

# DIFERENCIACIÓN GENÉTICA Y BIOLÓGICA DEL PARASITOIDE DE LA BROCA DEL CAFÉ, *Prorops nasuta*, EN COLOMBIA

Carlos Ernesto Maldonado-Londoño\*, Pablo Benavides-Machado\*\*

---

## RESUMEN

**MALDONADO L., C.E.; BENAVIDES M., P. Diferenciación genética y biológica del parasitoide de la broca del café, *Prorops nasuta*, en Colombia. Revista Cenicafé 62 (2): 41-57. 2011**

El control biológico es uno de los mayores componentes del programa de manejo integrado de la broca del café en Colombia. En 1989 y 1990 se introdujeron al país los parasitoides betílidos *Prorops nasuta* y *Cephalonomia stephanoderis*, dando inicio a su cría masiva y liberación en cafetales afectados. Con el propósito de comparar la variabilidad biológica de *P. nasuta* en términos de capacidad de depredación, parasitismo y longevidad, así como para la determinación de su variabilidad genética por medio de la técnica AFLP, se recolectaron muestras de café con broca parasitada, en siete departamentos de Colombia, y se establecieron crías de *P. nasuta* de acuerdo al origen geográfico. Por medio de pruebas moleculares se encontraron estrechas relaciones intraespecíficas al comparar los individuos establecidos en el país con muestras provenientes de Brasil y México. Se encontró un polimorfismo de 62% y una débil estructura de poblaciones lo que sugiere que la diversidad genética se debió posiblemente a un cruce entre las introducciones del parasitoide en las crías en laboratorio y no a la presión de selección a la que se sometieron en el campo, siendo la línea colombiana diferente a las establecidas en Brasil y México. Aunque en las caracterizaciones biológicas los parasitoides de la unidad de cría de Cenicafé mostraron mejor comportamiento seguida por una población de Nariño, la similitud genética entre las poblaciones no permitió establecer diferencias. Con estos resultados, cualquier estrategia de mejoramiento genético de los parasitoides en Colombia deberá incluir nuevas introducciones de poblaciones divergentes.

**Palabras clave:** Control biológico, *Hypothenemus hampei*, Biología, AFLP, Cría de insectos.

---

## ABSTRACT

Biological control is one of the major components of the Integrated Pest Management Program of coffee berry borer in Colombia. The bethylid parasitoids *Prorops nasuta* and *Cephalonomia stephanoderis* were introduced to the country in 1989 and 1990, a time during which a mass rearing and release program began in affected coffee plantations. In order to compare the biological variability of *P. nasuta* in terms of predation capacity, parasitism, and longevity as well as to determine genetic variability by the AFLP technique, coffee samples were collected with parasitized berry borer in seven departments of Colombia, and *P. nasuta* colonies were set according to geographical origin. Narrow intraspecific relationships were found through molecular tests when comparing the individuals established in the country with samples from Brazil and Mexico. A polymorphism of 62% and a weak population structure were found, which suggests that genetic diversity is possibly due to a cross between the introductions of the parasitoid in the offspring in laboratory rather than the selection pressure under field conditions. The Colombian population proved to be different from that in Brazil and Mexico. Although the parasitoids biological characterizations of the Cenicafé rearing unit showed better performance followed by a population of Nariño, the genetic similarity between populations did not allow to establish differences. These results suggest that any parasitoids breeding strategy in Colombia must include new introductions of divergent populations.

**Keywords:** Biological control, *Hypothenemus hampei*, Biology, AFLP, Insect Rearing.

---

\* Asistente de Investigación. Mejoramiento Genético. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé.

\*\* Investigador Científico II. Entomología. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Manizales, Caldas, Colombia.

La broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), es considerada la plaga más importante de este cultivo a nivel mundial, debido a que ocasiona la caída de frutos, la pérdida de peso del grano, la disminución del precio y el deterioro de la calidad (6, 14, 34).

Desde la llegada de la broca a Colombia, en 1988, al departamento de Nariño, el Centro Nacional de Investigaciones de Café - Cenicafé, comenzó a estructurar un programa de manejo integrado de este insecto, teniendo como uno de sus pilares básicos el control biológico. De esta manera, se introdujeron al país tres especies de parasitoides de alta especificidad a la broca, originarias de África ecuatorial: *Prorops nasuta* Waterston, *Cephalonomia stephanoderis* Betrem y *Phymastichus coffea* La Salle, las dos primeras pertenecientes a la familia Bethyilidae y la última a la familia Eulophidae (10).

La primera especie introducida a Colombia, entre 1989 y 1990, fue *C. stephanoderis*, proveniente de una colonia mantenida en Ecuador y de muestras recolectadas en Togo, para lo cual se estandarizó una metodología de cría exitosa en los laboratorios ubicados en el departamento de Nariño (40). Durante 1990 se comenzó la cría de *P. nasuta*, en el mismo laboratorio, con individuos enviados desde Ecuador, los cuales eran originarios de Kenia (8, 26). En 1996, las crías de parasitoides mantenidas en Nariño se trasladaron a los laboratorios de Cenicafé (Manizales, Caldas) y se realizó una nueva introducción de *P. nasuta* desde Brasil, donde la especie había sido llevada en 1929 desde Uganda (37, 46).

La invasión de la broca del café en Colombia fue rápida, para 1997 la plaga se encontraba en el 75% de los cultivos de

café en Colombia (5), y de acuerdo a su dispersión se difundió el manejo integrado a las zonas productoras afectadas. Las primeras liberaciones de los parasitoides en el campo se realizaron en Nariño, empezando con *C. stephanoderis* en 1990 y en 1991, con cantidades menores de *P. nasuta* (7, 11). Entre 1994 y 2000 se liberaron en cultivos de café, de 17 departamentos de Colombia, un poco más de 1.845 millones de *C. stephanoderis*, y entre 1997 y 2000, cerca de 516 millones de *P. nasuta* (25, 38).

No todas las especies de parasitoides introducidas en programas de control biológico clásico se establecen, de 4.769 introducciones realizadas en el mundo hasta 1990, solamente se establecieron 1.445 (19). En el control de la broca del café, las dos especies de la familia Bethyilidae se han registrado establecidas en Brasil (15, 46, 51), Ecuador (33) y Honduras (47, 48). En México se estableció *C. stephanoderis*, mientras que la permanencia en el campo de *P. nasuta* no fue superior a 15 días (4, 22, 24). Algunos autores han considerado que *C. stephanoderis* es el parasitoide más eficiente para el control biológico de la broca del café (4, 28), registrándose en Togo mortalidades de broca en el campo entre 35% a 45% (9), y además, por su capacidad de establecimiento en los países latinoamericanos incluyendo a Colombia (7, 11, 43). Sin embargo, en Colombia, 5 años después de la primeras liberaciones de los betílidos en Nariño, se demostró su establecimiento en el campo, pero siendo superior *P. nasuta* que *C. stephanoderis* en términos de presencia en los lotes muestreados, niveles de parasitismo y adaptación a intervalos altitudinales (41). Después de 15 años del inicio de las liberaciones de parasitoides en Colombia, sólo se encontró a *P. nasuta* establecido en el campo, en el 65% de los sitios de muestreo que cubrieron siete departamentos, desde Nariño hasta Cesar (31).

Se registraron niveles de parasitismo entre 0,25% y 50%, en cafetales con condiciones contrastantes de oferta ambiental y de manejo del cultivo, como evidencia de la alta capacidad de adaptación de esta especie al ecosistema cafetero colombiano (30, 31, 42). Adicionalmente, el establecimiento de la especie pudo haberse favorecido por la presencia de hospedantes alternos, ya que se ha registrado en Colombia a *P. nasuta* parasitando *Hypothenemus obscurus* (F.).

La mayor parte de las introducciones de controladores biológicos involucran un gran número de individuos, con el propósito de reducir la pérdida de variabilidad genética asociada al tamaño de la población, sin embargo, esa muestra inicial se reduce en los procesos de cuarentena, cría y establecimiento en el campo (21, 49). En la introducción pueden ocurrir problemas relacionados con efectos fundadores, deriva genética, endogamia y baja adaptación al ambiente (20). Así mismo la epistasia puede incrementar la variación genética aditiva en estas introducciones (12, 17, 18) y los efectos fundadores pueden estar relacionados con diferenciación de poblaciones y especiación (3, 13, 16).

Para determinar la variabilidad genética de especies que no han sido estudiadas desde el enfoque de la biología molecular, debe trabajarse con marcadores que no requieran conocimiento previo de secuencias nucleotídicas y que aporten suficiente información. Una técnica apropiada es la detección de polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificadas (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*, AFLP) (53). Esta técnica ha demostrado tener la suficiente sensibilidad y ser una herramienta poderosa para distinguir genotipos de diferentes orígenes geográficos y proveer suficientes marcadores moleculares para la caracterización de genomas de insectos (32, 39).

Con el propósito de establecer si la presión de selección a la que se ha sometido *Prorops nasuta* en Colombia ha conducido a variaciones adaptativas, se caracterizó genética y biológicamente el parasitoide establecido en el campo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se llevó a cabo en los laboratorios del Centro Nacional de Investigaciones de Café - Cenicafé, en Planalto (Manizales, Caldas).

Se recolectaron muestras en 80 fincas cafeteras, de 62 veredas y 17 municipios, en los departamentos de Nariño, Valle, Quindío, Risaralda, Caldas, Norte de Santander y Cesar (Tabla 1). Cada muestra estuvo conformada por al menos 200 frutos de café infestado por broca, recolectados mediante un muestro al azar, en un recorrido en zigzag, en un lote de cada finca. Los granos de café brocados se trasladaron al laboratorio de Entomología de Cenicafé, donde se disecaron, extrayendo los diferentes estados biológicos de la broca así como los parasitoides encontrados en las muestras. El acercamiento taxonómico a nivel de especie, de los parasitoides encontrados en los granos, se basó en características morfológicas del insecto adulto, siendo uno de los caracteres diagnósticos de la especie *Prorops nasuta* la presencia de un proceso bífido por encima de las inserciones antenales y el cípeo, y para *Cephalonomia stephanoderis* la ausencia de éste y de la vena radial (44).

De cada uno de los granos de café infestados por broca, parasitados por *P. nasuta*, se tomó el 50% de los estados del parasitoide y se almacenaron en tubos de microcentrifuga con etanol absoluto a temperatura ambiente, para la extracción del ADN y posterior caracterización genética. Con

**Tabla 1.** Muestras utilizadas para el desarrollo de las pruebas AFLP y porcentaje de polimorfismo por finca, para cuatro combinaciones de *primers*.

| Departamento       | Municipio           | Muestras     |    | No. total de bandas | No. de bandas polimórficas | Polimorfismo |
|--------------------|---------------------|--------------|----|---------------------|----------------------------|--------------|
|                    |                     | Código finca | n  |                     |                            |              |
| Nariño             | Sandoná             | SndSoc       | 5  | 92                  | 19                         | 20,65%       |
| Nariño             | Sandoná             | SndEme       | 6  | 94                  | 29                         | 30,85%       |
| Nariño             | Sandoná             | SndEdel      | 4  | 93                  | 23                         | 24,73%       |
| Nariño             | Sandoná             | SndSaJo      | 5  | 91                  | 14                         | 15,38%       |
| Nariño             | Sandoná             | SndExB       | 4  | 94                  | 16                         | 17,02%       |
| Nariño             | Ancuyá              | AncRRO       | 5  | 94                  | 17                         | 18,09%       |
| Nariño             | Ancuyá              | AncEWH       | 5  | 95                  | 18                         | 18,95%       |
| Nariño             | Ancuyá              | AncPRos      | 5  | 93                  | 14                         | 15,05%       |
| Nariño             | Ancuyá              | AncLoma      | 5  | 94                  | 15                         | 15,96%       |
| Nariño             | Ancuyá              | AncTdLp      | 5  | 95                  | 16                         | 16,84%       |
| Nariño             | Consacá             | CnMarC       | 5  | 91                  | 15                         | 16,48%       |
| Nariño             | Consacá             | CnJoTr       | 5  | 89                  | 19                         | 21,35%       |
| Nariño             | Consacá             | CnBom        | 5  | 95                  | 21                         | 22,11%       |
| Nariño             | Consacá             | CnSPed       | 5  | 94                  | 14                         | 14,89%       |
| Nariño             | Consacá             | CnVIne       | 5  | 95                  | 15                         | 15,79%       |
| Nariño             | La Unión            | LUNar1       | 1  | 87                  | -                          | -            |
| Valle              | Pance               | PV           | 2  | 86                  | 17                         | 19,77%       |
| Quindío            | Quimbaya            | QbyBA        | 7  | 80                  | 22                         | 27,50%       |
| Quindío            | Quimbaya            | QbyMal       | 1  | 81                  | -                          | -            |
| Quindío            | Quimbaya            | QbyVHol      | 9  | 95                  | 26                         | 27,37%       |
| Quindío            | Quimbaya            | QbyMar1      | 1  | 80                  | -                          | -            |
| Quindío            | Quimbaya            | QbyTach1     | 1  | 81                  | -                          | -            |
| Quindío            | Quimbaya            | QbyGra1      | 1  | 76                  | -                          | -            |
| Quindío            | Quimbaya            | QbyEst1      | 1  | 76                  | -                          | -            |
| Quindío            | Buenavista          | BvisSAlb1    | 1  | 81                  | -                          | -            |
| Risaralda          | Pereira             | RdaCzal      | 3  | 92                  | 20                         | 21,74%       |
| Risaralda          | Pereira             | RdaMrey      | 9  | 97                  | 29                         | 29,90%       |
| Caldas             | Chinchiná           | ChBA         | 10 | 96                  | 26                         | 27,08%       |
| Caldas             | Palestina           | PalStaA      | 7  | 90                  | 26                         | 28,89%       |
| Caldas             | Palestina           | PalMesa      | 6  | 96                  | 22                         | 22,92%       |
| Caldas             | Palestina           | PalTolu      | 10 | 93                  | 19                         | 20,43%       |
| Caldas             | San José            | SJLU         | 4  | 93                  | 19                         | 20,43%       |
| Norte de Santander | Pamplonita          | PamBl        | 4  | 94                  | 5                          | 5,32%        |
| Norte de Santander | Pamplonita          | PamChi       | 7  | 95                  | 20                         | 21,05%       |
| Norte de Santander | Chinácota           | ChntIns      | 6  | 94                  | 11                         | 11,70%       |
| Norte de Santander | Chinácota           | ChntAmp      | 2  | 92                  | 11                         | 11,96%       |
| Cesar              | La Jagua de Ibirico | JagDel       | 2  | 89                  | 12                         | 13,48%       |
| Cesar              | La Jagua de Ibirico | JagPor1      | 1  | 84                  | -                          | -            |

la población restante se establecieron crías en confinamiento, agrupando las muestras provenientes de cada departamento, con el fin de determinar la variabilidad biológica.

**Variabilidad biológica de *Prorops nasuta* establecido en Colombia.** Para la caracterización biológica de *P. nasuta* se incrementó el número de individuos proveniente de cada una de las regiones. Se establecieron crías individuales del parasitoide para los departamentos de Quindío, Caldas, Norte de Santander, y dos poblaciones independientes del departamento de Nariño, con los parasitoides de los municipios de Sandoná y Consacá, considerando que en Nariño se realizaron las primeras liberaciones de estos parasitoides y quizás éstas contengan las poblaciones originales de manera aislada. Posterior a la disección de los frutos, se reunieron los adultos de *P. nasuta* de cada región y se llevaron a recipientes plásticos tapados con muselina, junto con granos de café pergamino seco de agua, con 19 a 22 días después de ser infestados con broca, en una relación de dos granos brocados por un adulto de *P. nasuta*.

Las crías se mantuvieron en completa oscuridad a una temperatura de 25°C, con una humedad relativa mínima del 70%, siguiendo la descripción de cría de Bustillo *et al.* (11). Después de 24 días los granos parasitados se llevaron a cámaras de emergencia, donde los adultos de *P. nasuta* fueron recolectados mediante estímulos lumínicos. Los individuos emergidos se recolectaron diariamente.

La caracterización de la variabilidad biológica de *P. nasuta* consistió en la determinación del porcentaje de parasitismo, la capacidad de depredación y la longevidad de

los parasitoides de las poblaciones regionales (Quindío, Caldas, Norte de Santander, Consacá y Sandoná) y de la población proveniente de la cría de Cenicafé (línea Cenicafé mantenida en Chinchiná por la empresa Biocafé). Con la caracterización se establecieron diferencias de adaptación del parasitoide.

**Porcentaje de parasitismo.** El porcentaje de parasitismo se definió como el promedio porcentual de frutos infestados por broca que fueron parasitados por los adultos colonizadores, para lo cual se tomó como unidad de muestreo cinco hembras del parasitoide, con 25 granos de café pergamino seco de agua, con una sola perforación, contenidos en frascos de vidrio con tapa perforada. Cada cría se evaluó con 30 unidades de muestreo a los 20 días, con la variable porcentaje de frutos con estados de broca parasitados por *P. nasuta*. Se contó con un testigo sin parasitoides para corroborar que no existiese parasitismo previo.

**Longevidad de *Prorops nasuta* depredando adultos de broca y su capacidad de depredación de estados inmaduros.** Para determinar la capacidad de depredación de adultos de broca, se tomó como unidad de muestreo una hembra del parasitoide, con 30 brocas adultas depositadas en un tubo con papel en trozos. Para cada una de las crías del parasitoide se establecieron 30 repeticiones. El número de brocas muertas se cuantificó diariamente hasta la muerte del parasitoide. Se contó con un testigo de igual número de brocas y unidades de muestreo para determinar la mortalidad natural. Se determinó el porcentaje de mortalidad por el parasitoide corregido por el testigo, utilizando la fórmula de Schneider – Orelli (45), donde:

$$\text{Mortalidad Corregida} = \frac{\% \text{ Mortalidad Tratamiento} - \% \text{ Mortalidad Testigo}}{100 - \% \text{ Mortalidad Testigo}} \times 100$$

Para la determinación de la capacidad de depredación de huevos y larvas de primer instar de broca se tomó como unidad de muestreo una hembra del parasitoide junto con 50 huevos de broca, en una caja Petri. Para cada cría se establecieron 30 repeticiones. Diariamente, se registró el número de estados depredados hasta que el parasitoide hubiera consumido la totalidad de los estados de broca o hasta la muerte del mismo, estableciendo el porcentaje acumulado de estados depredados por día, para cada una de las crías evaluadas. Se estableció la tasa diaria de depredación de estados inmaduros de broca mediante regresión lineal simple.

**Longevidad de *Prorops nasuta* depredando estados inmaduros de broca.** Para evaluar la longevidad del parasitoide alimentándose de estados inmaduros de broca, se establecieron 20 repeticiones, donde cada unidad de muestreo consistió en una hembra del parasitoide recién emergida ubicada en un recipiente plástico de 100 mL, donde cada 3 días se le suministraron larvas y prepupas de broca para su alimentación, de acuerdo a metodología de Infante *et al.* (23). Se registró el tiempo de supervivencia del parasitoide en días.

Todos los bioensayos fueron establecidos bajo un diseño experimental completamente aleatorio. Se realizaron análisis de varianza para establecer diferencias estadísticas entre las poblaciones de *P. nasuta*, y se realizaron comparaciones mediante prueba de Duncan al 5%.

**Variabilidad genética de *Prorops nasuta*.** Para el análisis de la variabilidad genética se seleccionaron 187 muestras (Tabla 1). Cada muestra consistió en los individuos del parasitoide presentes en granos de café infestados parasitados. Se obtuvieron con propósitos de comparación genética tres muestras de Brasil, cuatro de México y

diez de la cría Cenicafé. La extracción del ADN genómico se realizó utilizando el producto DNeasy Tissue Kit (Qiagen Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad de la extracción se determinó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% y su concentración se determinó por espectrofotometría y fluorometría.

El nivel de polimorfismo intraespecífico de *P. nasuta* se determinó por medio de la técnica de polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (*Amplified fragment length polymorphisms*, AFLP) (53), utilizando el producto comercial AFLP® *Analysis System II* (Invitrogen™), siguiendo las instrucciones del fabricante, sin la utilización de marcaje radioactivo. Los productos de PCR se separaron en geles de poliacrilamida (acrilamida-bisacrilamida (19:1) 5%, urea 7 M, TBE 0.5X) y se revelaron por tinción con nitrato plata. Para seleccionar las combinaciones de *primers Eco RI* y *MseI* para las amplificaciones selectivas, se tomaron cuatro muestras de diferentes orígenes recolectadas en los municipios de Chinácota (Norte de Santander), La Unión (Nariño), Consacá (Nariño) y Palestina (Caldas), y cada una se amplificó con 40 combinaciones de *primers*. Se determinó el porcentaje de polimorfismo entre el número de bandas polimórficas del total de bandas amplificadas y se eligieron las cuatro combinaciones de *primers* que generaron los mayores niveles de polimorfismo para la amplificación selectiva del total de muestras. Los geles se digitalizaron y se construyó una matriz binaria de presencia (uno) y ausencia (cero) para los loci evaluados, asumiendo que los fragmentos de ADN de cadena sencilla que migraron a igual distancia en el gel fueron de secuencia idéntica. Con esta información se estableció el porcentaje de polimorfismo por niveles: finca, municipio, departamento y país, como la relación entre el número

de bandas polimórficas y el número total de bandas evaluadas. La similitud genética entre las muestras según su perfil AFLP se calculó utilizando el modelo de distancias de Nei y Li (36), a partir del cual se generó un dendrograma utilizando el método de la media aritmética no ponderada (UPGMA) con “Bootstrap” de 1.000 permutaciones por medio del programa Treecon 1.3b (50). Se utilizó también la similitud genética entre las muestras de los departamentos evaluados en este estudio y las obtenidas con fines de comparación genética calculando las distancias genéticas de Nei (35), después de estimar las frecuencias alélicas según el procedimiento de Lynch y Milligan (29) por medio del programa AFLP-SURV 1.0 (52). A partir de esta matriz de distancia se graficó un dendrograma utilizando el método UPGMA por medio del programa MEGA 3.0 (27).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Variabilidad biológica de *Prorops nasuta* establecido en Colombia

**Porcentaje de parasitismo.** El análisis de varianza para la variable porcentaje de

parasitismo bajo el diseño completamente aleatorio mostró diferencias significativas entre las poblaciones del parasitoide proveniente de los orígenes geográficos. La comparación Duncan al 5% reveló diferencias significativas entre la población de Cenicafé y Norte de Santander, y de éstas con respecto a las demás poblaciones (Tabla 2). La cría que presentó el mayor parasitismo fue la población mantenida en Biocafé (Cenicafé), donde se observó en promedio 1,1 granos infestados parasitados por el parasitoide, y un máximo de 1,6 granos. De los departamentos evaluados, el mayor parasitismo se obtuvo en Norte de Santander. Los resultados de esta variable permiten sugerir que *P. nasuta* tiene la capacidad de parasitar más de un grano de café brocado.

### Longevidad de *Prorops nasuta* depredando adultos de broca y su capacidad de depredación de estados inmaduros.

Se observó la depredación de adultos de broca inmediatamente se liberaron los parasitoides. *P. nasuta* decapitó la broca con sus mandíbulas por la región membranosa entre los escleritos pro y mesotorácicos, alimentándose de su hemolinfa. El análisis de varianza bajo el diseño completamente

**Tabla 2.** Porcentaje de granos infestados por broca parasitados por *Prorops nasuta* y porcentaje de depredación de adultos de broca por el parasitoide de acuerdo a las regiones geográficas evaluadas.

| Origen             | N   | Porcentaje de parasitismo (%) |           |                | Porcentaje de depredación de adultos de broca (%) |           |                |
|--------------------|-----|-------------------------------|-----------|----------------|---------------------------------------------------|-----------|----------------|
|                    |     | Máximo                        | Promedio* | Error Estándar | Máximo                                            | Promedio* | Error Estándar |
| Cenicafé           | 30  | 32                            | 22,13 A   | 1,03           | 96,10                                             | 54,29 A   | 5,54           |
| Norte de Santander | 30  | 32                            | 18,13 B   | 0,87           | 75,53                                             | 31,30 B   | 4,36           |
| Caldas             | 30  | 32                            | 14,13 C   | 0,95           | 87,00                                             | 47,66 A   | 4,41           |
| Quindío            | 30  | 24                            | 13,86 C   | 0,59           | 95,11                                             | 50,75 A   | 4,89           |
| Sandoná            | 30  | 24                            | 14,93 C   | 1,13           | 92,08                                             | 45,42 A   | 4,61           |
| Consacá            | 30  | 20                            | 13,60 C   | 0,70           | 90,38                                             | 42,71 AB  | 4,11           |
| Total              | 180 | 32                            | 16,13     | 0,43           | 96,10                                             | 45,36     | 1,96           |

\* Promedios seguidos por letras diferentes indican diferencias estadísticas según la prueba Duncan al 5%.



aleatorio reveló diferencias significativas entre los orígenes geográficos estudiados para la variable porcentaje de adultos depredados por un individuo del parasitoide. Se encontraron diferencias significativas entre la población de Norte de Santander con respecto a las demás (Tabla 2), con el menor promedio de depredación de adultos (9 brocas con un máximo de 23). En el mejor de los casos, un solo individuo del parasitoide fue capaz de depredar 29 adultos de brocas, lo que confirma la capacidad de este parasitoide de regular poblaciones de broca en el campo. Hubo diferencias estadísticas, a un nivel de 5%, en la longevidad de los parasitoides adultos, alimentándose exclusivamente de adultos de broca; la longevidad del parasitoide en las condiciones del bioensayo alcanzó un valor máximo de 8 días para la población de parasitoides de la cría Cenicafé (Tabla 3), la cual fue mayor comparado con pruebas realizadas en México donde la longevidad promedio fue de 2,2 días con un máximo de 6 días (23). El mayor promedio para esta variable se encontró en la cría Cenicafé con 4,9 días. Las crías de Norte de Santander y Quindío mostraron los valores más bajos de longevidad.

Las depredación de estados inmaduros de broca por *P. nasuta* ocurrió en 6 a 7 días, tiempo en el cual un parasitoide consumió los 50 estados de broca que contenía las unidades experimentales. El análisis de varianza, bajo el diseño experimental completamente aleatorio, indicó diferencias estadísticas entre las regiones geográficas evaluadas y la prueba de comparación de Duncan al 5% mostró una mayor depredación en la cría de Sandoná (Tabla 4). Por medio de un análisis de regresión lineal simple se estimó la tasa diaria de depredación, de tal manera que la cría de Sandoná presentó una tasa de depredación de ocho estados por día.

**Longevidad de *Prorops nasuta* depredando estados inmaduros de broca.** El análisis de varianza, bajo el diseño experimental completamente aleatorio al 5%, mostró diferencias significativas entre las poblaciones de *P. nasuta* estudiadas en la variable longevidad depredando estados inmaduros de broca. La mayor longevidad se observó en la población mantenida en Cenicafé, según prueba de comparación de promedios de Duncan al 5% (Tabla 3). La menor longevidad se presentó en la población de Consacá. En estas crías se alcanzó una longevidad máxima

**Tabla 3.** Longevidad de *Prorops nasuta* depredando adultos y estados inmaduros de la broca del café.

| Origen             | n   | Longevidad de <i>P. nasuta</i> depredando adultos de Broca |         |      | Longevidad de <i>P. nasuta</i> depredando larvas y prepupas de broca |      |         |      |
|--------------------|-----|------------------------------------------------------------|---------|------|----------------------------------------------------------------------|------|---------|------|
|                    |     | Máx.                                                       | Prom.   | E.E. | n                                                                    | Máx. | Prom.   | E.E. |
| Caldas             | 30  | 7                                                          | 3,86 B  | 0,25 | 20                                                                   | 77   | 33,2 BC | 5,03 |
| Cenicafé           | 30  | 8                                                          | 4,86 C  | 0,39 | 20                                                                   | 74   | 46,25 D | 4,12 |
| Consacá            | 30  | 7                                                          | 4,3 BC  | 0,31 | 20                                                                   | 18   | 8,15 A  | 1,10 |
| Norte de Santander | 30  | 5                                                          | 2,73 A  | 0,22 | 20                                                                   | 70   | 21,35 B | 3,94 |
| Quindío            | 30  | 5                                                          | 3 A     | 0,21 | 20                                                                   | 71   | 24,7 B  | 5,54 |
| Sandoná            | 30  | 6                                                          | 4,16 BC | 0,31 | 20                                                                   | 77   | 40,1 CD | 4,85 |
| Total              | 180 | 8                                                          | 3,82    | 0,13 | 120                                                                  | 77   | 28,95   | 2,08 |

\* Promedios seguidos por letras diferentes indican diferencias estadísticas según la prueba Duncan al 5%. Máx.: Máximo; Prom.: Promedio; E.E.: Error estándar.



**Tabla 4.** Porcentaje de depredación de estados inmaduros de broca por *Prorops nasuta* establecido en regiones cafeteras en Colombia.

| Origen             | n   | Prom. <sup>+</sup> | E.E.    | Modelo*                | R <sup>2</sup> |
|--------------------|-----|--------------------|---------|------------------------|----------------|
| Caldas             | 30  | 80,13 A            | 4,04791 | $y = 5,9827x + 4,2405$ | 0,9993         |
| Cenicafé           | 30  | 81,46 AB           | 4,29374 | $y = 5,8499x + 6,6389$ | 0,9612         |
| Consacá            | 30  | 84,40 AB           | 3,10787 | $y = 6,3719x + 5,8003$ | 0,9987         |
| Norte de Santander | 30  | 82,66 AB           | 4,73124 | $y = 7,91x - 4,0771$   | 0,9718         |
| Quindío            | 30  | 76,06 A            | 4,51764 | $y = 6,2831x + 5,1601$ | 0,9774         |
| Sandoná            | 30  | 92,40 B            | 1,79245 | $y = 7,8918x - 4,783$  | 0,9558         |
| Total              | 180 | 82,85              | 1,61    |                        |                |

+ Promedios seguidos por letras diferentes indican diferencias estadísticas según la prueba Duncan al 5%. \*Para el modelo “y” es la depredación en términos de “x” que es el tiempo en días. Prom.: Promedio; E.E.: Error estándar

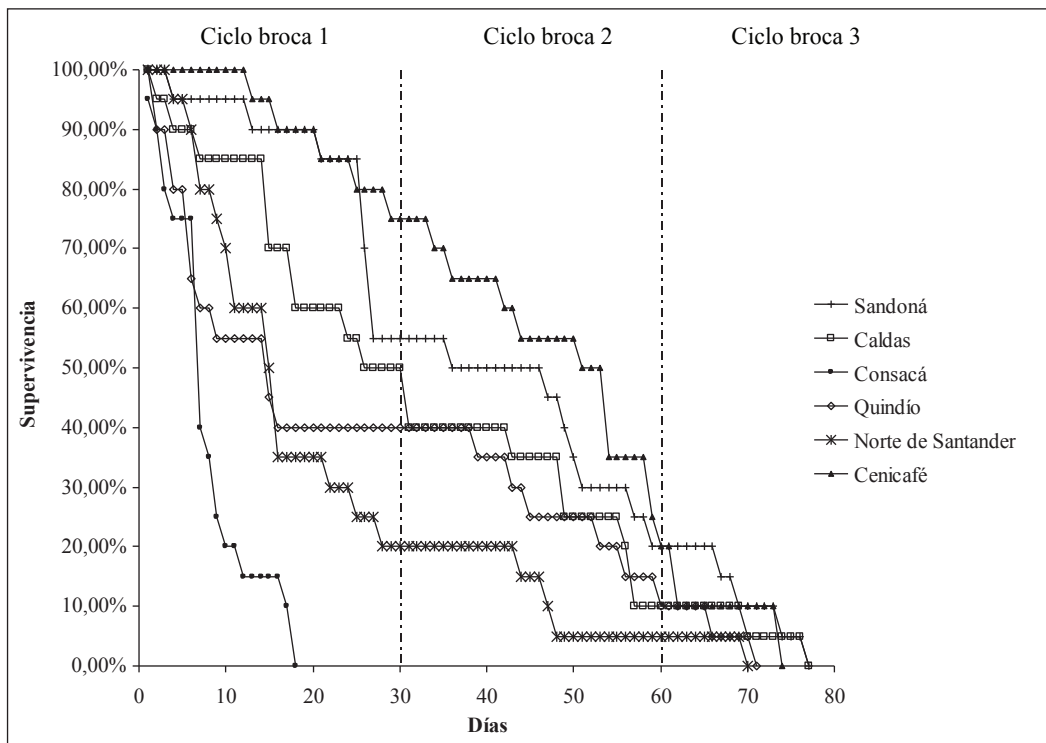
de 77 días (Figura 1), la cual fue mayor comparada con pruebas realizadas en México donde el mayor promedio fue estimado en 27,7 días con un máximo de 57 días (23). Teóricamente, dada la longevidad de *P. nasuta* y su capacidad para depredar, se podría considerar que esta especie de parasitoide podría controlar hasta tres ciclos de broca en el campo (Figura 1); sin embargo, sería más una actividad de depredación que de parasitismo, ya que hembras del parasitoide de más de 20 días de edad no paralizan la broca ni ovipositan de manera adecuada para garantizar la sobrevivencia de su progenie (23). En las pruebas realizadas en este estudio se observó el desarrollo de las larvas del parasitoide que consumían los hospedantes y no podían tejer su capullo por carencia de puntos de soporte, quedando totalmente expuestas. En esta condición, la hembra del parasitoide depredó las larvas de su misma progenie y no se alimentó de la broca. No se observó canibalismo sobre otros estados del parasitoide que se encontraban parasitando a la broca.

Para todas las características biológicas evaluadas en el parasitoide, la población del parasitoide mantenida en Cenicafé mostró el mejor comportamiento según los resultados obtenidos por las pruebas de comparación de

promedios, seguido de las crías de Sandoná y Caldas. Este resultado puede ser explicado por el período de 10 años en el cual se vienen criando estos insectos bajo las mismas circunstancias, es decir, las condiciones de cría han permitido una adaptación de individuos fértiles y agresivos.

#### **Variabilidad genética de *Prorops nasuta*.**

Se realizó una caracterización genética con 187 muestras de ADN de *Prorops nasuta* recolectadas en el campo y aquellas usadas como comparación, utilizando las cuatro combinaciones de *primers* más polimórficas mediante la técnica de AFLP, evaluadas previamente: E-TG/M-CAG, E-TG/M-CAT, E-AG/M-CAG y E-TC/M-CAG. Estos análisis revelaron 97 bandas genéticas de clara lectura, ubicadas entre 100 y 700 pares de bases, de las cuales, 61 fueron polimórficas. El porcentaje de polimorfismo por finca osciló entre valores de 5,32% y 30,85% (Tabla 5). Los mayores porcentajes de polimorfismo por departamento se registraron en Nariño (Tabla 5), región donde se realizaron las primeras liberaciones de *P. nasuta*, con individuos originarios de Kenia (40), y donde posteriormente se liberaron individuos criados en Colombia, pero provenientes de una segunda introducción procedente de Brasil y cuyo origen fue Uganda. Quindío también



**Figura 1.** Días de Supervivencia de *P. nasuta* alimentada con larvas y prepupas de la broca del café para cinco poblaciones provenientes de diferentes regiones de Colombia. Las líneas verticales indican posibles ciclos biológicos de la broca del café que el parasitoide podría depredar.

mostró altos niveles de polimorfismos, los cuales pueden ser explicados por las múltiples liberaciones realizadas durante varios años en estudios de investigación participativa con agricultores (2).

El porcentaje de polimorfismo encontrado en Colombia fue del 61,81%, en la cría Cenicafé de 22,34% con 94 bandas, en Brasil de 20,25% con 79 bandas y en México 30,26% con 76 bandas presentes. Estos resultados sugieren que ha existido una mayor probabilidad de que individuos al interior de cada finca se hayan estado cruzando entre ellos, dadas las barreras geográficas; sin embargo, los altos porcentajes de polimorfismo observados a nivel de departamentos y del país indican

que estas subpoblaciones posiblemente también se han venido cruzando a través del tiempo, o bien que las poblaciones han sido mezcladas durante su cría en confinamiento previa liberación en el campo. Dados los antecedentes de las importaciones, cría y liberaciones de esta especie en Colombia, la segunda hipótesis es la más probable.

Al comparar las muestras recolectadas en el campo con aquellas provenientes de Brasil, México y Cenicafé, por medio de UPGMA con 1.000 permutaciones a partir de una matriz de distancia Nei y Li (36), se pudo observar una formación de dos grupos con bajos valores de *bootstrap* (Figura 2): el primero de ellos (A, I) agrupando las

**Tabla 5.** Porcentaje de polimorfismo por departamento y municipio, del parasitoide *P. nasuta* establecido en el campo en Colombia.

| Origen             |                  | Polimorfismo por municipio |             |             |        | Polimorfismo por departamento |             |             |        |
|--------------------|------------------|----------------------------|-------------|-------------|--------|-------------------------------|-------------|-------------|--------|
| Departamento       | Municipio        | n                          | No. B. Amp. | No. B. Pol. | % Pol. | n                             | No. B. Amp. | No. B. Pol. | % Pol. |
| Nariño             | Sandoná          | 24                         | 94          | 34          | 36,17  |                               |             |             |        |
| Nariño             | Ancuyá           | 25                         | 95          | 27          | 28,42  | 75                            | 95          | 45          | 47,37  |
| Nariño             | Consacá          | 25                         | 95          | 33          | 34,73  |                               |             |             |        |
| Nariño             | La Unión         | 1                          | 87          | -           | -      |                               |             |             |        |
| Valle              | Pance            | 2                          | 90          | 17          | 18,88  |                               |             |             |        |
| Quindío            | Quimbaya         | 21                         | 96          | 38          | 39,58  | 22                            | 96          | 39          | 40,62  |
| Quindío            | Buenavista       | 1                          | 81          | -           | -      |                               |             |             |        |
| Risaralda          | Pereira          | 12                         | 97          | 30          | 30,93  | 12                            | 97          | 30          | 30,93  |
| Caldas             | Chinchiná        | 10                         | 96          | 26          | 27,08  |                               |             |             |        |
| Caldas             | Palestina        | 23                         | 96          | 30          | 31,25  | 37                            | 97          | 34          | 35,05  |
| Caldas             | San José         | 4                          | 93          | 19          | 20,43  |                               |             |             |        |
| Norte de Santander | Pamplonita       | 11                         | 95          | 20          | 21,05  | 19                            | 95          | 23          | 24,21  |
| Norte de Santander | Chinácota        | 8                          | 94          | 17          | 18,08  |                               |             |             |        |
| Cesar              | Jagua de Ibirico | 3                          | 89          | 12          | 13,48  | 3                             | 89          | 12          | 13,48  |

No.B.Amp: Número de Bandas Amplificadas; No.B.Pol.: Número de bandas Polimórficas; % Pol.: Porcentaje de polimorfismo

muestras de Brasil y México (muestras fuera de grupo) y dos muestras del municipio de Palestina, y en el segundo el resto de las muestras evaluadas. Este análisis indica que no existieron diferencias genéticas marcadas entre las muestras evaluadas, que permitieran determinar grupos independientes; sin embargo, estos resultados son informativos y sugieren que las muestras de México, Brasil y Palestina pudieron tener el mismo origen.

Las muestras más cercanas a Brasil y México corresponden a una finca del municipio de Palestina (Caldas), donde a pesar de la alta tecnificación del cultivo, condición en que se reducen los estados disponibles del huésped por recolección manual de frutos brocados y aplicación de insecticidas, se encontró un porcentaje de parasitismo superior al 10% (31). Este comportamiento podría ser explicado por la posible presencia de genes de resistencia a insecticidas en el parasitoide. Esta información podría estar relacionada con

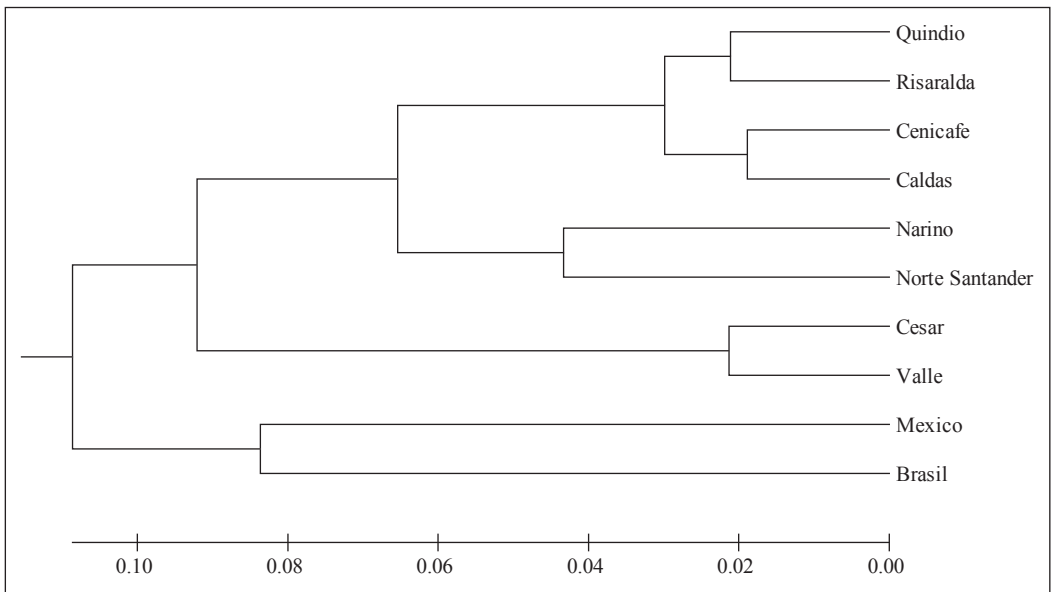
la historia de *P. nasuta* en Brasil, donde el uso del biocontrolador fue desplazado por la utilización de insecticidas clorados, y a pesar de ello, el establecimiento del insecto en el campo se detectó décadas más tarde (46, 51, 54). Es probable que *P. nasuta* haya creado resistencia a insecticidas por la presión de selección a la que fue sometida, y es factible que en la finca del municipio de Palestina se hayan realizado las primeras liberaciones de *P. nasuta* después de su introducción desde Brasil en 1996, conservando allí una línea del parasitoide no mezclada con los individuos provenientes de Ecuador. A pesar que la presencia de genes de resistencia en *P. nasuta* no fue confirmada en estudios posteriores de campo (42), sería recomendable analizar las poblaciones presentes en esta finca para confirmar esta hipótesis.

Los estudios de la biología de *P. nasuta* indican que debe existir una alta endogamia en esta especie (1), ya que la cópula ocurre



entre individuos de igual progenie antes de emerger del grano de café infestado donde se desarrollaron. No obstante, los resultados desvirtúan parcialmente esta hipótesis, debido a que se encontraron altos niveles de variación genética, que indican apareamientos por fuera de los granos conteniendo el huésped. Esta situación podría ser explicada en dos escenarios: (1) Que la especie sea realmente endogámica, pero que la variabilidad genética haya sido enriquecida en condiciones de cría en confinamiento de tal manera que las hembras del parasitoide pueden copular con machos de diferentes progenies y, posteriormente, ser liberadas en el campo, conteniendo toda la variabilidad genética; o (2) Que la especie no sea altamente endogámica y que los machos alados busquen hembras para la cópula por fuera de los granos de café en el campo.

Al realizar el mismo tipo de análisis UPGMA entre las muestras de Nariño, las extranjeras y Cenicafé (Figura 2b) se presentan dos grupos soportados por mayores porcentajes de *Bootstrap* (>40%); el primero (B, I) incluye las muestras fuera de grupo y el segundo (B, II) contiene todas las muestras del departamento y las de Cenicafé, con clara diferencia de tres muestras (SndEdel1, 2 y SndEme1) (B, IIa), las cuales corresponden a las fincas donde se realizaron las primeras liberaciones del parasitoide en el año 1991 (7). El nodo Iic (Figura 2b) divide a su vez la mayoría de las muestras de Cenicafé de las del resto de Nariño, con bajos soportes de *Bootstrap*. La diferencia entre el parasitoide establecido en Colombia con las muestras de Brasil y México se corroboró utilizando las diferencias estadísticas de Nei (35), después de estimar las frecuencias alélicas según el procedimiento de Lynch y Milligan (29),



**Figura 3.** Dendrograma a partir de las distancias genéticas por análisis UPGMA, agrupando las muestras por departamento, comparadas con las muestras de Brasil y México.

generando un dendrograma por el método UPGMA (Figura 3). Este análisis presenta la primera caracterización genética de *P. nasuta* mediante la técnica AFLP.

En conclusión, los resultados indican estrechas relaciones intraespecíficas comparando las muestras colombianas con las de Brasil y México, y aún mayor entre las muestras colombianas, donde se observa una débil subestructura de poblaciones y ausencia de patrones principales de agrupamiento a partir de los análisis genéticos con bajos soportes de *bootstrap* para los nodos. La débil estructura de poblaciones encontradas a pesar de los altos valores del porcentaje de polimorfismo, sugiere que la diversidad se origina por las condiciones de cría con respecto a su posibilidad de apareamiento, más que a la presión de selección a la que se somete la especie en los diferentes ambientes colombianos donde se ha establecido, teniendo en cuenta la reducción de las poblaciones del parasitoide y su hospedante después de las épocas de cosecha. La baja diversidad genética de la cría Cenicafé puede deberse a la fijación de los alelos por sucesivos cruces, de acuerdo con los ciclos de cría y a las bajas poblacionales en el pie de cría, sumado posiblemente a cambios en la disponibilidad de alimento, sanidad y condiciones de cría.

Los resultados sugieren que en Colombia se encuentra una línea del parasitoide distinguible con respecto a otras poblaciones presentes en Latinoamérica, que se generó a partir de la unión de individuos del parasitoide originarios de Kenia introducidas por Ecuador y las de Uganda desde Brasil. Es probable que esta mezcla le haya conferido a las poblaciones de Colombia ventajas en su capacidad de establecimiento. La divergencia de poblaciones está sustentada por la presencia de marcadores moleculares ligados a los países de origen y determinada por medio de las pruebas AFLP.

La información genética del parasitoide sugiere que las variables biológicas evaluadas describieron de mejor manera el comportamiento de *P. nasuta* establecido en Colombia, más que el de cada línea encontrada por departamento. De esta manera, un individuo del parasitoide establecido en Colombia, en las condiciones de este experimento, tiene la capacidad de parasitar hasta 1,6 granos infestados por broca, depredar hasta 29 adultos de broca, 8 estados inmaduros diariamente, podría vivir hasta 8 días cuando se alimenta exclusivamente de adultos y hasta 77 días cuando lo hace de estados inmaduros del coleóptero.

## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación se realizó con recursos de la Federación Nacional de Cafeteros, en Cenicafé bajo el código ENT1821. Los autores agradecen a la doctora Esther Cecilia Montoya por el apoyo en los análisis estadísticos y a Héctor A. Chica por el apoyo en el análisis de información. Igualmente a Francisco Infante, Tito Bacca y Luis Miguel Constantino quienes suministraron especímenes de *P. nasuta*. A los investigadores Ricardo Acuña y María del Pilar Moncada por sus aportes a la investigación. A los Auxiliares de Investigación Mauricio Jiménez y Diana S. Rodríguez por su constante colaboración. Igualmente a los investigadores y auxiliares de las Disciplinas de Entomología y Mejoramiento Genético de Cenicafé, y a la empresa Biocafé, especialmente a Arcesio González y Óscar Gómez, por proveer las brocas y los parasitoides necesarios para esta investigación.

## LITERATURA CITADA

1. ABRAHAM, Y.J.; MOORE, D.; GODWIN, G. Rearing and aspects of biology of *Cephalonomia stephanoderis* and *Prorops nasuta* (Hymenoptera : Bethyilidae) parasitoids of the coffee berry borer,

- Hypothenemus hampei* (Coleoptera : Scolytidae). Bulletin of entomological research 30:121-128. 1990.
2. ARISTIZÁBAL A., L.F.; BUSTILLO P., A.E.; JIMÉNEZ Q., M.; TRUJILLO E., H.I. Encuentro de caficultores experimentados: Manejo integrado de la broca del café a través de investigación participativa. Chinchiná : CENICAFÉ, 2004. 70 p.
  3. BARTON, N.H.; CHARLESWORTH, B. Genetic revolutions, founder effects and speciation. Annual review of ecology and systematics 15:133-164. 1984.
  4. BATCHELOR, T.P.; HARDY, I.C.W.; BARRERA G., J.F. Interactions among bethylid parasitoid species attacking the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). Biological control 36:106-118.
  5. BENAVIDES M., P. Genetic variability and global distribution of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). West Lafayette : Purdue university, 2006. 95 p. Tesis: Doctor of philosophy.
  6. BENAVIDES M., P.; ARÉVALO, H. Manejo integrado: Una estrategia para el control de la broca del café en Colombia. Cenicafé 53(1):50-59
  7. BENAVIDES M., P.; BUSTILLO P., A.E.; MONTOYA R., E.C. Avances sobre el uso del parasitoides *Cephalonomia stephanoderis* (Hym.: Bethyilidae) para el control de broca del café, *Hypothenemus hampei*. Revista colombiana de entomología 20(4):247-253. 2002.
  8. BENAVIDES M., P.; PORTILLAR, M.; OROZCO H., J. Classical biological control of coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) in Colombia with african parasitoids. p. 430-434. En: INTERNATIONAL Symposium on biological control of arthropods (1 : Enero 14-18 2002 : Honolulu). Washington : USDA, 2003. 573 p.
  9. BORBÓN, O.M. La broca del fruto del cafeto: Programa cooperativo ICAFE-MAG. San José de Costa Rica : ICADE : MAG, 1991. 50 p.
  10. BUSTILLO P., A.E. El papel del control biológico en el manejo integrado de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). Revista de la academia colombiana de ciencias 29(110):55-68. 2005.
  11. BUSTILLO P., A.E.; OROZCO, H.J.; BENAVIDES M., P.; PORTILLA R., M. Producción masiva y uso de parasitoides para el control de la broca del café en Colombia. Cenicafé 47(4):215-230. 1996.
  12. CARSON, H.L. Increased genetic variance after a population bottleneck. Trends in ecology and evolution 5:228-230. 1990.
  13. CARSON, H.L.; TEMPLETON, A.R. Genetic revolutions in relation to speciation phenomena: The founding of new populations. Annual review of ecology and systematics 15:97-131. 1984.
  14. DUQUE O., H. Cómo reducir los costos de producción en la finca cafetera. 2da. ed. Chinchiná: CENICAFÉ, 2004. 99 p.
  15. DE SOUZA, M.S.; TEIXEIRA, C.A.D.; COSTA, V.A.; COSTA, J.N.M. Ocorrencia de *Cephalonomia stephanoderis* Betrem (Hymenoptera: Bethyilidae) em cafezais da Amazonia Brasileira. Neotropical entomology 35(4):560-562. 2006.
  16. GAVRILETS, S.; BOAKE, C.R.B. On the evolution of premating isolation after a founder event. American naturalist 152:706-716. 1998.
  17. GOODNIGHT, C.J. On the effect of founder events on epistatic genetic variance. Evolution 41(1):80-91. 1987.
  18. GOODNIGHT, C.J. Epistasis and the effect of founder events on the additive genetic variance. Evolution 42(3):441-454. 1988.
  19. GREATHEAD, D.J.; GREATHEAD, A.H. Biological control of insect pests by insect parasitoids and predators: The BIOCAT database. Londres : Commonwealth agricultural bureaux, 1992. 8 p. (Biocontrol news inform No. 13)
  20. HUFBAUER, R.A. Evidence for nonadaptive evolution in parasitoid virulence following a biological control introduction. Ecological application 12(1):66-78. 2002.
  21. HUFBAUER, R.A.; BOGDANOWICZ, S.M.; HARRISON, R.G. The population genetics of a biological control introduction: Mitochondrial DNA and microsatellite variation in native and introduced populations of *Aphidius ervi*, a parasitoid wasp. Molecular ecology 13(2):337-348. 2004.
  22. INFANTE, F.; MUMFORD, J.; MENDEZ, I. Non-recovery of *Prorops nasuta* (Hymenoptera : Bethyilidae), an imported parasitoid of the coffee berry borer (Coleoptera:Scolytidae) in Mexico. Southwestern entomologist 26(2):159-163. 2001.



23. INFANTE, F.; MUMFORD, J.; BAKER, P. Life history studies of *Prorops nasuta* a parasitoid of the coffee berry borer. *BioControl* 50(2):259-270. 2005.
24. INFANTE, F.; MUMFORD, J.; GARCÍA, A. Predation by native arthropods on the African parasitoid *Prorops nasuta* (Hymenoptera: Bethyilidae) in coffee plantations of Mexico. *Florida entomologist* 86(1):86-88. 2003.
25. ICA. Protección sanitaria del cultivo del café convenio ICA FNC: Informe 1998. Bogotá : ICA, 1999. 48 p.
26. KLEIN, D.C.; ESPINOZA, O.; TANDAZO, A.; CISNEROS, P.; DELGADO, D. Factores naturales de regulación y control biológico de la broca del café *Hypothenemus hampei* Ferr. *Sanidad vegetal* 3(3):5-30. 1988.
27. KUMAR, S.; TAMUR, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in bioinformatics* 5(2):150-163. 2004.
28. LACHAUD, G.P.; HARDY, I.C.W.; LACHAUD, J.P. Insect gladiators: Competitive interactions between three species of bethylid wasps attacking the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). *Biological control* 25(3):231-238. 2002.
29. LYNCH, M.; MILLIGAN, B.G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular ecology* 3(2):91-99. 1994.
30. MALDONADO L., C.E. Variabilidad genética y evaluación biológica del parasitoide *Prorops nasuta* Waterston en Colombia. Pamplona [Colombia] : Universidad de Pamplona. Departamento de maestrías y doctorados, 2007. 73 p. Tesis: Magister en biología molecular y biotecnología.
31. MALDONADO L., C.E.; BENAVIDES M., P. Establecimiento de los parasitoides betílicos *Cephalonomia stephanoderis* Betrem y *Prorops nasuta* Waterston, controladores de *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae) en Colombia. *Cenicafé* 58(4):333-339. 2007.
32. MENDELSON, T.C.; SHAW, K.L. Use of AFLP markers in surveys of arthropod diversity. *Methods in enzymology* 395:161-177. 2005.
33. MENDOZA, J.; QUIJIJE, R. Informe de ocho años de investigación en el control biológico de la broca del café en Ecuador. [En línea]. Quevedo [Ecuador] : INIAP : COFENAC, 2005. Disponible en internet: <http://www.cofenac.org/documentos/Informe-Tecnica.pdf>. Consultado en Octubre 17 de 2006.
34. MONTOYA R., E.C. Caracterización de la infestación del café por la broca y efecto del daño en la calidad de la bebida. *Cenicafé* 50(4):245-258. 1999.
35. NEI, M. *Molecular evolutionary genetics*. New York : Columbia university press, 1987. 512 p.
36. NEI, M.; LI, W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* 76(10):5269-5273. 1979.
37. OROZCO H., J. Producción de *P. nasuta* cepa Brasil. En: Informe anual de actividades Octubre de 1995 Septiembre 1996. Chinchiná : CENICAFÉ, 1996. 33 p.
38. OROZCO H., J. Programa de introducción de parasitoides en la zona cafetera. En: Informe anual de actividades Octubre de 1999 Septiembre 2000. Chinchiná : CENICAFÉ, 2000. 20 p.
39. PARSONS, Y.M.; SHAW, K.L. Species boundaries and genetic diversity among Hawaiian crickets of the genus *Laupala* identified using amplified fragment length polymorphism. *Molecular ecology* 10(7):1765-1772. 2001.
40. PORTILLAR., M.; BUSTILLO P., A.E.; BENAVIDES G., M. Introducción de parasitoides para el control de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera:Scolytidae). Medellín : Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología, 1991. 46 p.
41. QUINTERO H., C.; BUSTILLO P., A.; BENAVIDES M., P.; CHAVES C., B. Evidencias del establecimiento de *Cephalonomia stephanoderis* y *Prorops nasuta* (Hymenoptera : Bethyilidae) en cafetales del departamento de Nariño, Colombia. *Revista Colombiana de Entomología* 24(3/4):141-147. 1998.
42. RIVERA E., P.; MONTOYA R., E.C; BENAVIDES M., P. Biología del parasitoide *Prorops nasuta* (Hymenoptera: Bethyilidae) en el campo y su tolerancia a insecticidas. *Cenicafé* 61(2):99-107. 2010.
43. SALAZAR, E.H.M.; BAKER, P.S. Impacto de liberaciones *Cephalonomia stephanoderis* sobre poblaciones *Hypothenemus hampei*. *Cenicafé* 53(4):306-316. 2002.

44. SANTOS M., A.; GONZÁLEZ D., P.E. Bethylidae (Hymenoptera) de Costa Rica y Panamá. [En línea]. San José de Costa Rica : Inbio, 2004. Disponible en internet: <http://www.inbio.ac.cr/papers/bethylidae/general.htm>. Consultado el 6 de Diciembre de 2012.
45. SCHNEIDER O., O. Entomologisches praktikum. Aarau [Switzerland]: H.R. Sauerlander, 237 p. 1947.
46. TOLEDO, A.A. DE; DUVAL, G.; SAUER, H.F.G. A broca do café. O Biológico 13(7):113-118. 1947.
47. TREJO S., A.R.; FÚNEZ, C.R. Evaluación del establecimiento de los parasitoides *Cephalonomia stephanoderis* y *Prorops nasuta* sobre la broca del fruto del café (*Hypothenemus hampei*) en 14 años de liberación en Honduras. San Salvador : Congreso internacional de manejo integrado de plagas, 2004. 168 p.
48. TREJO S., A.R. Manejo integrado de la broca del café: Basado en criterios bioecológicos de la broca y el cultivo del café. Santa Bárbara : Instituto hondureño del café, 2005. 44 p.
49. UNRUH, T.R.; WHITE, W.; GONZÁLEZ, D.; GORDH, G.; LUCK, R.F. Heterozygosity and effective size in laboratory populations of *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Aphidiidae). Entomophaga 28(3):245-258. 1983.
50. VAN DE P, Y.; DE WACHTER, R. Construction of evolutionary distance trees with TREECON for Windows: Accounting for variation in nucleotide substitution rate among sites. Computer applications in bioscience 13(3):227-230. 1997.
51. VERA, V.L. Parasitoides da broca-do-café no Brasil. Londrina : Workshop internacional manejo da Broca-do-café, 2004. 17 p.
52. VEKEMANS, X.; BEAUWENS, T.; LEMAIRE, M.; ROLDAN R., I. Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size. Molecular ecology 11(1):139-151. 2002.
53. VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE L., T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. Nucleic acids research 23(21):4407-4414. 1995.
54. YOKOHAMA, M.; NAKAMO, O.; RIGITANO R., L.; NAKAYAMA, K. Situação atual da vespa de Uganda *Prorops nasuta* Waterston, 1923 (Hymenoptera: Bethylidae) no Brasil. Científica 5(3):394. 1978.