides muertos
01		
02		
03		
04		
05		
Suma		

	Fecha	Hora
50% de parasitoides emergidos:		
50% de parasitoides muertos:		
Longevidad sin agua y sin alimento (horas)		
Tiempo a la emergencia (horas)		

*[Handwritten signatures and marks]*



### Anexo C: Bibliografía

- Cancino J., L. Ruíz, P. López & F. de Ma. Moreno. 2010. Cría Masiva de Parasitoides. pp. 291-306. En Montoya P., J. Toledo y E. Hernández (eds.), Moscas de la Fruta: Fundamentos y Procedimientos para su Manejo. S y G editores, México, D. F.
- Cancino, J., López, P., Villalobos, P., Hipólito, P., Quintero, L., and Mattiacci, L. 2006. Control de calidad en la cría masiva de *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae). SAGARPA-SENASICA-DGSV, México, D. F. p. 54.
- Cancino, J., Gálvez, F., López, P., Moreno, F. y Montoya P. 2012. Evaluación de los métodos de empaque para envío y empaque para liberación del parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata*. Reportes de avances, Metapa de Domínguez, Chiapas. Págs. 25-29.
- Montoya, P., Cancino, J., and Ruiz, L. 2012. Packing of Fruit Fly Parasitoids for Augmentative Releases. *Insects* 3(3):889-899.
- Montoya, P. y Toledo, J. 2010. Estrategias de Control Biológico. pp. 169-182. En Montoya P., J. Toledo y E. Hernández (eds.), Moscas de la Fruta: Fundamentos y Procedimientos para su Manejo. S y G editores, México, D. F.
- Montoya, P., Cancino, J., Zenil, M., Santiago, G., and Gutiérrez, J. M. 2007. The augmentative biological control component in the Mexican National Campaign against *Anastrepha* spp. fruit flies. In "Vireysen, M. J. B., Robinso, A. S. and Hendrichs, J. (Edits.) Area-wide control of insect pest". Springer, Netherlands. Pags.: 661- 670.
- Montoya, P. 2007. Control biológico por aumento en el Manejo Integrado de Moscas de la Fruta. En: V. Hernández-Ortiz (Ed.), Moscas de la Fruta en Latinoamérica (Diptera: Tephritidae): Diversidad, biología y manejo. S y G Editores, México, distrito Federal, México. Pp: 145-156.
- Montoya, P. y Cancino. J. 2004. Control Biológico por Aumento en Moscas de la Fruta (Diptera: Tephritidae). *Folia Entomológica Mexicana*. 43(3): 257-270.

Handwritten signatures and marks in blue ink on the right margin of the page.