

Desarrollo *in vitro* de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae), en una dieta merídica liofilizada

In vitro development of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae), in an freeze dry diet

MARÍA TERESA GONZÁLEZ G.¹, ARNUBIO VALENCIA J.², ALEX E. BUSTILLO P.³

Revista Colombiana de Entomología 26(3-4): 107-111 (2000)

Resumen. La liofilización se constituye en una alternativa bastante útil en la preparación y conservación de la dieta merídica utilizada para la cría en laboratorio de *Hypothenemus hampei*. Por medio de este proceso es posible preparar dietas para la cría de insectos, sin modificar las características sensoriales y fisicoquímicas del producto final, mejorando notoriamente el método de secado tradicional en estufa. Se evaluó la humedad de la dieta liofilizada y de la dieta secada en estufa, durante 20 días de almacenamiento a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura. La dieta liofilizada presentó una reducción de humedad de sólo 10% mientras que la secada en estufa de 34%. La humedad de la dieta liofilizada almacenada por 20 días en congelación (-15°C) y en refrigeración (4°C) permanece estable a través del tiempo de evaluación. Cuarenta días después de la infestación, el promedio de estados biológicos en la dieta liofilizada fue de 48,3 estados/broca, significativamente superior (Tukey 5%) al encontrado en la dieta secada en estufa (15,3). El desarrollo de la broca desde huevo hasta adulto, en dieta liofilizada, se cumplió en 24 días con una eficiencia del 94%. El uso de una dieta liofilizada facilitará el estudio biológico de fracciones proteicas con actividad tóxica hacia las enzimas digestivas de diversos insectos, los cuales eventualmente pueden ser utilizados en la generación de plantas mejoradas genéticamente, a través de técnicas convencionales de biología molecular.

Palabras clave: Broca del café. *Hypothenemus hampei*. Dieta merídica liofilizada. Café. Colombia

Summary. Freeze-drying is a useful alternative for preparation and conservation of the meridic diet used for laboratory rearing of *Hypothenemus hampei*. This process allows preparation of diets for insect rearing without altering sensory and physicochemical characteristics of the final product, substantially improving traditional stove drying. Humidities of the freeze-dried diet and the stove dried diet were evaluated during 20 days of storage at $27 \pm 2^\circ\text{C}$. Decrease in humidity in the freeze-dried diet was 10% and in the stove dried diet was 34%. The freeze-dried diet remained stable when stored during 20 days at -15°C (frozen) and at 4°C (refrigerated). Forty days after infestation, the average of biological stages in the freeze-dried diet was 48,3 stages/borer, significantly higher (Tukey 5%) than that found in the stove dried diet (15,3). Development of the coffee berry borer from egg to adult was completed in 24 days with 94% efficiency. The use of a freeze-dried diet will facilitate the study of protein fractions with toxic activity against digestive enzymes of various insects, which could further be used in plant breeding through molecular biology techniques.

Key words: Coffee berry borer. *Hypothenemus hampei*. Freeze-dried meridic diet. Coffee. Colombia.

Introducción

Las dietas para la cría de insectos se han usado por más de 100 años con resultados muy variables (Reinecke 1985). Uno de los factores más importantes a tener en cuenta es la pérdida de humedad al poco tiempo de ser preparadas, lo que ocasiona disminución en la capacidad reproductiva de los insectos. Las dietas se pueden esterilizar o secar con el calor pero se corre el riesgo de desnaturalizar algunos compuestos y algunas vitaminas (Navon 1978). Se sabe que los procesos de secado que incluyen temperaturas superiores a 40°C

pueden conducir a la desnaturalización de compuestos tales como el ácido ascórbico (Sicorowski *et al.* 1980), el cual puede afectar muchos insectos, especialmente los fitófagos. Esta vitamina se destruye por el sistema de esterilización y se degrada a temperatura ambiente (Srivastava y Pant 1978), ocasionando deficiencias que pueden afectar los tiempos de las mudas o producir cambios en la relación de sexos (más machos) (Gomaa *et al.* 1977). Según Howell (1977), la conservación del contenido de agua apropiada para las dietas ha sido la causa de la mayoría de las dificultades para la cría de muchos insectos. Los

preparados tienden a perder agua por evaporación, conduciendo a diferencias de la concentración del agua con la dieta, causando cambios adversos en la textura y la palatabilidad. La oviposición, la reproducción, las mudas y la capacidad para cavar cámaras oviposicionales, generalmente, están asociadas con las cualidades físicas de la dieta. La perforación, o la apertura de ranuras previas a la infestación son requeridas en algunos insectos para facilitar la penetración de la dieta (Reinecke 1985). Para la mayoría de los insectos la consistencia de la dieta es esencial para tener una adecuada respiración y mantenimien-

1 Asistente de Investigación, Centro Nacional de Investigaciones de Café, CENICAFÉ, Chinchiná, Caldas, Colombia. A.A 2427, Manizales E-mail: fcmgon@cafedecolombia.com

2 I.A. Departamento de Química, Universidad de Caldas. A.A. 275, Manizales. E-mail: fcaval@cafedecolombia.com

3 I.A. Ph.D. Centro Nacional de de Investigaciones de Café, CENICAFÉ, Chinchiná, Caldas, Colombia. A.A. 2427, Manizales. E-mail: fcabus@cafedecolombia.com

to de la tasa metabólica (Nettles *et al.* 1990).

La liofilización se constituye en un proceso especial de secado, especialmente, para productos con altos contenidos de agua o solventes en su composición, que permite prolongar el período de vida útil del sustrato. Mediante este proceso se obtienen productos que pueden ser almacenados, por tiempos ilimitados, si se empacan adecuadamente (Franco *et al.* 1983). Los productos liofilizados se pueden reconstituir sin perder las características físicas de aroma y sabor que poseen antes del proceso de liofilización y se pueden usar en la mayoría de los productos alimentarios (Franco *et al.* 1983). La liofilización es un proceso que puede ser usado para almacenar medios de cultivo (dietas) sin ninguna reducción de las características biológicas. Este proceso puede ser empleado para criar muchos insectos entomólogos y test de control cuando se incluyen sustancias con actividad tóxica, constituyéndose en una excelente alternativa para promover la utilización de medios artificiales en la producción masiva de insectos (Grenier *et al.* 1998). Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue obtener una dieta merídica, secada mediante el proceso de liofilización, que permita simular las características fisicoquímicas y cualidades organolépticas del grano de café y al mismo tiempo ser dietéticamente y nutricionalmente aceptable por el insecto, para facilitar la evaluación de productos biológicos que puedan causar efectos inhibitorios en el desarrollo de la broca del café.

Materiales y Métodos

Las brocas se obtuvieron de la unidad de cría de parasitoides de Cenicafé, criadas en café pergamino seco con 45% de humedad y mantenidas en condiciones de oscuridad (27°C) y humedad relativa entre 65% y 75%. Los huevos se extrajeron de granos de café pergamino al cabo de seis días de infestación. Las brocas se sometieron a un proceso de desinfestación con hipoclorito de sodio al 0,37% por 10 minutos, lavándolas tres veces en agua destilada estéril.

La dieta merídica para broca (Villacorta 1985) se preparó de acuerdo con las modificaciones planteadas por Pérez *et al.* (1995). El agar se esterilizó a 120°C y 15 libras de presión durante 15 minutos. El azúcar, la caseína, el café molido y la levadura se adicionaron al agar cuando éste alcanzó 70°C. Seguidamente, se agregó el metilparaben, el ácido benzoico, el formaldehído, el etanol y las sales de Wesson. Posteriormente, la dieta se vertió en una plantilla de acrílico, diseñada especialmente para este fin, la cual posee perforaciones de 1 cm de profundidad por 1,2 cm de diámetro. La dieta se dejó en reposo por 10 minutos y posteriormente se retiró del molde, se llevó a congelación por 12 horas a temperatura de -80°C y lue-

go se liofilizó durante 4 y 1/2 horas. Transcurrido este tiempo la dieta se colocó en recipientes de vidrio transparente y se infestó en forma individual. Para el tratamiento de la dieta secada en estufa se siguió la metodología desarrollada por Pérez *et al.* (1995).

Con el fin de establecer el tiempo de liofilización requerido por la dieta, para obtener un porcentaje de humedad que permita la cría y desarrollo de la broca, se sometieron 30 muestras de 1 cm³ en cada tarro del liofilizador (FTS System), a diferentes tiempos de secado: 1, 2, 2.5, 3.0, 4.0 y 4.5 h. El tiempo óptimo de liofilización se obtuvo al promediar el porcentaje de humedad de cinco muestras por tratamiento utilizando un equipo analizador de humedad, (Mettler LJ16 - Moisture Analyzer). Finalizado el secado, a cada uno de los procesos se le realizó un análisis bromatológico.

Para establecer si existen cambios de humedad a través del tiempo, entre los dos sistemas empleados para el secado de las dietas, se determinó la humedad de la dieta una vez preparada y después de secada por dos horas a 40°C (secado en estufa) (Pérez *et al.* 1995), y liofilizada por 4.5 horas. Las dietas se depositaron en bandejas de aluminio, se taparon con papel vinilpel y se llevaron a condiciones de laboratorio (27°C ± 1, 75% de HR, luz constante). Diariamente y durante 20 días se determinó el porcentaje de humedad. Igualmente, se evaluaron a través del tiempo, los cambios en el contenido de humedad de las dietas liofilizadas almacenadas bajo refrigeración a 4°C y congelación a -15°C. Para esto, la dieta se fraccionó y colocó en cajas de magenta de 10x10x10 cm, con cierre hermético. Las mediciones de humedad se realizaron diariamente por un período de 20 días.

Treinta y cinco viales con un rodete de dieta de 1 cm³ se infestaron con 4 huevos de broca recién colocados, provenientes de grano pergamino con 6 días de infestación. Cada dos días se observó el desarrollo de éstos contabilizando el tiempo requerido para pasar al siguiente estadio, así como la apariencia física de los mismos. El experimento se llevó a cabo en condiciones de laboratorio a 27 ± 1°C y humedad relativa de 75%

Se utilizaron los dos sistemas de secado, estufa y liofilización, empleando vaso plástico para la dieta secada en estufa y tubo de ensayo de 5 cm de largo x 1.2 cm de diámetro para la dieta liofilizada. Las dietas se infestaron con tres brocas por vial. Los tratamientos se confinaron en cajas plásticas de 26 x 33 cm y se llevaron al cuarto de incubación a temperatura de 27 ± 1°C, humedad relativa de 75%, bajo permanente oscuridad. Las evaluaciones se realizaron 40 días después de infestada la dieta. El promedio de estados biológicos se obtuvo a partir de las unidades experimentales donde hubo progenie de broca.

Terminado el experimento se estableció el peso promedio de cada estado, tomando al azar para cada medición grupos de 10 individuos, por estado, los cuales se pesaron utilizando una balanza analítica (Mettler Toledo AE-200).

Resultados y Discusión

Tiempo de liofilización de la dieta

La utilización del molde de acrílico para la preparación de la dieta mejoró la fragilidad de la dieta y la hizo fácilmente desprendible del molde. El tiempo óptimo de liofilización fue de 4,5 horas, en el cual se consiguió una humedad de 68%. La humedad obtenida en este tiempo le permitió a la broca desarrollarse de manera eficiente tal como lo registra Pérez *et al.* (1995). La dieta para *H. hampei* requiere de una humedad que oscila entre 55-65% como lo señala Campos (1982), quien registra la mayor reproducción de la broca en el intervalo de 24.89°C a 27.79°C, con humedad relativa entre 61.1% y 79.7%. La humedad muy alta favorece el desarrollo de contaminantes en la dieta, especialmente hongos, que obstaculizan la cría del insecto y la humedad baja deteriora la calidad física de la broca, debido a la consistencia dura de la dieta que impide el inicio de la oviposición y reproducción. La importancia de la humedad ha sido confirmada en dietas variando el contenido del agua, en las cuales se ve claramente que los insectos herbívoros poseen una regulación del balance del agua para la alimentación selectiva (Reinecke 1985). Como se trata de obtener un proceso de secado con el que se prolonguen las características del producto por un tiempo mayor, el porcentaje de humedad se constituye en el parámetro más importante de control (Franco *et al.* 1983). La liofilización conserva las características químicas, aromáticas y gustativas del producto original, convirtiéndose en el método de secado óptimo para obtener productos de características estructurales, nutricionales y organolépticas muy similares a las del producto fresco (Rodríguez *et al.* 1976; Bravo y Castillo 1985), tal como se observó al hacer el análisis bromatológico de la dieta liofilizada, la cual no presentó diferencias en la composición con los ingredientes originalmente adicionados (datos no mostrados). Shade *et al.* (1986) desarrollaron un sistema de cría en semilla artificial liofilizada para *Callosobruchus maculatus*, similar al desarrollado en este estudio con resultados que permitieron criar por generaciones sucesivas este insecto y evaluar el efecto de inhibidores de Cowpea, Lima bean y Kunitz en diferentes concentraciones.

Almacenamiento de la dieta

Al evaluar la humedad de la dieta conservada a temperatura ambiente se pudo establecer que la dieta liofilizada mantiene la humedad inicial por encima de 60% por un período de 20 días mientras que la die-

ta secada en estufa presenta una humedad de 28% al final del mismo período. La reducción de la humedad de la dieta liofilizada es de 10% mientras la disminución de la humedad de la dieta secada en estufa es del 34% (Fig. 1). Cuando la dieta liofilizada se almacena tanto en refrigeración a 4°C como en congelación a -15°C se obtuvo una humedad prácticamente constante (70±2%), demostrando que el proceso de liofilización conserva la humedad inicial sin alterar la humedad final necesaria para desencadenar el proceso reproductivo de la broca (Fig. 2). Estos resultados posiblemente son debidos a que el proceso de liofilización retira el agua libre, dejando sólo el agua de constitución (Franco *et al.* 1983).

Desarrollo de la broca en dieta liofilizada

Se observó buena adaptación de los huevos a las condiciones de la dieta. Seis días después, se observó el 68,6 % de larvas de primer instar. A los 24 días, la eficiencia de la dieta fue de 94%; es decir, de los 140 huevos colocados, en las 35 unidades experimentales, se desarrollaron 131 hasta el estado adulto. El tiempo fue similar al encontrado por Ruiz *et al.* (1996), empleando la dieta Villacorta y Barrera (1993) (18-27 días) y utilizando la dieta desarrollada por Brun *et al.* 1992 (20-26 días). De acuerdo con Shade *et al.* (1986), cuando se modifican las condiciones de cría, es necesario que el insecto cumpla al menos una generación completa que evidencie el potencial de la nueva metodología para obtener un comportamiento y desarrollo normal del insecto. En general, se presentó buen desarrollo de la broca, lo que indica que la liofilización no causa ningún daño perceptible en la calidad de la dieta, aportándole todas las condiciones necesarias para que la broca se establezca y reproduzca en igual tiempo (Fig. 3). El porcentaje de contaminación fue de 4,1%, debido posiblemente a la poca disponibilidad de agua libre, la cual puede depositarse en algunos sitios e incrementar el potencial de crecimiento bacteriano (Davis 1968). La duración promedio total de huevo a adulto en dieta fue de 24 días. En campo, la evolución de las poblaciones de broca está influenciada por los elementos climáticos derivados de la altitud y en especial por la temperatura que, según Borbón (1989), juega el papel más importante en el desarrollo del insecto, determinando el número de generaciones por año. Así, el ciclo completo pasa de 29 a 62 días con una variación de tan sólo 4°C en el rango de 22 a 26°C. La duración de los diferentes estados de desarrollo de la broca depende de las condiciones ambientales bajo las cuales se lleva a cabo la cría, principalmente la temperatura. Debido a estos factores y a la falta de homogeneidad en las metodologías empleadas en los distintos ensayos, se han presentado algunas diferencias en cuanto al tiempo necesario para el desarrollo de una generación (Bartra *et al.* 1982; Montoya y

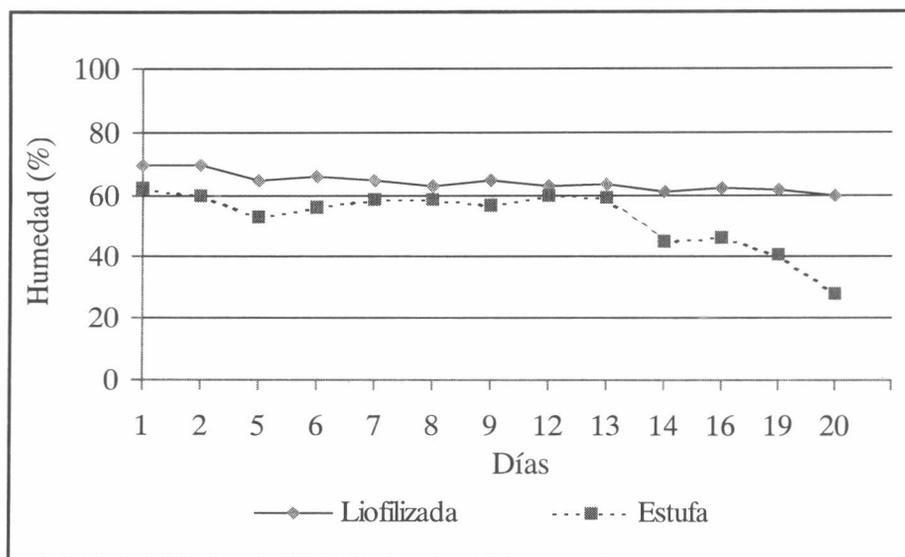


Figura 1. Fluctuación del contenido de humedad de la dieta liofilizada almacenada por veinte días a 27±2°C de temperatura.

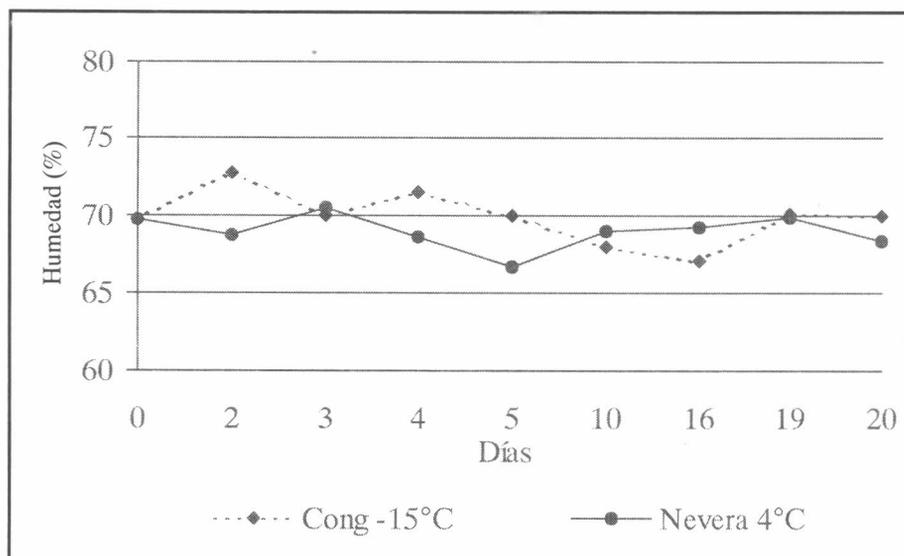


Figura 2. Variación del contenido de humedad de la dieta liofilizada almacenada a dos temperaturas.

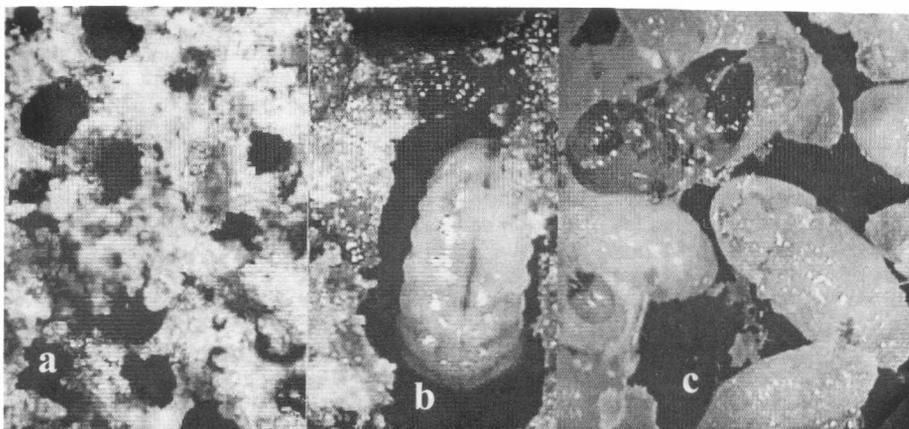


Figura 3. Aspecto del desarrollo de la broca en dieta liofilizada. a) establecimiento de *H. hampei*, b) cámara pupal, c) estados biológicos observados a los 20 días de infestación.

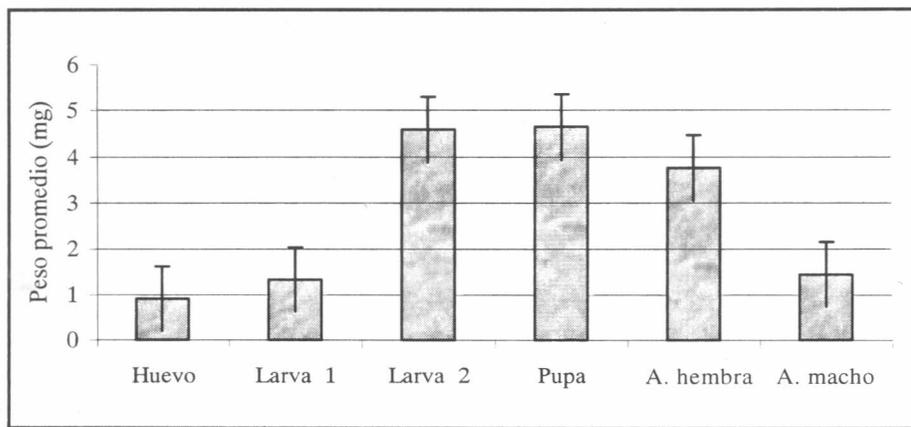


Figura 4. Peso promedio de 10 estados biológicos de broca desarrollados en dieta artificial liofilizada.

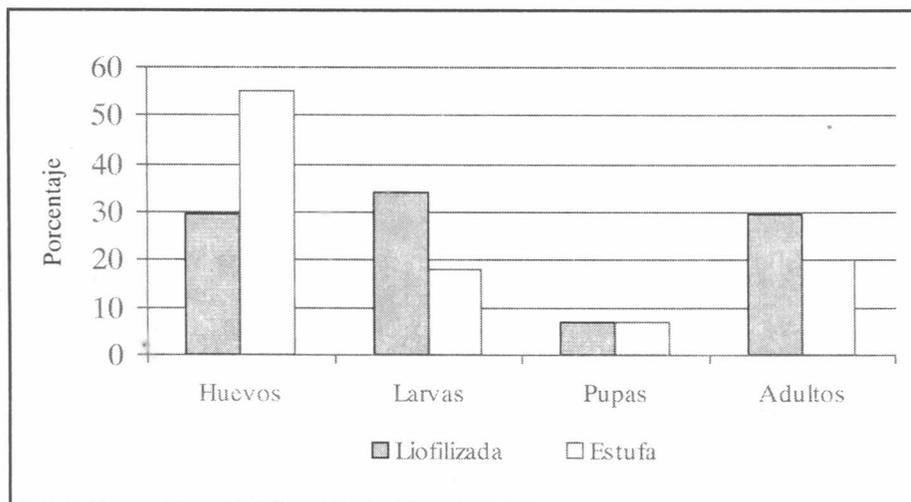


Figura 5. Porcentaje de estados biológicos de broca obtenidos en dieta artificial liofilizada a los 40 días de cría.

Cárdenas 1994; Sreedharan *et al.* 1994). Según Baker *et al.* (1992) el ciclo de vida en el laboratorio puede diferir del que ocurre en condiciones de campo (alrededor de 45 días), debido principalmente a la deshidratación del sustrato.

Peso y número de estados biológicos producidos en dieta liofilizada

La superficie de la dieta proporcionó una superficie muy suave y delgada que favoreció la rápida oviposición. Utilizando como sistema de secado la liofilización de discos de dieta, por 4,5 horas, se obtiene un promedio de estados biológicos de broca (48,31%) superior al obtenido cuando ésta se seca en estufa por 2 horas a 40°C (15,36%). Estos resultados se deben posiblemente al agua de constitución con que queda la dieta que favorece la textura proporcionando mayor digestibilidad de la dieta. Los insectos pueden presentar dificultades para alimentarse de la dieta independiente del valor nutricional de ésta.

Si la dieta es nutritiva, adecuada en contenido de agua y posee buena textura, el insecto puede ser inducido a alimentarse, dado que las propiedades físicas determinan la aceptabilidad del insecto (Vanderzant 1969). El peso promedio de 10 estados biológicos de broca en miligramos fue de 0.914 para huevos, 1.333 para larvas de primer instar, 4.46 para larvas de segundo instar, de 4.65 para pupas, de 3.767 para adultos hembras y de 1.45 para adultos machos (Fig. 4); valores con diferencias no significativas con los pesos obtenidos de los estados de broca extraídos de café pergamino seco.

La eficiencia de la cría de broca en grano pergamino seco con 45% de humedad es de 11 estados biológicos por grano (Orozco 1994); sin embargo, estudios recientes del mismo autor indican que se pueden producir más de 30 (com. pers. 1999). La producción acumulada de estados biológicos de broca, a los cuarenta días, en la dieta liofilizada fue de 1191, y

de 664 en la dieta secada en estufa. La distribución de los diferentes estados mostró una gran proporción de larvas (103), seguidas de adultos (91) en la dieta liofilizada, mientras el mayor número, en la dieta secada en estufa, correspondió a huevos (23), indicando que es más eficiente la dieta liofilizada (Fig. 5). Es posible que las características físicas y químicas de la dieta favorezcan la viabilidad y el desarrollo de la broca. Estos resultados son de gran interés ya que permitirán evaluar con mucha certeza, el efecto de proteínas con actividad tóxica hacia la broca del café, al igual que establecer un pie de cría de broca para la multiplicación de parasitoides utilizando dieta artificial liofilizada con mayores posibilidades de éxito.

Conclusiones

- Se estandarizó el proceso de liofilización para la dieta merídica, la cual permite ser almacenada en condiciones de refrigeración o congelación por períodos hasta de 20 días.
- El desarrollo de los diferentes estados biológicos producidos en esta dieta es similar en aspecto, color y forma, pero supera el número de estados producidos en dieta secada en estufa, a los 40 días de infestación.
- La disponibilidad de la dieta liofilizada hace posible la realización de bioensayos confiables y reproducibles en el momento requerido.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia y a COLCIENCIAS por el apoyo financiero recibido para la realización del experimento.

BIBLIOGRAFÍA

- BAKER, P. S.; BARRERA, J. F.; RIVAS, A. 1992. Life-history studies of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*, Scolytidae) on coffee trees in Southern Mexico. *J. of Appl. Ecology* 29 (3): 656-662.
- BARTRA, C.; URRELO, R.; RODRIGUEZ, R. 1982. Biología de la broca del café *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Scolytidae) en Tingo María Perú. *Tropicultura* (Perú) 2(1): 17-31.
- BORBON M., O. 1989. Bioecologie d'un ravageur des baies de cafeeier *Hypothenemus hampei* (Ferr.) (Coleoptera: Scolytidae) et de ses parasitoides au Togo, Toulouse (Francia) Université Paul Sabatier de Toulouse, 1989 (Tesis doctorado). 185p
- BRAVO P., S.; CASTILLO L., M.C. 1985. Comparación y análisis de propiedades de un secado por liofilización y/o por otros métodos. Universidad INCCA de Colombia, Facultad de Ciencias Técnicas (Trabajo de Grado Ingeniero de Alimentos). 188p.
- BRUN, L.O.; GAUDICHON, V.; WIGLEY, P.J. 1992. An artificial diet for continuous rearing of the coffee berry borer, *Hypothenemus*

- hampei* (Ferrari), (Coleoptera: Scolytidae). Insect Science and its Applications (Kenya) 14 (5/6): 585-587.
- CAMPOS A., O. G. 1982. Evaluación de hábitos de la broca del fruto del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari), en campo. En: Simposio Latinoamericano sobre Caficultura, 5. San Salvador (El Salvador), 20-22 de octubre.
- DAVIS, G.R.F. 1968. Phagoestimulation and consideration of its role in artificial diets. Bulletin Entomological Society of America 14: 27-30.
- FRANCO J., M. A.; PALOMEQUE A., C. A.; POPAINL, R. 1983. La liofilización: Un aporte al desarrollo tecnológico industrial. Bogotá (Colombia), Universidad INCCA de Colombia, Escuela de Ingeniería Industrial (Trabajo de Grado Ingeniero Industrial), 144p.
- GOMAA, A. A.; SHAARAWY, M. F.; SALEM, Y. S.; RISK, M. A. 1977. Effect of dietary constituents on the biology of silkworm *Bombyx mori*. Part 2, Vitamins. Z. Angew Zoology 64: 231-240.
- GRENIER, S.; HAN, S. C.; CHAPELLE, L.; LIU, W. H.; GUILLAUD J. 1998. *In vitro* development of *Trichogramma* spp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in long-term stored, freeze-dried artificial media. Biocontrol Science and Technology 8: 589-596.
- HOWELL, J.F. 1977. Codling Moth: Agar substitutes in artificial diets USDA ARS BULL. W-43. 1-9.
- MONTOYA O., S.A.; CARDENAS M., R. 1994. Biología de *Hypothenemus hampei* (Ferrari) en frutos de café de diferentes edades. Cenicafé (Colombia) 45 (1): 5-13.
- NAVON, A. 1978. Effects of dietary ascorbic acid on larvae of the Egyptian cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*. J. Insect Physiology 24: 39-44.
- NETTLES, W. C.; WILSON, C. M.; ZISER, S. W. 1990. A diet and methods for the in vitro rearing of the Tachinid, *Eucelatoria* sp. Ann. Entomol. Soc. Amer. 73: 180-184.
- OROZCO, J. H. 1994. Efecto del contenido de humedad inicial del grano pergamino sobre el desarrollo de *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). Resúmenes XXI Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología (SOCOLEN) Medellín (Colombia), julio 27-29 p. 56.
- PEREZ, E. J.; BUSTILLO, A. E.; GONZÁLEZ, M. T.; POSADA, F. J. 1995. Comparación de dos dietas merídicas para la cría de *Hypothenemus hampei*. Cenicafé (Colombia) 46(4): 189-195.
- REINECKE J.P. 1985. Artificial diets. In: Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Eds. Kerkut and Gilbert. Pergamon Press (Eds.) p 391-419.
- RODRIGUEZ, J.F.; POTTS, M.F.; RODRIGUEZ, L.D. 1976. Comparative food utilization of coffee bean weevil larvae on a new freeze-dried diet and green coffee beans. J. Insect Physiology 22: 1305-1308.
- RUIZ S.L.; BUSTILLO P., A.E.; POSADA F., F.J.; GONZALEZ G., M.T. 1996. Ciclo de vida de *Hypothenemus hampei* en dos dietas merídicas. Cenicafé (Colombia) 47 (2): 77-84.
- SHADE, R.E.; MURDOCK, L.L.; FOARD, D.E.; POMEROY, M.A. 1986. Artificial seed system for bioassay of *Cowpea Weevil* (Coleoptera: Bruchidae) growth and development. Environ. Entomol. 15: 1286-1291.
- SICOROWSKI, P. P.; KENT, A. D.; LINDIG, O. H.; WIYGUL, G.; ROBERSON, J. 1980. Laboratory and insectary studies on the use of antibiotics and antimicrobial agents in mass rearing of boll weevils, *Anthonomus grandis*. J. Econ. Entomol. 73: 106-110.
- SREEDHARAN, K.; BALAKRISHNAN, M. M.; PRAKASAN, C. B.; KRISHNA MOORTHY, B.P.; NAIDU, R. 1994. Bio-ecology and management of coffee berry borer. Indian Coffee 58 (8): 5-13.
- SRIVASTAVA, B. G.; PANT, N. C. 1978. Carbohydrate requirement of *Dacus cucurbitae* maggots under aseptic conditions. Indian J. Entomol. 40: 150-155.
- VANDERZANT, E. S. 1969. Physical aspects of artificial diets. Entomol. Exp. Applicata 12: 642-650.
- VILLACORTA, A. 1985. Dieta merídica para criação de sucessivas gerações de *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Scolytidae). Anais da Sociedade Entomologica do Brasil 14 (2): 315-319.
- VILLACORTA, A.; BARRERA, J.F. 1993. Nova dieta merídica para criação de *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). Anais da Sociedade Entomologica do Brasil 22 (2): 405-409.