

OPTIMIZACIÓN DE LA CRÍA DE *Galleria mellonella* (L.) PARA LA PRODUCCIÓN DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS PARÁSITOS DE LA BROCA DEL CAFÉ¹

Francisco J. Realpe-Aranda*; Alex E. Bustillo-Pardey**; Juan Carlos López-Núñez**

RESUMEN

REALPE A., F. J.; BUSTILLO P., A. E.; LÓPEZ N., J. C. Optimización de la cría de *Galleria mellonella* (L.) para la producción de nematodos entomopatógenos parásitos de la broca del café. *Cenicafé* 58(2):142-157. 2007.

Este estudio tuvo como objetivo optimizar un sistema de cría de larvas de *Galleria mellonella* para la producción masiva de los entomonematodos *Steinernema colombiense* y *Heterorhabditis bacteriophora*. Los resultados mostraron que el ciclo de vida de *G. mellonella* es menor a medida que se incrementa la temperatura. El promedio del ciclo de huevo a adulto fue de 178, 82 y 62 días a 20, 25 y 30°C, respectivamente. La mayor mortalidad de *G. mellonella* (71,5%) ocurrió en el estado larvario. La temperatura de laboratorio más apropiada para criar *G. mellonella* es 25°C. La tasa de oviposición se evaluó bajo cuatro densidades de parejas de polillas (50, 100, 150 y 200) en jaulas cúbicas de 50cm de lado, y se encontró que la oviposición aumenta cuando se incrementa la densidad hasta 150 polillas, con las cuales se registró la mayor cantidad de huevos (60.612) y la tasa de oviposición más alta. La densidad de huevos con que se obtiene el mayor número de larvas de *G. mellonella* con menor mortalidad es de 300 huevos/300g de dieta. La producción acumulada de juveniles infectivos de los entomonematodos utilizando la trampa White modificada fue de 86.250 juveniles infectivos/larva para *S. colombiense* y 78.750 IJ/larva para *H. bacteriophora*. Al almacenar los entomonematodos en agua destilada estéril a 10±2°C durante tres meses, se observaron reducciones de la viabilidad del 53% para *S. colombiense* y del 98% para *H. bacteriophora*.

Palabras clave: *Steinernema colombiense*, *Heterorhabditis bacteriophora*, producción *in vivo*, ciclo de vida, mortalidad.

ABSTRACT

This research is intended to optimize a breeding system of *Galleria mellonella* larvae for the mass production of the entomonematodes *Steinernema colombiense* and *Heterorhabditis bacteriophora*. The results showed that the life cycle of *G. mellonella* is shorter as temperature increases. The average cycle from egg to adult was 178, 82 and 62 days at 20, 25 and 30°C, respectively. The highest mortality of *G. mellonella* (71.5%) occurred in the larval stage. The most appropriate laboratory temperature to rear *G. mellonella* is 25°C. The oviposition rate was evaluated under four densities of moth couples: (50, 100, 150 and 200) in cubic cages of 50cm long. It was found that oviposition increases when density increases up to 150 moths; at this density the insect produced the highest number of eggs (60,612) as well as the highest oviposition rate. The egg density utilized to obtain the highest number of *G. mellonella* larvae with the lowest mortality was 300 eggs/300 grams of diet. The accumulated production of infective entomonematodes juveniles using the modified White trap was 86,250 infective juveniles / larva for *S. colombiense* and 78,750 IJ / larva for *H. bacteriophora*. When the entomonematodes were stored in distilled sterile water at 10±2°C during three months, viability reductions of 53% were observed for *S. colombiense* and 98% for *H. bacteriophora*.

Keywords: *Steinernema colombiense*, *Heterorhabditis bacteriophora*, *in vivo* production, life cycle, mortality.

¹ Fragmento de la tesis "Producción de dos especies de entomonematodos, parásitos de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) en larvas de *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae)" presentada por el primer autor a la Universidad de Nariño para optar al título de Ingeniero Agrónomo.

* Ingeniero Agrónomo, Universidad de Nariño.

** Investigador Principal e Investigador Científico I. Entomología. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Chinchiná, Caldas, Colombia.

La broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari), es la plaga más importante que afecta el café en Colombia. Hace el daño al atacar la cereza y reproducirse internamente en el endospermo, y finalmente causa la pérdida total del grano y demerita la calidad del producto final (6). Los frutos infestados que se dejan en el lote y los que caen al suelo después de la cosecha, constituyen un problema muy serio por las reinfestaciones que generan en la próxima cosecha (7, 8, 10). Debido a esta condición de la broca, de estar presente en frutos que se encuentran en el suelo, se ha considerado que los nematodos entomopatógenos, por sus hábitos crípticos y por ser el suelo su hábitat natural, podrían jugar un papel importante en la reducción de las poblaciones de *H. hampei*.

Hasta el momento solo se tienen dos registros de nematodos con diferentes asociaciones sobre insectos (parásitos de invertebrados y vida libre) (49), que afectan naturalmente a la broca. El primero fue en India, donde Varaprasad *et al.* (51) encontraron especímenes de *Panagrolaimus* sp. (Panagrolaimidae) infectando adultos de *H. hampei* y el segundo en México, en Cacahoatán (Chiapas), en frutos provenientes del suelo de un cafetal se registró una especie no descrita, *Sphaerulariopsis* sp. (Thylenchida: Sphaerularioidea) (11, 12), la cual finalmente se describió como una nueva especie *Methaparasitilenchus hypothenemi* (Allantonematidae) (42), que parasita hembras de *H. hampei*. En Colombia, no se ha registrado en forma natural algún nematodo atacando broca (9).

Las observaciones del efecto de entomonematodos sobre la broca del café son escasas y se circunscriben a trabajos realizados en el laboratorio. Allard y Moore (1), mostraron la patogenicidad de *S. carpocapsae* "all strain" y *H. bacteriophora* sobre larvas y adultos de la broca. En México se demostró la patogenicidad de *S. glaseri*, *S. feltiae*,

S. carpocapsae y *H. bacteriophora*, sobre adultos de broca en confinamiento (13, 32). Sin embargo, en Latinoamérica son aún más escasas las investigaciones que muestren resultados que permitan recomendar el uso de entomonematodos para el control de insectos plaga.

En los últimos años, las investigaciones realizadas por Cenicafé se han dirigido a obtener información de especies nativas de los géneros *Steinernema colombiense* López y *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, (29, 31), sobre su virulencia, comportamiento, ciclo de vida y estrategias de búsqueda sobre la broca del café (27, 38, 39). Adicionalmente, el conocimiento sobre los sistemas de aplicación (24), para el control de broca con aplicaciones en mezcla con hongos entomopatógenos en el invernadero y en el campo, en pequeña escala (14, 21, 25), y el hallazgo de nuevas especies virulentas a la broca del café, aisladas del ecosistema cafetero (30), permiten considerarla como una promisoriosa herramienta biológica dentro del manejo integrado de la broca.

En el mundo existen más de 90 empresas dedicadas a la producción masiva de nematodos entomopatógenos, y es Estados Unidos el país que lidera su producción y comercialización (28), con un 68% de desarrollos tecnológicos en esta área del conocimiento.

Estos nematodos se producen masivamente bajo dos sistemas: *in vivo* e *in vitro* (23). En el primero se utilizan insectos vivos, fáciles de criar, altamente susceptibles al patógeno y que permitan aumentar la producción masiva. Este sistema se ha generalizado para la mayoría de las especies actualmente descritas, con larvas de *Galleria mellonella*, *Bombyx mori*, *Spodoptera frugiperda* y otros lepidópteros, con producciones de más de 300.000 nematodos por larva (5, 35, 37,

40, 44). Avances recientes han permitido automatizar dicho sistema (20). Mientras que el sistema *in vitro*, ya sea en cultivos semisólido o líquido, incorporan medios artificiales para la producción del nematodo. Los dos sistemas presentan tanto ventajas como desventajas. En términos generales, el sistema *in vivo* a diferencia del *in vitro* ofrece un producto final de mayor calidad, no requiere altas inversiones de capital en cuanto a infraestructura y experiencia técnica del personal encargado de la producción, lo que se traduce en bajos costos y fácil implementación, especialmente en países donde la mano de obra no es costosa (16). En cuanto al sistema *in vitro*, la mayor ventaja es que se obtienen altas cantidades de nematodos por unidad de producción (gramo o mililitro), lo que facilita la implementación industrial a gran escala; sin embargo, en muchos casos la calidad y eficacia del entomonematodo no es la más deseable (18, 19, 22, 53).

En Colombia no existen compañías o instituciones que produzcan masivamente estos entomonematodos, y mucho menos las especies de nematodos entomopatógenos parásitos de la broca del café. Por tanto, para poder utilizar estos nematodos entomopatógenos como agentes de control de la broca, debe mejorarse el proceso de producción masiva, con la utilización de un insecto hospedante fácil de criar bajo condiciones controladas como *Galleria mellonella* (5, 44). Así mismo, para obtener una cría eficiente de un insecto se requiere conocer su biología en función de la humedad y la temperatura, con el fin de establecer las condiciones óptimas para un proceso de producción masiva en el laboratorio. En esta forma puede determinarse la infraestructura necesaria, así como estimar las variables que permitan un proceso eficiente con una relación costo/beneficio favorable (34, 35, 37, 44, 48).

No obstante los avances en la producción masiva de entomonematodos bajo los procesos de producción en grandes fermentadores, el uso de dietas líquidas que ofrecen los nematodos en formulaciones con mayor viabilidad (18, 50), son muy costosos para ser utilizados masivamente en cultivos de bajo retorno como el café, por tanto se prefiere su producción en un insecto como *G. mellonella*, que requiere menos infraestructura y con costos de producción más reducidos (23).

Esta investigación tiene como propósito optimizar el proceso de la cría de *G. mellonella* con el fin de hacer más eficiente la producción de los nematodos entomopatógenos parásitos de la broca del café, para que puedan utilizarse en programas de control de la broca.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó en el laboratorio de Entomología del Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé), localizado en Chinchiná, Caldas. Con el fin de estudiar el desarrollo de *G. mellonella* en función de la temperatura (20, 25 y 30°C), se mantuvo en el laboratorio una cría de este insecto a 25°C y una humedad relativa cercana al 80%. Para la cría de este insecto se utilizó una dieta artificial, cuyos ingredientes son: miel de abejas, glicerina, levadura, cera de abejas y salvado de trigo (estéril a 15 libras de presión, durante 15 minutos).

Para obtener un kilogramo de la dieta, inicialmente se mezclaron 464g de salvado de maíz y 69g de levadura seca. Aparte, se derritieron 67g de cera de abejas y se adicionaron a la primera mezcla. Posteriormente se adicionaron 207g de glicerina y 193g de miel de abejas. Esta mezcla se colocó en bandejas multiusos de 21 x 18 x 5cm (Estra®).

Desarrollo de *Galleria mellonella* a diferentes temperaturas constantes

Huevo. Para determinar la duración del estado de huevo de *G. mellonella*, se partió de una unidad experimental constituida por 25 huevos recién depositados, ubicados en una caja de Petri sobre un papel filtro húmedo. Estos huevos se incubaron a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ y $30\pm 2^{\circ}\text{C}$, hasta su eclosión. Para cada temperatura o tratamiento se tuvieron diez repeticiones, y diariamente se registró el número de larvas que emergían.

Como variables de respuesta se registraron el número acumulado de larvas emergidas y el tiempo de eclosión, y luego se estimó la tasa diaria de eclosión. Se realizó un análisis de varianza, se aplicó la prueba de Duncan ($P = 0,05$) para determinar diferencias entre los tratamientos para la variable tasa diaria de larvas emergidas, y se aplicó la prueba de Tukey ($P = 0,05$) para determinar las diferencias entre los tratamientos para la variable tiempo de emergencia.

Larva. Para las observaciones sobre el estado de larva de *G. mellonella*, se colocó una larva de menos de un día de edad en un vial pequeño, con la dieta artificial (33, 34), y éste se tapó con "Vinilpel", lo que constituyó la unidad experimental. El experimento se inició con 60 larvas para cada temperatura, y diariamente se observó el cambio de instar a través de la exuvia de la cápsula cefálica, la cual se midió en el estereoscopio con la ayuda de un lente con visor micrométrico. Para este estadio se registró el tiempo que tomó la larva en cambiar de instar, el ancho de la cápsula cefálica y la mortalidad de las larvas durante el período de desarrollo. Los datos se analizaron a través de un análisis de varianza y se realizaron pruebas de Duncan ($P= 0,05$) para determinar diferencias entre los tratamientos para la variable tiempo de cambio de instar.

Pupa. Una vez la larva de último instar pasó al estado de pupa, se registraron el tiempo de duración de este estadio, su mortalidad y el sexo, a partir de la observación de la genitalia en el estereoscopio (15) (Figura 1). Los datos se analizaron a través de un análisis de varianza y de la prueba de Duncan ($P= 0,05$) para determinar diferencias entre los tratamientos para la variable tiempo de cambio a adulto.

Adulto. Las hembras adultas emergidas de las pupas se confinaron con los machos, y se registró su longevidad. Para cada hembra se registró el número de huevos ovipositados y su viabilidad. A los datos se les realizó el análisis de varianza y la prueba de Duncan ($P = 0,05$) para determinar diferencias entre los tratamientos para las variables:



Figura 1. Dimorfismo sexual en pupas de *Galleria mellonella*, observe la posición de la genitalia en la hembra y en el macho.

tiempo de duración del adulto, número de huevos por hembra y porcentaje de huevos eclosionados.

Los resultados de los anteriores experimentos permitieron establecer la temperatura más apropiada para determinar otros parámetros que se describen a continuación:

Capacidad de oviposición de *G. mellonella* en función de la densidad de adultos. De la cría de laboratorio de *G. mellonella*, se tomó una cohorte de adultos que emergieron el mismo día, los cuales se trasladaron a una jaula para oviposición, conformada por un cubo de 50cm de lado, construida con marcos de madera y forrada con una malla fina de nailon (Figura 2). En cada jaula se colocaron grupos de 50, 100, 150 y 200 parejas de la polilla (tratamientos), y se introdujeron 14 trozos de madera de 40cm de largo y 3 x 3cm de grosor, previamente recubiertos de cera. Estos se organizaron de tal manera que quedaron uno sobre otro para que, en los espacios que los separaban, las polillas depositaran sus huevos, con lo cual se aprovechó su atracción a la cera y su hábito de colocar huevos en intersticios.

El experimento se organizó bajo un diseño experimental de bloques aleatorios, con cuatro repeticiones, los cuales establecieron en diferentes fechas para constituir los bloques en el diseño experimental. Diariamente y hasta la muerte de los adultos, se extrajeron

los huevos adheridos a los trozos de madera y se registró el número de éstos por cada unidad experimental, también se contabilizó la producción acumulada y se estimó la tasa diaria de oviposición. Para contabilizar el número de huevos por peso, se estimó previamente el peso de un huevo (0,04mg). Los datos se analizaron a través de un análisis de varianza y un análisis del comportamiento lineal y cúbico, para las variables de respuesta.

Optimización de la producción de larvas de *G. mellonella* en función de la densidad de huevos. Se evaluaron cuatro densidades de huevos (200, 300, 400 y 500) (tratamientos) en 300g de dieta colocada en un recipiente plástico (17cm de largo x 12cm de ancho x 7cm de alto), lo que constituyó la unidad experimental. Inicialmente, los huevos se confinaron en un vial con un poco de la dieta, con el fin de que al eclosionar las larvas de primer instar no se escaparan de los recipientes. Al cabo de unos 15 días, después de la eclosión de los huevos, las larvas estaban en segundo instar, y se trasladaron a los recipientes de plástico anteriormente descritos. Allí, se dejaron las larvas durante 40 días, al cabo de los cuales se contabilizó el número de larvas que alcanzaron su desarrollo hasta el estado de pupa. El experimento se organizó en un diseño completamente aleatorio, con cuatro tratamientos y cinco repeticiones. La variable de respuesta fue el número de larvas de último instar que llegaron a pupa, y como variable complementaria se



Figura 2. a) Jaulas de nailon con marcos de madera para la oviposición de los adultos de *Galleria mellonella*; b) Detalle de la organización de los trozos de madera para la oviposición de la polilla.

determinó la mortalidad de las larvas. Se realizó un análisis de varianza y una prueba de comparación de promedios de Tukey ($P=0,05$) para determinar las diferencias entre los tratamientos.

Producción *in vivo* de nematodos entomopatógenos y tiempo de almacenamiento. Las especies de nematodos entomopatógenos *S. colombiense* y *H. bacteriophora*, se reprodujeron en larvas de *G. mellonella*, en el laboratorio a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ (23). Inicialmente, se confinaron diez larvas de último ínstar de *G. mellonella*, en cajas Petri de 9cm de diámetro, con papel filtro húmedo, y luego se colocaron en contacto con una suspensión de 1mL, que contenía 10.000 juveniles infectivos (JI). Tres días después de la infección, se retiraron las larvas muertas por cada nematodo (con visualización de signos de infección), y se colocaron en cámaras de desarrollo (cajas plásticas de 1.428cc con papel toalla en la base), durante 6 días a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Para la emergencia y la recolección de los JI, se colocaron las larvas parasitadas en trampas White (36, 52) modificadas, para poder albergar más larvas. Esta modificación consistió en una bandeja de plástico, con dimensiones de 30cm de largo x 25cm de ancho x 10cm de alto. En su interior se colocaron dos tubos de PVC de 2 pulgadas, cortados por la mitad, para formar una canoa de 28cm de largo. Sobre cada una de las canoas invertidas se colocó papel filtro y 80 larvas de *G. mellonella* muertas por los nematodos, lo que conformó la unidad experimental. A cada bandeja se le adicionó agua destilada estéril hasta tocar el borde de los tubos (Figura 3). Los JI de cada una de las especies de nematodos, se cosecharon y contabilizaron cada tres días, durante 18 días, y se almacenaron en frascos de vidrio, que se refrigeraron a $10\pm 2^{\circ}\text{C}$. Para determinar el número de JI por unidad experimental, se contabilizaron los JI en cinco muestras de 1mL, y con el promedio de JI/mL se estimó el total, con base en el volumen de agua contenido en cada trampa.

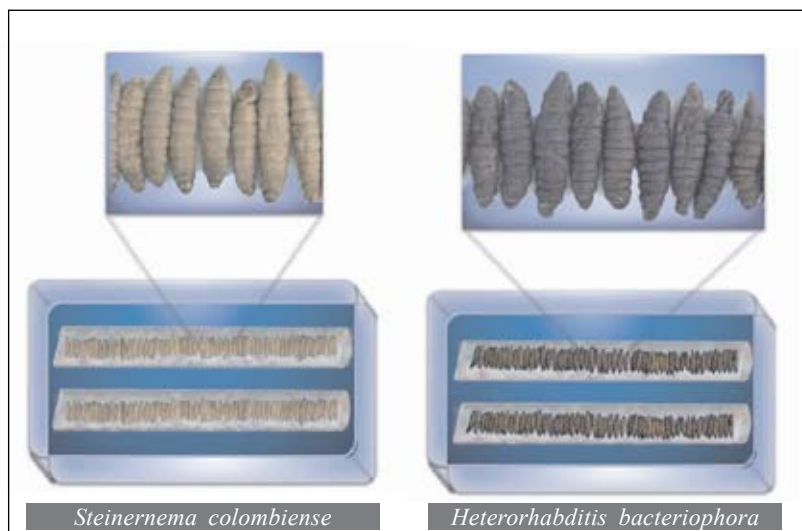


Figura 3. Trampas White modificadas con tubos de PVC en forma de medias canoas invertidas, sobre las cuales se colocan larvas de *G. mellonella* infectadas por los entomonematodos *S. colombiense* y *H. bacteriophora*.

Para determinar la viabilidad de los JI almacenados, de cada frasco se tomaron cinco alícuotas de 1mL cada una, y se contabilizó el número total de JI y el número de JI muertos. Esta evaluación se hizo mensualmente, durante 3 meses, y de esta manera se estimó la mortalidad de JI.

El experimento lo conformaron dos tratamientos (especies de nematodos) con cinco repeticiones. Las variables registradas fueron: producción acumulada de JI para cada especie de nematodo y porcentaje de mortalidad acumulado de JI. Se realizó un análisis de varianza para las variables de respuesta y se estimó la tasa diaria de producción de JI por especie de nematodo evaluada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desarrollo de *Galleria mellonella*

Los resultados del ciclo de vida de *G. mellonella* a diferentes temperaturas constantes se presentan en las Tablas 1, 2 y 3. En

general, se observa que el ciclo de vida de *G. mellonella* es más corto a medida que se incrementa la temperatura, con un promedio de duración del estado de huevo a adulto de 178,8; 82,4 y 62,4 días a 20, 25 y 30°C, respectivamente. No se encontraron diferencias apreciables en la duración del desarrollo de la hembra y el macho (Tablas 1, 2 y 3). En cuanto a la mortalidad de *G. mellonella*, el estado larvario presentó los mayores valores en todas las temperaturas evaluadas (64,8 a 71,5%) (Tabla 4), valores similares a los registrados Marston *et al.* (35), quienes encontraron mortalidades entre el 5,2 y 71,3%.

Larva. El estado de larva también fue muy influenciado por la temperatura, y varió entre 88,1 días a 20°C y 30,4 días a 30°C. En la Tabla 6, se presenta la comparación en la duración de los diferentes instares larvales en las tres temperaturas evaluadas. De acuerdo con la prueba de Duncan (P = 0,05) aunque hay diferencias estadísticas significativas en el número de días de desarrollo para cada instar entre las temperaturas, es notoria la mayor duración del estado de larva a 20°C.

Tabla 1. Duración en días de los diferentes estados de *Galleria mellonella* mantenidos a 20°C en viales con dieta artificial.

Estado				Hembra			Macho		
	N*	\bar{X}	\pm D.E.	N*	\bar{X}	\pm DE	N*	\bar{X}	\pm D.E.
Huevo	25	17,4	0,9	-	-	-	-	-	-
Larva I instar	24	14,6	1,0	-	15,1	0,7	-	14,5	1,0
Larva II instar	20	8,9	1,3	-	8,6	1,0	-	9,2	1,6
Larva III instar	18	9,0	1,3	-	9,1	1,2	-	9,1	1,3
Larva IV instar	18	10,2	2,0	-	10,9	1,9	-	9,9	2,1
Larva V instar	18	8,8	1,7	-	8,6	1,3	-	9,1	2,0
Larva VI instar	18	17,7	15,9	-	23,1	21,8	-	14,7	11,0
Larva VII instar	15	51,1	2,8	-	52,2	2,7	-	50,2	2,9
Pupa	18	17,2	2,2	7	16,3	2,4	10	17,7	2,1
Adulto	17	24,0	5,8	7	24,6	6,6	9	23	5,5
Total		178,8			185,8			174,8	

N*: Número de individuos; \bar{X} : Promedio; D.E.: Desviación estándar.

Tabla 2. Duración en días de los diferentes estados de *Galleria mellonella* mantenidos a 25°C en viales con dieta artificial.

Estado	Hembra			Macho					
	N*	\bar{X}	\pm D.E.	N*	\bar{X}	\pm D.E.	N*	\bar{X}	\pm D.E.
Huevo	25	10,0	0,6	-	-	-	-	-	-
Larva I ínstar	36	6,9	0,8	-	6,4	0,5	-	6,9	0,8
Larva II ínstar	32	6,3	1,1	-	7,0	1,1	-	6,3	1,1
Larva III ínstar	31	5,6	1,4	-	5,5	1,5	-	6,1	1,4
Larva IV ínstar	30	4,1	0,6	-	4,0	0,8	-	4,0	0,5
Larva V ínstar	30	4,3	0,9	-	4,1	1,0	-	4,6	0,9
Larva VI ínstar	30	6,8	0,6	-	6,8	0,5	-	6,8	0,7
Larva VII ínstar	30	6,1	1,3	-	6,6	1,4	-	6,0	1,2
Larva VIII ínstar	30	8,4	1,1	-	8,4	1,5	-	8,3	0,9
Pupa	24	14,3	2,0	8	14,4	2,3	16	14,3	1,9
Adulto	21	9,6	1,6	8	10,8	0,9	13	8,9	1,6
Total		82,4			83,8			82,0	

N*: Número de individuos; \bar{X} : Promedio; D.E.: Desviación estándar.

Tabla 3. Duración en días de los diferentes estados de *Galleria mellonella* mantenidos a 30°C en viales con dieta artificial.

Estado	Hembra			Macho					
	N*	\bar{X}	\pm D.E.	N*	\bar{X}	\pm D.E.	N*	\bar{X}	\pm D.E.
Huevo	25	7,1	0,4	-	-	-	-	-	-
Larva I ínstar	32	5,8	0,8	-	6,6	0,5	-	5,3	0,5
Larva II ínstar	26	4,2	0,6	-	4,4	0,7	-	4,1	0,3
Larva III ínstar	25	4,2	0,8	-	4,4	0,9	-	4,1	0,7
Larva IV ínstar	25	4,7	0,7	-	4,6	0,5	-	4,8	0,9
Larva V ínstar	25	4,8	1,1	-	4,4	1,2	-	4,6	0,9
Larva VI ínstar	25	4,8	0,9	-	5	0,9	-	4,6	1
Larva VII ínstar	25	5,5	0,6	-	5,7	0,7	-	5,5	0,5
Larva VIII ínstar	22	3,5	4,8	-	4,2	5	-	3,5	5
Pupa	21	8,9	1,4	9	9,7	0,9	11	8,4	1,6
Adulto	20	8,9	1,8	9	8,1	1,7	11	9,5	1,7
Total		62,4			64,1			61,4	

N*: Número de individuos; \bar{X} : Promedio; D.E.: Desviación estándar.

Tabla 4. Mortalidad de los diferentes estados de *Galleria mellonella* mantenidos a tres temperaturas constantes.

Temperatura (°C)	Mortalidad (%)		
	Huevo	Larva	Pupa
20	28,0	71,5	5,5
25	18,8	64,8	12,5
30	32,8	66,4	4,7

Tabla 5. Promedios de duración del estado de huevos, la mortalidad y la eclosión de los huevos de *Galleria mellonella*, a tres temperaturas constantes.

Temperatura (° C)	Duración (días)	Eclosión (% acumulado)	Tasa diaria eclosión
20	17,4 a*	72,0	3,8 a**
25	10,0 b	81,0	4,8 a
30	7,1 c	67,0	4,1 a

*Promedios en cada columna con distinta letra presentan diferencias significativas según Tukey al 5%.

** Promedios en cada columna con distinta letra presentan diferencias significativas según Duncan al 5%.

Tabla 6. Promedio de la duración en días de cada ínstar larval de *Galleria mellonella*, criada a tres temperaturas constantes.

Temperatura (°C)	Ínstar (días de duración)							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
20	14,6 a*	8,9 a	9,0 a	10,2 a	8,8 a	17,7a	51,1 a	---
25	6,9 b	6,3 b	5,6 b	4,1 b	4,3 b	6,8 b	6,1 b	8,4 a
30	5,8 c	4,2 c	4,2 c	4,7 b	4,8 b	4,8 b	5,5 b	3,5 b

* Promedios en cada columna con distinta letra presentan diferencias significativas según Duncan al 5%.

Los datos obtenidos son similares a los registrados por Marston y Campbell (34) para la cría de este insecto a 30°C.

Se observó que a 20°C la larva de *G. mellonella* pasó por siete ínstares, mientras que a 25 y 30°C pasó por ocho, resultados semejantes a los obtenidos por Zenner y Posada (54). No obstante, otros autores como Lyon (33), han registrado para este insecto siete ínstares. Cabe anotar que el número de ínstares en los insectos puede variar como respuesta a factores como la disponibilidad y la calidad de alimento, así como a la temperatura a la cual se crían (4, 43).

La duración total del tiempo larval no presentó diferencias significativas ($P = 0,05$) entre los 25 y 30°C (Tablas 1, 2 y 3), pero si se tiene en cuenta la mortalidad, ésta fue menor a 25°C (Tabla 4); por tanto, se concluye que esta temperatura es la más apropiada para el desarrollo larval de *G. mellonella*.

La información registrada sobre el ancho de la cápsula cefálica, permite conocer el ínstar en que se encuentre una larva, de acuerdo con la temperatura de cría (Tabla 7).

Pupa. La tendencia general de la duración en este estado es igual a la observada en el estado de huevo y larva, con una disminución en días a medida que aumenta la temperatura. La duración fue de 17,2; 14,2 y 8,9 días para 20, 25 y 30°C, respectivamente (Tablas 1, 2 y 3). Hubo diferencias estadísticas para cada temperatura (Duncan 0,05), lo que indica que ésta influye directamente en el tiempo de desarrollo durante este estado. La relación hembra a macho es de 1: 1,3 en favor de los machos. Para este estado, la temperatura de 30°C es la más apropiada debido a que el desarrollo del insecto ocurre en menor tiempo, con una menor mortalidad.

Adulto. No se encontraron diferencias estadísticas significativas en cuanto a la duración (días) del estado de desarrollo y las temperaturas de 25 y 30°C. La duración

fue de 24; 9,6 y 8,8 días a 20, 25 y 30°C (Tablas 1, 2 y 3).

En cuanto al número de huevos depositados por cada hembra de *G. mellonella* y su viabilidad, se registraron 808 huevos por hembra con una viabilidad de 80,3%, a 25°C (Tabla 8). Marston *et al.* (35), encontraron una viabilidad entre 78,6 y 96,3%.

Capacidad de oviposición de *G. mellonella* en función de la densidad de adultos

Con base en los resultados anteriores, los procesos de cría masiva de *G. mellonella* se llevaron a cabo en un laboratorio a 25°C y una humedad relativa del 80%.

En relación con la oviposición, los registros se hicieron hasta el séptimo día, tiempo en el que ésta cesó. A excepción de

la menor densidad evaluada (50 parejas), todas las demás densidades registraron oviposiciones superiores al 50% del total para el primer día.

En todas las densidades, al cuarto día, se registraron oviposiciones superiores al 90% del total; cabe anotar que la menor cantidad de huevos se registró en densidades de 50 y 100 parejas (Tabla 9).

Se observó que la oviposición de *G. mellonella* se incrementaba a medida que había una mayor cantidad de polillas, con el mayor promedio de huevos cuando se utilizaron 150 parejas por jaula cúbica de 50cm de lado. Cuando la densidad fue de 200 parejas, se observó una reducción en el número de huevos depositados por las polillas (Tabla 10), aunque la tasa diaria de oviposición no presentó diferencias significativas (Duncan 0,05).

Tabla 7. Promedio del diámetro de las cápsulas cefálicas de los instares de *Galleria mellonella* a tres temperaturas constantes.

Ínstar	Diámetro de la cápsula cefálica (mm)					
	20° C		25° C		30° C	
	\bar{X}	D. E.	\bar{X}	D. E.	\bar{X}	D. E.
I	0,20	0,00	0,19	0,01	0,21	0,02
II	0,24	0,01	0,24	0,02	0,32	0,02
III	0,33	0,03	0,34	0,04	0,42	0,04
IV	0,44	0,05	0,48	0,07	0,61	0,05
V	0,64	0,07	0,73	0,08	0,89	0,08
VI	0,66	0,15	1,02	0,11	1,27	0,13
VII	--	--	1,45	0,09	1,45	0,02

\bar{X} : Promedio; D.E.: Desviación estándar

Tabla 8. Promedio de huevos depositados por hembra de *Galleria mellonella* y porcentaje de eclosión, bajo tres temperaturas constantes.

Temperatura (°C)	Huevos (promedio)	D. E.	% Eclosión
20	631	290	68,6
25	808	241	80,3
30	749	219	74,4

D.E.: Desviación estándar

Tabla 9. Promedio diario de huevos depositados por adultos de *Galleria mellonella* en jaulas cúbicas de 50cm de lado, con diferentes densidades de parejas por jaula.

Día	Número de parejas por recipiente							
	50		100		150		200	
	Huevos	C.V.	Huevos	C.V.	Huevos	C.V.	Huevos	C.V.
1	2.884	9,15	10.615	6,76	31.361	16,76	27.935	7,12
2	2.801	18,34	5.415	16,05	14.328	10,08	13.038	5,83
3	2.426	27,64	1.836	10,7	7.999	12,13	7.656	6,33
4	1.307	25,11	821	19,55	4.861	17,87	4.732	4,02
5	704	22,73	160	44,37	1.488	38,3	1.848	22,35
6	74	28,7	44	32,04	533	77,6	494	64,3
7	0	0	0	0	40	77,88	45	32,81
TOTAL	10.199		18.894		60.612		55.750	

C.V.: Coeficiente de variación

Tabla 10. Número total y tasa diaria de oviposición de *Galleria mellonella* bajo diferentes proporciones de adultos en una jaula cúbica de 50cm de lado.

Densidad	Promedio de oviposición acumulada	Tasa diaria de oviposición	C.V.
50	10.199	1.177	11,67
100	18.894	1.126	12,83
150	60.612	4.423	8,54
200	55.750	4.267	2,07

C.V.: Coeficiente de variación

En otros estudios Marston *et al.* (35) recomiendan una densidad de 898 a 1.345 parejas/m³ a 30°C, la cual se obtuvo en esta investigación con la densidad de 150 parejas; cabe anotar que la jaula evaluada en este estudio tiene un área de 0,125m³, un volumen ocho veces menor al utilizado por Marston *et al.* (35), pero que a escala coincide con los valores indicados por estos investigadores.

Optimización de la producción de larvas de *G. mellonella* en función de la densidad de huevos.

La mayor producción de larvas de último instar y la menor mortalidad se obtuvo con la densidad de 300 huevos por recipiente de

300g de dieta. La producción fue de 230 larvas y la mortalidad de 23,1% (Tabla 11). Estos resultados contrastan con los registros obtenidos por Marston *et al.* (35), quienes encontraron al incrementar la densidad de larvas disminuía la supervivencia de éstas, con una densidad de 50 larvas/100g de dieta la supervivencia fue del 87% y con una densidad de 150 larvas/100g de dieta del 62%.

Producción *in vivo* de *Steinernema colombiense* y *Heterorhabditis bacteriophora*.

La producción de JI para las dos especies evaluadas fue similar a través del tiempo. La cosecha de los JI se hizo hasta el día

Tabla 11. Promedio de la producción y mortalidad de larvas de último instar de *Galleria mellonella*, en diferentes densidades de huevos por cada 300g de dieta.

Densidad	Producción de larvas	C.V.	Mortalidad (%)	C.V.
200	126 b*	22,6	36,9 bc	38,7
300	230 a	8,9	23,1 c	29,7
400	227 a	6,4	43,0 ab	8,4
500	213 a	7,1	57,2 a	5,3

* Promedios en cada columna con distinta letra presentan diferencias significativas según Tukey al 5%.
C.V.: Coeficiente de variación

18, tiempo en el cual se dejaron de producir nematodos en las larvas. Para *S. colombiense*, el promedio de la producción total de las 80 larvas de *G. mellonella* fue de 6,9 millones de JI, mientras que para *H. bacteriophora* fue de 6,3 millones de JI. Para las dos especies de nematodos la mayor producción se presenta durante los tres primeros días, sin embargo ésta fue mayor en *S. colombiense*.

Descriptivamente la producción de nematodos disminuyó a través del tiempo, aunque para el caso de *H. bacteriophora* se apreció un incremento el noveno día (Tabla 12). Esto se debe básicamente a su biología, pues se desarrollan machos y hembras durante la segunda generación, que producen una progenie nueva de JI, que se refleja en este lapso de la emergencia. Observaciones similares realizaron Sáenz y Luque (44), quienes afirman que durante los diez primeros días de la emergencia, se obtienen las mayores producciones de nematodos, con un 90% de los JI.

El promedio de producción de JI por larva de *G. mellonella* fue de 86.250 para *S. colombiense* y de 78.750 para *H. bacteriophora*. Sin embargo, Ortiz *et al.* (41) afirman que estas producciones son muy variables, aunque si se comparan con otros estudios, la producción lograda en esta investigación es

menor, ya que se han registrado promedios de producciones de diferentes especies de 165.000 JI/larva, que oscilan entre 30.000 y 240.000 JI (26, 37, 41). Esta notoria disminución en la producción bajo las condiciones en que se desarrolló este estudio seguramente se vio afectados por el tamaño, la edad y la susceptibilidad del insecto (17, 45, 46), las condiciones ambientales y de infección como inóculo (2, 47), la densidad de cadáveres de *G. mellonella* por unidad de área (47), la temperatura, el tiempo de emergencia y la duración del ciclo en el hospedante (22), la aireación y la humedad (3, 18).

Con los datos de la producción se estimaron las ecuaciones de predicción, para *H. bacteriophora* la ecuación logarítmica es: Producción = 7,0994 - 0,1604*día (Figura 4), y para *S. colombiense*: Producción = 7,706 - 0,346*día + 0,0086*día² (Figura 5), las que resultan de valiosa ayuda para estimar futuras producciones.

Cuando estas dos especies de nematodos se almacenaron en agua, en una nevera a 10±2°C, la mortalidad de *H. bacteriophora* al cabo de un mes fue del 92%, mientras que para *S. colombiense* fue del 49,8%; sin embargo, después de tres meses de almacenamiento casi la totalidad de los nematodos de ambas especies estaba muerta

(98%) (Tabla 13). Kaya y Stock (23) indican que los heterorhabditidos tienen una menor viabilidad a través del tiempo en comparación con los steinernematodos, estos últimos pueden durar entre seis y nueve meses y los heterorhabditidos entre tres y cuatro meses.

Los resultados permitieron conocer las condiciones óptimas de desarrollo de

G. mellonella, así como cuantificar sus parámetros para implementar una cría para la producción masiva y estandarizada de los entomonematodos *S. colombiense* y *H. bacteriophora*. Para el caso de la producción de los entomonematodos debe enfatizarse en un proceso más mecanizado con el cual se pueda depender menos de la mano de obra y así reducir los costos de producción. Lo

Tabla 12. Número de juveniles infectivos de dos especies de entomonematodos producidos cada tres días, en larvas de *Galleria mellonella*.

Día	<i>Steinernema colombiense</i>		<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	
	\bar{X}	C. V.	\bar{X}	C. V.
3	5.774.484	18,5	3.681.240	8,5
6	776.550	16,2	883.980	6,7
9	201.944	31,5	1.588.340	5,9
12	75.420	12,9	95.810	4,6
15	22.480	12,9	29.280	12,3
18	20.040	29,9	21.340	10,1
Total	6.870.918		6.299.990	

\bar{X} : Promedio; C.V.: Coeficiente de variación

Tabla 13. Mortalidad mensual acumulada de los entomonematodos bajo almacenamiento, en agua estéril a $10 \pm 2^\circ\text{C}$.

Mes	<i>Steinernema colombiense</i> (%)	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i> (%)
1	49,8	92,7
2	51,1	96,3
3	53,0	98,0

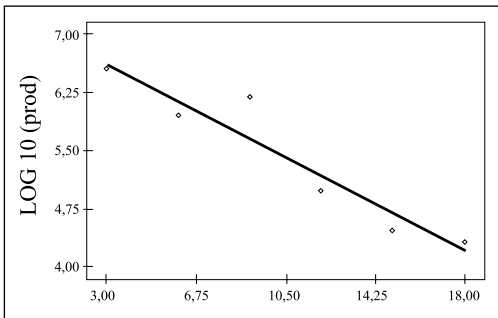


Figura 4. Tendencia diaria de la producción a través del tiempo de *Heterorhabditis bacteriophora* en larvas de *Galleria mellonella*.

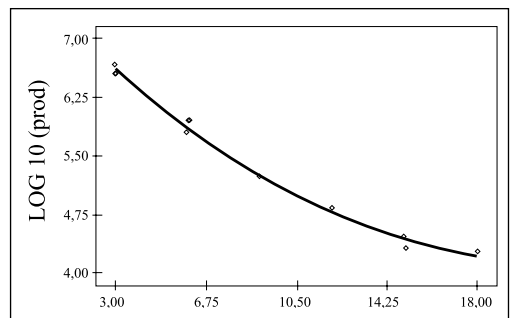


Figura 5. Tendencia diaria de la producción a través del tiempo de *Steinernema colombiense*, en larvas de *Galleria mellonella*.

anterior posibilitará que empresas productoras de biológicos se interesen en la producción de estos bioinsumos y lo suministren al caficultor para el control de *H. hampei*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Federación Nacional de Cafeteros y a Cenicafé por la financiación de esta investigación. A Diana Rodríguez y Carlos Quintero por su ayuda en el laboratorio y a los revisores de este manuscrito.

LITERATURA CITADA

1. ALLARD, G. B.; MOORE, D. *Heterorhabditis* sp., nematodes as control agents for coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Scolytidae). Journal of Invertebrate Pathology 54 (1): 45 - 48. 1989.
2. BOFF, M. I. C.; WIEGERS, G. L.; GERRITSEN, L. J. M.; SMITS, P. H. Development of entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis megidis* strain NLH-E 87,3 in *Galleria mellonella*. Nematology 2: 303 - 308. 2000.
3. BURMAN, M.; PYE, A. E. *Neoaplectana carpocapsae*: respiration of infective juveniles. Nematologica 26: 214 - 219. 1980.
4. BUSTILLO P., A. E. Diferencias en el ciclo de vida e incidencia en el número de instares de *Glena bisulca* (Lepidoptera: Geometridae) a diferentes temperaturas ambientales. Revista Colombiana de Entomología 2 (3): 99 - 103. 1976
5. BUSTILLO P., A. E. Patogenicidad del nematodo *Neoaplectana carpocapsae* en larvas, prepupas y pupas de *Oxydia trychiata*. Revista Colombiana de Entomología 2 (4): 139 -144. 1976.
6. BUSTILLO P., A. E. Perspectivas de manejo integrado de la broca del café, *Hypothenemus hampei* en Colombia. Medellín, Sociedad Colombiana de Entomología - Socolen, 1991. p. 106-118. (Miscelánea No. 18)
7. BUSTILLO P., A. E. El manejo de cafetales y su relación con el control de la broca del café en Colombia. Boletín Técnico No. 24:1- 40. 2002.
8. BUSTILLO P., A. E.; BERNAL, M. G.; CHAVES C., B.; BENAVIDES M., P. Dynamics of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* infecting *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) populations emerging from fallen coffee berries. Florida Entomologist 82 (4): 491 - 498. 1999.
9. BUSTILLO P., A. E., CÁRDENAS M., R.; POSADA F., F. J. Natural enemies and competitors of *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) in Colombia. Neotropical Entomology 31 (4): 635 - 639. 2002.
10. CASTAÑO, A.; BENAVIDES M., P.; BAKER, P. S. Dispersión de *Hypothenemus hampei* en cafetales zoqueados. Cenicafé 56 (2):142 - 150. 2005.
11. CASTILLO, A.; BARRERA, J. F. Primer registro de nematodo parasitando a la broca del café en cafetales de México. In: Reunión Intercontinental sobre Broca del Café, 2. Tapachula, Marzo 29 - Abril 2, 1998. Tapachula, CABI - ECOSUR, 1998. p. 47.
12. CASTILLO, A.; INFANTE, F.; BARRERA, J. F.; CARTA, L.; VEGA, F.E. First field report of a nematode (Tylenchida: Spherularioidae) attacking the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) in the Americas. Journal of Invertebrate Pathology 79: 199-202. 2002.
13. CASTILLO, A.; MARBÁN M., N. Evaluación en laboratorio de nematodos steinernematidos y heterorhabditidos para el control biológico de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferr.). Nematologica 26 (2):101 - 109. 1996.
14. CASTILLO R., J. A. DEL Evaluación de mezclas de entomopatógenos para el control de poblaciones de broca en el suelo. San Juan de Pasto, Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Agrícolas, 2004. 97 p. (Tesis: Ingeniero Agrónomo).
15. DROOZ, A. T.; BUSTILLO P., A.E. Determinación del sexo de las pupas del defoliador del ciprés *Glena bisulca* (Rindge) (Lepidoptera: Geometridae). Agricultura Tropical 26 (11): 769 - 771. 1970.
16. EHLERS, R. U.; SHAPIRO-ILAN, D. I. Mass Production. In: Grewal, P. S.; Ehlers, R. U.; Shapiro I., D.I. (Eds.). Nematodes as biocontrol agents. Wallingford, CABI Publishing, 2005. p. 65 - 78.
17. FLANDERS, K. L.; MILLER, J. M.; SHIELDS, E. J. *In vivo* production of *Heterorhabditis bacteriophora* 'Oswego' (Rhabditida: Heterorhabditidae), a potential biological control agent for soil-inhabiting insects in temperate regions. Journal of Economic Entomology 89: 373 -380. 1996.

18. FRIEDMAN, M.J. Commercial production and development. In: Gaugler, R.; Kaya, H.K. (Eds.). Entomopathogenic nematodes in biological control. Boca Raton, CRC Press, 1990. p. 153 - 172.
19. GAUGLER, R.; GEORGIS, R. Culture method and efficacy of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae). *Biological Control* 1: 269 - 274. 1991.
20. GAUGLER, R.; BROWN, I.; SHAPIRO I., D. I.; ATWA, A. Automated technology for in vivo mass production of entomopathogenic nematodes. *Biological Control* 24: 199 - 206. 2002.
21. GIRALDO G., D. P. Comportamiento de entomonematodos en el control de poblaciones de broca en árboles de café. Manizales, Universidad de Caldas. Facultad de Ciencias Agropecuarias, 2003. 83 p. (Tesis: Ingeniero Agrónomo).
22. GREWAL, P. S.; GEORGIS, R. Entomopathogenic nematodes. In: Hall, F.R.; Menn, J.J. (Eds.). *Methods in biotechnology. Vol. 5. Biopesticides: Use and delivery.* Totowa, Humana Press, 1998. p. 271 - 299.
23. KAYA, H.; STOCK, S. Techniques in insect nematology. In: Lacey, L. (Ed.). *Manual of techniques in insect pathology.* San Diego, Academic Press, 1997. p. 281 - 324.
24. LARA, J. C.; LÓPEZ, J. C. Evaluación de diferentes equipos de aspersión para la aplicación de nematodos entomopatógenos. *Revista Colombiana de Entomología* 31 (1): 1 - 4. 2005.
25. LARA, J. C.; LÓPEZ, J. C.; BUSTILLO, A. E. Efecto de entomonematodos sobre poblaciones de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae), en frutos en el suelo. *Revista Colombiana de Entomología* 30 (2): 179 - 185. 2004.
26. LINDEGREN, J. E; VALERO, K. A.; MACKAY, B. E. Simple *in vivo* production and storage methods for *Steinernema carpocapsae* infective juveniles. *Journal of Nematology* 25 (2): 193 - 197. 1993.
27. LÓPEZ, J. C. Nematodos parásitos de insectos y su papel en el control de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari). In: Curso Internacional Teórico - Práctico. Sección II. Parasitoides y otros enemigos de la broca. Chinchiná, marzo 18 - 22, 2002. Memorias. Chinchiná, Cenicafé, 2002. p. 39 - 70.
28. LÓPEZ, J.C. ¿Es posible el uso de entomonematodos en programas MIP en Colombia?. Avances con la broca del café. In: CONGRESO de la Sociedad Colombiana de Entomología, 32. Ibagué, Julio 27-29, 2005. Memorias. Ibagué, SOCOLEN, 2005. p. 33-42.
29. LÓPEZ, J. C.; STOCK, P. First isolation of *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar 1976 (Nematoda: Heterorhabditidae), in Colombia. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2008. (En prensa)
30. LÓPEZ, J. C.; CANO, L.; GÓNGORA, C. E.; STOCK, S. P. Diversity and evolutionary relationships of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) from the Central Andean region of Colombia. *Nematology* 10 (4): 561 - 574. 2008.
31. LÓPEZ, J. C.; PLICHTA, K.; GÓNGORA, C. E STOCK, S.P. A new entomopathogenic nematode, *Steinernema colombiense* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae) from Colombia. *Nematology*. 2007. (En prensa)
32. LUBEGO, S. The use of four rhabditid nematode species in the control of *Cosmopolites sordidus*, *Hypothenemus hampei* and *Cylas puncticollis*. Reading, University of Reading. Department of Agriculture, 1992. 111 p. (Thesis: M. Sc. in Technology of Crop Protection)..
33. LYON, W. Rearing wax worm. Ohio State University Extension Fact Sheet. Entomology. 2007. On line Internet. Disponible en: <http://ohioline.osu.edu/hyg-fact/2000/2131.html>. (Consultado en septiembre de 2007).
34. MARSTON, N.; CAMPBELL, B. Comparison of nine diets for rearing *Galleria mellonella*. *Annals of Entomological Society of America* 66 (1): 132 - 136. 1973.
35. MARSTON, N.; CAMPBELL, B.; BOLDT, E. Mass producing eggs of the greater wax moth, *Galleria mellonella* (L.). Washington, Department of Agriculture. Agricultural Research Service, 1975. 15 p. (Technical Bulletin No. 1510).
36. MARTIGNONI, M. E.; STEINHAUS, E. A. Laboratory exercises in insect microbiology and insect pathology. Minneapolis, Burgess Publishing, 1961. 63 p.
37. MOLINA, J. P.; LÓPEZ, J. C. Producción *in vivo* de tres especies de entomonematodos con dos sistemas de infección en dos hospedantes. *Revista Colombiana de Entomología* 27 (1-2): 73 - 78. 2001.

38. MOLINA, J. P.; LÓPEZ, J. C. Desplazamiento y parasitismo de entomonematodos hacia frutos infestados con la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). Revista Colombiana de Entomología 28 (2): 145 – 151. 2002.
39. MOLINA, J. P.; LÓPEZ, J. C. Supervivencia y parasitismo de nematodos entomopatógenos para el control de *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas 29: 523 – 533. 2003.
40. NGUYEN, K. B.; SMART, G. C. Identification of entomopathogenic nematodes in the Steinernematidae and Heterorhabditidae (Nematoda: Steinernematidae). Nematologica 43: 465 - 480. 1996.
41. ORTIZ, E.; CALVACHE, G.; LUQUE, E. Control microbiano de *Sagalassa valida*, Walker con el nematodo *Steinernema carpocapsae* (Weiser) en Tumaco, Nariño. Palmas 5 (1): 29 - 38. 1994.
42. POINAR Jr., G. O.; VEGA, F. E.; CASTILLO, A.; CHAVEZ, I. E.; INFANTE, F. *Metaparasitylenchus hypothenemi* n. sp (Nematoda: Allantonematidae), a parasite of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Curculionidae: Scolytinae). Journal of Parasitology 90 (5): 1106 - 1110. 2004.
43. ROMOSER, W. S.; STOFFOLANO JR., J. G. The science of entomology. 4. ed. Boston, McGraw-Hill, 1998. 605 p.
44. SÁENZ, A.; LUQUE, J. Cultivo in vivo y método de almacenamiento para juveniles infectivos de *Steinernema feltiae* (Rhabditidae: Steinernematidae). Agronomía Colombiana 17 (1-3): 37 - 45. 2000.
45. SHAPIRO, D. I.; CATE, J. R.; PENA, J.; HUNSBERGER, A.; MCCOY, C. W. Effects of temperature and host range on suppression of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) by entomopathogenic nematodes. Journal of Economic Entomology 92: 1086 - 1092. 1999.
46. SHAPIRO I., D. I.; GAUGLER, R. Production technology for entomopathogenic nematodes and their bacterial symbionts. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 28: 137 - 146. 2002.
47. SHAPIRO I., D. I.; GAUGLER, R.; TEDDERS, W. L.; BROWN, I.; LEWIS, E. E. Optimization of inoculation for in vivo production of entomopathogenic nematodes. Journal of Nematology 34: 343 - 350. 2002.
48. SIMÕES, N.; CALDAS, C.; ROSA, J. S.; BONIFASSI, E.; LAUMOND, C. Pathogenicity caused by high virulent and low virulent strains of *Steinernema carpocapsae* to *Galleria mellonella*. Journal of Invertebrate Pathology 75 (1): 47 - 54. 2000.
49. STOCK, S. P.; HUNT, D. J. Nematode morphology and systematics. In: Grewal, P. S.; Ehlers, R. U.; Shapiro I., D. I. (Eds.). Nematodes as biological control agents. Wallingford, CABI Publishing, 2005. p. 3-43.
50. THOMPSON, S. N. Nutrition and culture of entomophagous insects. Annual Review of Entomology 44: 561 - 592. 1999.
51. VARAPRASAD, K. S.; BALASUBRAMANIAN, S.; DIWAKAR, B. J.; RAMA, R., C. V. First report of an entomogenous nematode, *Panagrolaimus* sp., from coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) from Karnataka, India. Plant Protection Bulletin 46:42. 1994.
52. WHITE, G. F. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. Science 66: 302-303. 1927.
53. YANG, H.; JIAN, H.; ZHANG, S.; ZHANG, G. Quality of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* produced on different media. Biological Control 10 (3): 193:198. 1997.
54. ZENNER DE P., I.; POSADA, F. J. Manejo de insectos, plagas y benéficos, de la palma africana. Bogotá, ICA, 1992. 124 p. (Manual de Asistencia Técnica No. 54).