

ESPORULACIÓN, GERMINACIÓN Y PATOGENICIDAD DE AISLAMIENTOS MONOESPÓRICOS DE *Beauveria bassiana*

María Nancy Estrada-Vélez*; Patricia Eugenia Vélez-Arango**; Esther Cecilia Montoya- Restrepo**;
Alex Enrique Bustillo-Pardey***

RESUMEN

ESTRADA V., M.N.; VÉLEZ A., P.E.; MONTOYA R., E.C.; BUSTILLO P., A.E. Esporulación, germinación y patogenicidad de aislamientos monoespóricos de *Beauveria bassiana*. Cenicafé 50(1): 49-65. 1999.

A partir de un aislamiento multiespórico de *Beauveria bassiana*, Bb 9205, patogénico a la broca del café, *Hypothenemus hampei*, se obtuvieron dos fuentes multiespóricas de las cuales se evaluó, en cultivos monoespóricos, la estabilidad de la patogenicidad, la germinación y la producción de esporas luego de tres subcultivos sin reactivar (SRB) y reactivados en la broca del café (RB). La primera fuente mostró diferencias ($p=0,05$) entre cultivos monoespóricos y multiespóricos, con mayor mortalidad y germinación en estos últimos. Entre aquellos procedentes de la segunda fuente se observaron diferencias ($p=0,05$) en producción de esporas, con mayores valores en los cultivos monoespóricos. En los subcultivos, los monoespóricos de la segunda fuente mostraron igualdad en el segundo subcultivo SRB en la germinación, mientras que para mortalidad sobre la broca el comportamiento fue similar en los tres subcultivos SRB. Resultó más variable la población monoespórica que la multiespórica, pero en algunos monoespóricos se obtuvo uniformidad a través de los subcultivos. No se observó en los monoespóricos una relación directa entre mortalidad y otros parámetros pero algunos mostraron germinación alta y/o esporulación, características útiles en la selección de aislamientos para el manejo integrado de la broca. Los cultivos monoespóricos pueden ser la alternativa para la obtención de recombinantes con propiedades deseables en programas de mejoramiento de cepas.

Palabras claves: Cultivos monoespóricos, cultivos multiespóricos, *Beauveria bassiana*, *Hypothenemus hampei*, patogenicidad, germinación, esporulación, subcultivos.

ABSTRACT

From a multispore isolate of the fungus *B. bassiana* Bb 9205, pathogenic to the coffee berry borer (CBB) *Hypothenemus hampei*, two multispore sources were obtained and from each one of these the stability of pathogenicity, germination and spore production of monospore cultures were evaluated, after three subcultures, non-activated and activated throughout the CBB. The variance analysis showed differences at the first source ($p=0,05$) between monospore and multispore cultures, with higher mortality and germination percentage in the multispore ones. In the cultures taken from the second source, statistical differences ($p=0,05$) related to the spore production were observed, with a higher production in the monospore cultures. In the process of subcultures, the monospore taken from the second source, were statistically equal in the second SRB subculture for the germination variable, whereas for the CBB mortality variable the response was similar in all the SRB subcultures. The results show that the evaluated monospore population was more variable than the multispore one; however, some monospore cultures showed uniformity throughout subcultures. Although was not observed in the evaluated monospore cultures a direct relationship between the mortality and the other parameters, some of them showed higher germination and/or sporulation that can be useful in selection of isolates against CBB. In general, it was observed that monospore cultures can be an alternative to obtain recombinants with desirable properties in strain breeding programmes to the control of this insect pest.

Keywords: Monospore cultures, multispore cultures, *Beauveria bassiana*, *Hypothenemus hampei*, pathogenicity, germination, sporulation, subcultures.

-
- * Auxiliar IV de Investigación. Entomología. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Chinchiná, Caldas, Colombia.
** Investigador Científico I, Entomología y Biometría, respectivamente. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Chinchiná, Caldas, Colombia.
*** Investigador Principal I, Entomología. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Chinchiná, Caldas, Colombia.

El uso de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* constituye una herramienta para el control de insectos en cultivos de importancia económica. En Colombia, estos hongos han sido registrados atacando la broca del café, *Hypothenemus hampei*, en condiciones naturales (2, 3, 27). El programa de Manejo Integrado de la Broca del café incluye el uso de *B. bassiana* como una alternativa de control de este insecto plaga; sin embargo, los estudios de campo no han mostrado altos porcentajes de mortalidad de la broca por efecto de este hongo (1), por lo cual, se hace indispensable conocer más los aspectos relacionados con su eficiencia en el campo.

Milner (15) afirma que el principal requerimiento para la selección óptima de un agente biológico es la virulencia; sin embargo, en el campo esta condición está determinada por características muy complejas (11, 16), que no pueden cuantificarse totalmente en condiciones de laboratorio. La ingeniería genética ha hecho posible insertar en los hongos utilizados en control biológico, genes que codifiquen para la producción de toxinas o que induzcan la producción de enzimas que faciliten la degradación de la cutícula de los insectos y por ende, la penetración (29); de esta manera ha permitido obtener características óptimas de virulencia en un microorganismo para producir un insecticida efectivo.

En la literatura se registran variaciones en los hongos entomopatógenos en cuanto a las características morfológicas, culturales y patogénicas (17, 18). Por tanto, en aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* se ha observado disminución de la virulencia luego que se transfieren a medios artificiales (7, 22). Las condiciones de incubación y los componentes del sustrato donde se cultivan estos agentes biológicos (25), al igual que su origen geográfico y el estado fisiológico del hospedante (4, 7, 9, 10), influyen en la respuesta. Sin embargo, la pérdida de estas propiedades en los

hyphomycetos entomopatógenos puede ser recuperada mediante subcultivos en el hospedante, caso específico del hongo *B. bassiana* (12, 22). En *M. anisopliae* la capacidad de causar infección se conserva relativamente estable a través de los subcultivos (8,20).

Feng y Johnson (9) registraron variación en la virulencia de seis aislamientos del hongo *Beauveria bassiana* sobre *Diuraphis noxia* (Homoptera: Aphididae). Estas variaciones sugieren que el insecto hospedante, las características de crecimiento, esporulación del hongo y su origen geográfico, son un indicador probable de la virulencia de un aislamiento específico. Doberski (4) encontró resultados similares al evaluar *B. bassiana*, *M. anisopliae* y *P. farinosus* sobre larvas y adultos de *Scolytus scolytus*.

Hooker (14), afirma que los cultivos monoespóricos del hongo *Septoria avenae* varían pero tienen un alto grado de estabilidad en los subcultivos. Teóricamente, la variabilidad en las características evaluadas puede deberse a un proceso de mutación continua y a la subsecuente asociación vegetativa de diferentes tipos de núcleos, fenómeno denominado heterocariosis (26). Sin embargo, al cabo de varias transferencias se obtiene la uniformidad debido al intercambio de núcleos genéticamente parecidos durante la formación de esporas (14).

Samsinakova y Kalalova (21) evaluaron la patogenicidad de aislamientos monoespóricos del hongo *B. bassiana* sobre larvas de *Galleria mellonella* y encontraron mutaciones en los aislamientos, con aumento en la virulencia con respecto al aislamiento original.

Hall (13), evaluó la patogenicidad de aislamientos monoespóricos y multiespóricos del hongo *Verticillium lecanii* sobre *Macrosiphoniella sanborni*, en subcultivos realizados sobre un medio artificial y pasados a través del

insecto hospedante. Los resultados mostraron características de patogenicidad estables durante los subcultivos en ambas clases de aislamientos, tanto en medio artificial como al ser reactivados en el hospedante.

De los resultados que se han generado de las investigaciones realizadas con los cultivos monoespóricos (6) se deduce que éstos presentan características de patogenicidad, germinación y producción de esporas superiores a los cultivos multiespóricos, lo cual permite su selección con fines de mejoramiento de cepas. Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, el presente estudio tuvo como objetivo primordial evaluar la patogenicidad, germinación y producción de esporas de cultivos monoespóricos del hongo *B. bassiana* a través de subcultivos sin reactivar en broca (SRB) y pasados a través del hospedante (RB), con el fin de observar la estabilidad de estas características a través del tiempo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamientos: A partir de un cultivo multiespórico del hongo *B. bassiana* Bb 9205, aislado originalmente de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Pyralidae), segundo pase reactivado en broca y cultivado en SDA acidificado (1ml de ácido láctico al 44% por cada 100ml de medio) se tomaron dos fuentes multiespóricas (dos subcultivos multiespóricos en medio SDA). De cada fuente multiespórica se obtuvieron y evaluaron 15 y 10 cultivos monoespóricos, respectivamente y se compararon frente al mismo número de cultivos multiespóricos obtenidos de cada fuente. Posteriormente, se evaluaron cultivos monoespóricos SRB (no reactivados en broca del café) y RB (reactivados en la broca del café), al cabo de tres subcultivos, con el fin de observar la estabilidad de las características: patogenicidad, germinación y producción de esporas (Figura 1).

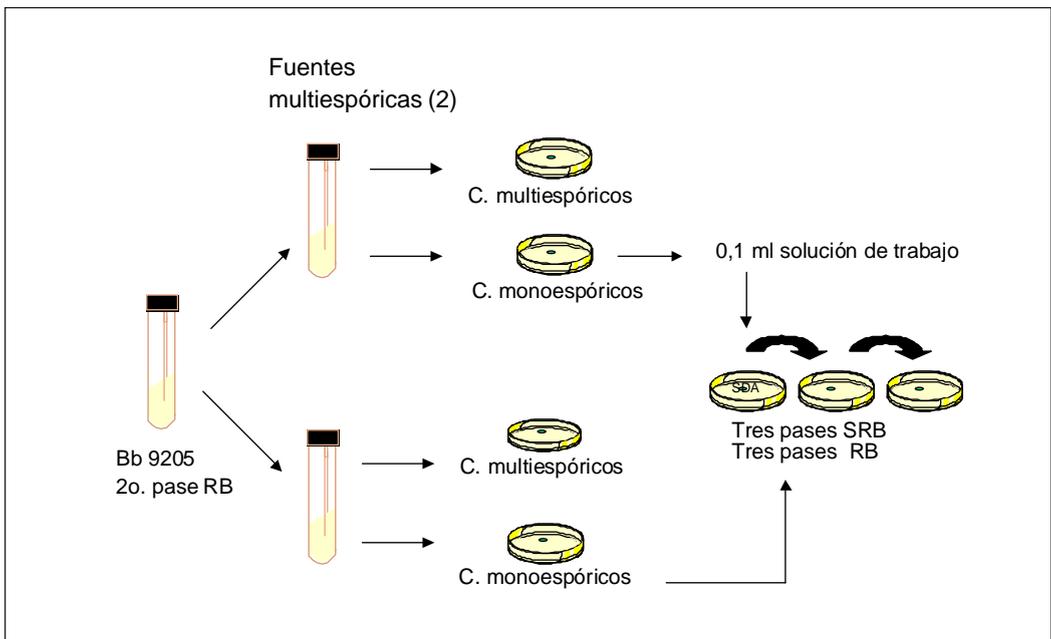


Figura 1. Esquema del procedimiento utilizado para la evaluación de cultivos monoespóricos y multiespóricos del hongo *Beauveria bassiana*.

Obtención de cultivos monoespóricos y multiespóricos. El procedimiento para obtener los cultivos monoespóricos se llevó a cabo según la metodología desarrollada por Estrada (5). Para la obtención de los cultivos multiespóricos se tomaron 0,1ml de una suspensión de esporas (3×10^5 esporas/ml) y se realizó la siembra masiva en cajas de petri con SDA acidificado. La incubación se realizó durante 30 días a una temperatura de 25°C y luz constante.

Estabilidad de los cultivos SRB y RB. Con el fin de evaluar la estabilidad de las características patogenicidad, germinación y producción de esporas en los diferentes tipos de cultivo, se utilizó el siguiente procedimiento: A partir de la suspensión de esporas del aislamiento monoespórico original se tomaron 0,1ml y se hizo la siembra masiva en cajas de petri con SDA. Luego se llevaron a incubación a 25°C durante 30 días, en luz constante. Este mismo procedimiento se realizó para los tres subcultivos SRB (Figura 1).

Paralelamente y a partir de la suspensión de esporas del aislamiento monoespórico original, se tomó parte del inóculo y se inocularon adultos de broca, previamente desinfectados en hipoclorito de sodio al 0,5%, durante 2 minutos. Posteriormente se transfirió una broca infectada con el hongo a cajas de petri con el medio con SDA acidificado y se llevó a incubación a 25°C, durante 30 días, en luz constante. Este mismo procedimiento se realizó para los tres subcultivos RB (Figura 1).

Con el fin de asegurar uniformidad del material biológico por evaluar, se preservó la suspensión de concentración conocida de esporas del hongo mediante almacenamiento en glicerol al 10%, a una temperatura de -25°C.

Variables de respuesta. Producción de esporas por caja de petri. Cada uno de los aisla-

mientos se cultivó en cajas de petri con SDA acidificado y una vez obtenido el cultivo esporulado al cabo de 30 días, se depositó en matraces esterilizados que contenían 50ml de agua destilada estéril y se agitó en un vortex durante un minuto para remover las esporas. Partiendo de la suspensión inicial obtenida se realizaron las observaciones en el microscopio con objetivo de 40X, en aquellas diluciones que facilitaron el recuento de esporas en el hemocitómetro. La unidad experimental fue un tubo de ensayo con la suspensión de esporas y se realizaron seis recuentos por evaluación (28).

Porcentaje de germinación. Se evaluó a partir de la dilución 10^{-2} proveniente de la suspensión inicial de esporas. Para ello se tomaron diez alícuotas de 5µl y se depositaron sobre el medio SDA acidificado; al cabo de 48 horas se tiñeron con azul de lactofenol. Se determinó entonces en cinco campos microscópicos por alícuota, el número de esporas germinadas y no germinadas. Una espóra se consideró germinada cuando el tubo germinativo superó el diámetro de la espóra. La unidad experimental fue la caja de petri con el medio SDA, en la cual se evaluó el porcentaje de esporas germinadas y no germinadas mediante observación en el microscopio de luz con el objetivo de 40X (28).

Patogenicidad. Para evaluar el efecto de *B. bassiana* sobre *H. hampei*, se sumergieron los adultos en una suspensión de 1×10^7 esporas/ml del hongo, durante 2 minutos. Los adultos habían sido desinfectados previamente en hipoclorito de sodio al 0,5%. Se colocaron individualmente en un vial de vidrio con un disco de papel toalla humedecido con agua destilada estéril y se realizó un seguimiento observándose los síntomas y signos de la enfermedad causada por el hongo en el estereoscopio durante diez días. Como unidad experimental se tomó el vial con la broca y se emplearon cuatro repeticiones por tratamiento, cada una con diez individuos (12, 28).

Análisis estadístico. La información se analizó estimando los promedios y los límites de confianza ($P=0,05$) de la producción de esporas, germinación y patogenicidad a la broca del café, de los aislamientos monoespóricos y multiespóricos. En el caso de los monoespóricos, a través de subcultivos, se hizo un análisis de varianza de una vía con aquellos aislamientos que presentaron mortalidad sobre la broca entre 0,6 y 100%. Para la comparación de promedios de los aislamientos monoespóricos a través de los subcultivos se utilizó la prueba de Tukey al 5%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se presentaron diferencias entre cultivos monoespóricos y multiespóricos procedentes de la primera fuente multiespórica para las variables evaluadas, mientras que en la segunda fuente se presentó un comportamiento más homogéneo de los cultivos en dichas variables, a excepción de la variable producción de esporas.

Primera fuente multiespórica. El análisis de varianza mostró diferencias entre los cultivos

monoespóricos y multiespóricos ($P=0,05$) para las variables porcentaje de mortalidad, producción de esporas y germinación (Tabla 1). Los mayores promedios de mortalidad y germinación se presentaron en los cultivos multiespóricos, mientras que en los cultivos monoespóricos se presentaron mayores promedios de producción de esporas, según la prueba de t al 5%.

La Tabla 2 muestra el porcentaje de mortalidad sobre la broca de cada uno de los cultivos monoespóricos y multiespóricos, para lo cual, el análisis de varianza sólo mostró diferencias estadísticas ($P=0,05\%$) entre los monoespóricos, encontrándose que el 20% de éstos no presentaron ningún efecto de mortalidad sobre la broca. En cuanto a las variables porcentaje de germinación y producción de esporas, el análisis de varianza mostró diferencias estadísticas ($P=0,05\%$) tanto entre los monoespóricos como en los cultivos multiespóricos.

Teniendo en cuenta el porcentaje medio de mortalidad a la broca de los monoespóricos, éstos presentaron dos grupos bien definidos: mayores de 70% y menores del 42%, mientras que en los cultivos multiespóricos el porcentaje de mortalidad fue mayor del 69,5% (Tabla 2).

TABLA 1. Promedios de valores de mortalidad sobre la broca del café, germinación y producción de esporas de los cultivos monoespóricos y multiespóricos de *B. bassiana*, procedentes de la primera y segunda fuente multiespórica.

Cultivos de <i>Beauveria bassiana</i>		Porcentaje de mortalidad			Porcentaje de germinación			Producción de esporas/caja petri (10^7)		
		\bar{X}	Intervalo de confianza al 5%		\bar{X}	Intervalo de confianza al 5%		\bar{X}	Intervalo de confianza al 5%	
			Lim. inf	Lim. sup.		Lim. Inf	Lim. sup.		Lim. Inf	Lim. sup.
Primera fuente	Monoespóricos	47,9	37,63	58,13	67,9	62,11	73,69	6,1	5,12	7,08
	Multiespórica	80,3	89,58	71,02	84,6	88,52	80,68	3,7	3,53	3,87
Segunda fuente	Monoespóricos	76,4	69,8	83,0	86,7	83,06	90,34	3,5	3,03	3,97
	Multiespórica	64,7	56,09	78,31	81,5	75,87	87,13	2,4	1,55	3,25

TABLA 2. Porcentaje de mortalidad sobre la broca del café (*H. hampei*), germinación y producción de esporas, de cultivos monoesporícos y multiesporícos de *Beauveria bassiana* procedentes de la primera fuente multiesporíca.

Cultivos Monoesporícos obtenidos de Bb 9205	PRIMERA FUENTE MULTIESPÓRICA											
	Porcentaje de Mortalidad				Porcentaje de Germinación				Producción de esporas/caja petri (10 ⁷)			
	Cultivos Monoesporícos		Cultivos Multiesporícos		Cultivos Monoesporícos		Cultivos Multiesporícos		Cultivos Monoesporícos		Cultivos Multiesporícos	
	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV
Bb 9601	80,0 a*	22,8	80,0 a	27,0	92,9 a	4,1	87,6 bc	5,8	6,7 abcd	42,1	2,5 f	33,5
Bb 9602	85,0 a	15,2	81,9 a	12,0	94,2 a	4,2	80,2 def	5,7	5,8 bcd	29,5	2,7 ef	30,6
Bb 9603	74,7 ab	41,4	85,0 a	15,2	90,1 a	6,4	73,4fg	10,2	8,2 ab	38,3	3,2 cdef	46,5
Bb 9604	40,0 bc	35,3	90,0 a	90,1	78,4 b	10,1	90,8 ab	5,0	7,5 abc	18,3	2,7 ef	51,3
Bb 9605	42,5 bc	22,5	69,5 a	15,7	87,9 ab	7,8	76,2 fg	13,1	4,8 d	15,6	2,5 f	41,9
Bb 9606	20,0 dc	57,3	80,0 a	17,6	62,8 c	16,1	78,3 efg	9,6	6,3 abcd	34,1	4,7 bc	32,3
Bb 9607	15,0 dc	115,5	70,0 a	38,7	54,9 cd	22,4	75,1 fg	14,3	7,2 abcd	29,8	4,2 cde	23,6
Bb 9608	70,0 ab	30,9	84,7 a	15,1	90,2 a	6,0	91,4 ab	4,5	6,8 abcd	23,4	3,0 def	29,8
Bb 9609	30,0 dc	60,8	70,0 a	23,3	92,0 a	6,9	83,7 cde	4,7	4,8 d	24,2	3,0 def	42,2
Bb 9610	0,6 d	200,0	95,0 a	6,1	64,7 c	10,2	87,7 bc	8,2	6,3 abcd	19,1	3,7 cdef	37,3
Bb 9611	0,0		87,5 a	10,9	20,4 f	79,9	81,3 cdef	6,1	8,5 a	12,3	4,3 cd	43,0
Bb 9612	5,0 dc	200,0	71,7 a	29,0	39,2 e	55,8	86,0 bcd	12,6	5,5 cd	15,2	3,8 cdef	30,5
Bb 9613	0,0		70,0 a	30,9	47,6 de	45,3	90,9 ab	5,6	6,2 abcd	33,1	5,8 ab	12,9
Bb 9614	0,0		95,0 a	10,5	14,3 f	159,1	91,0 ab	7,3	0,32 e	23,8	3,5 cdef	39,4
Bb 9615	5,0 dc	115,5	74,7 a	31,5	43,5 e	19,5	97,2 a	3,7	6,5 abcd	21,2	6,2 a	15,9

* Valores seguidos de la misma letra en la misma columna, son iguales estadísticamente de acuerdo con la prueba de Tukey al 5%.
CV= Coeficiente de variación.

Segunda fuente multiespórica. A diferencia de la primera fuente, el análisis de varianza corroborado con la prueba de comparación de t al 5% no mostró diferencias estadísticas entre los cultivos monoespóricos y multiespóricos, en las variables porcentaje de mortalidad y germinación, mientras que para la variable producción de esporas se observaron diferencias estadísticas con mayor producción en los aislamientos monoespóricos (Tabla 1).

El análisis de varianza de los cultivos monoespóricos y multiespóricos mostró diferencias estadísticas ($P=0,05$) en las variables porcentaje de mortalidad, germinación y producción de esporas. La mayor parte de los cultivos monoespóricos ($n=7$) presentaron mortalidad mayor del 87,5% y el resto ($n=3$), menor al 47,5%; en los multiespóricos, el menor porcentaje de mortalidad fue del 30%; sin embargo, la mayor parte de éstos presentaron porcentajes superiores al 50% ($n=7$) (Tabla 3).

Los cultivos monoespóricos presentaron mayor mortalidad a la broca con respecto a los cultivos multiespóricos (Tabla 3), lo que coincide con lo registrado en la literatura (13), en el sentido de que es posible obtener algunos cultivos monoespóricos con características deseables de patogenicidad y ser incluidos en programas de mejoramiento de cepas para su uso en control biológico. Sin embargo, éstos fueron en general más variables que los multiespóricos, lo que se explica por la expresión de las características de cada individuo (19).

Subcultivos SRB y RB de Primera fuente.

Mortalidad de la broca: En cuanto a la respuesta de los cultivos monoespóricos SRB y RB en cada uno de los subcultivos se encontraron diferencias estadísticas ($P=0,05$) en ambos tipos de subcultivos (SRB y RB). Se observó en el segundo subcultivo RB, que el 92,3% de los cultivos monoespóricos presentó porcentajes medios de mortalidad superiores al 90%, mientras que en el tercer subcultivo, el 61% de estos

mismos presentó mortalidad mayor del 90%. Caso contrario se presentó con los SRB, en donde en el tercer subcultivo, el 53% de los monoespóricos presentó mortalidad mayor del 90%, mientras que en el segundo subcultivo sólo el 23,1% de los monoespóricos superaron el 90% de la mortalidad (Tabla 4).

Germinación. En esta variable de respuesta hubo diferencias en los subcultivos monoespóricos SRB y RB, según Tukey al 5% y se observó que en el segundo subcultivo SRB, el 53,3% de los cultivos monoespóricos presentó germinación mayor del 90%, mientras que en el tercer subcultivo se redujo al 46,6%. En el segundo subcultivo RB, el 92% de los monoespóricos presentó germinación mayor del 90%, mientras que en el tercer subcultivo, el 63% de los mismos mostró valores de germinación por encima del 90% (Tabla 6).

Subcultivos SRB y RB Segunda fuente.

Mortalidad de la broca. Para cada uno de los subcultivos SRB procedentes de la segunda fuente multiespórica el análisis no mostró diferencias estadísticas ($P=0,05$), mientras que en los RB se presentaron diferencias entre los monoespóricos del primero y los del segundo subcultivo (Tabla 5). Se observó que 55,5% de los monoespóricos del primer subcultivo presentaron mortalidad superior al 90%, mientras que en el segundo y tercer subcultivo, más del 88,8% de los mismos presentó mortalidad mayor del 90%.

Germinación. Con respecto al porcentaje de germinación de los cultivos monoespóricos SRB, hubo diferencias estadísticas ($P=0,05$) entre los del primero y los del tercer subcultivo, observándose en este último que ninguno de los monoespóricos presentó germinación mayor del 90%. En los monoespóricos RB se encontraron diferencias en los tres subcultivos, observándose disminución en la germinación con valores menores del 90%, en el 55,5% de los monoespóricos del segundo subcultivo con respecto al primero (Tabla 7).

TABLA 3. Porcentaje de mortalidad sobre la broca del café (*H. hampei*), germinación y producción de esporas, de cultivos monoespóricos y multiespóricos de *Beauveria bassiana*, procedentes de la segunda fuente multiespórica.

Cultivos Monoespóricos obtenidos de Bb 9205	SEGUNDA FUENTE MULTIESPÓRICA											
	Porcentaje de Mortalidad				Porcentaje de Germinación				Producción de esporas/caja petri (10 ⁷)			
	Cultivos Monoespóricos		Cultivos Multiespóricos		Cultivos Monoespóricos		Cultivos Multiespóricos		Cultivos Monoespóricos		Cultivos Multiespóricos	
	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV
Bb 9616	95,0 a*	6,1	77,5 a	16,2	97,8 a	1,8	57,4 f	23,2	7,2 a	56,1	2,3 b	44,3
Bb 9617	97,5 a	5,1	90,0 a	9,1	98,3 a	2,2	77,2 e	9,3	3,0 bc	29,8	2,7 b	45,4
Bb 9618	92,3 a	10,5	90,0 a	9,1	92,8 b	3,5	96,3 ab	4,9	6,2 a	50,7	2,7 b	30,6
Bb 9619	100,0 a	0,0	90,0 a	9,1	97,8 a	1,1	90,6 bcd	6,8	2,0 cd	44,7	1,6 bc	24,2
Bb 9620	100,0 a	0,0	72,5 a	17,3	96,1 ab	3,0	89,3 bcd	8,5	1,2 cd	49,0	1,5 bc	36,5
Bb 9621	87,5 a	21,6	47,5 b	20,1	97,8 a	1,6	93,7 abc	5,6	5,5 ab	32,0	0,5 c	40,1
Bb 9622	15,0 c	38,5	30,0 c	60,8	76,7 d	8,1	88,3 cd	4,1	3,3 bc	45,2	0,4 c	50,8
Bb 9623	97,5 a	5,1	55,0 b	23,5	97,5 a	2,4	83,4 de	7,2	3,5 bc	59,2	10,7 a	28,2
Bb 9624	47,5 b	26,5	54,2 b	21,5	86,6 c	11,5	39,2 g	29,5	2,8 c	75,4	0,8 c	43,4
Bb 9625	12,5 c	76,6	40,0 bc	20,4	18,6 e	57,9	100,0 a	0,0	0,1 d	61,2	0,7 c	29,4

* Valores seguidos de la misma letra en la misma columna son iguales estadísticamente, según la prueba de Tukey al 5%.

CV= Coeficiente de variación.

TABLA 4. Porcentaje de mortalidad sobre la broca del café (*H. hampei*), del primero, segundo y tercer subcultivo sin reactivar (SRB) y reactivados en la broca, (RB) de cultivos monoespóricos de *Beauveria bassiana*, procedentes de la primera fuente multiespórica.

Cultivos Monoespóricos obtenidos de Bb 9205	PRIMERA FUENTE MULTIESPÓRICA																	
	Porcentaje de Mortalidad Cultivos monoespóricos a través de los subcultivos																	
	1 SRB ¹			2 SRB			3 SRB			1 RB ¹			2 RB			3 RB		
\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	
Bb 9601	97,5 a*	5,1	80,0 ba	20,4	97,5 a	5,1	95,0 ab	6,1	95,0 ab	6,1	97,5 a	5,1	95,0 ab	6,1	97,5 a	5,1	97,5 a	5,1
Bb 9602	55,0 edf	23,5	0,0		97,5 a	5,1	95,0 ab	6,1	90,0 ab	15,7	90,0 ab	0,0	90,0 ab	15,7	90,0 ab	0,0	90,0 ab	0,0
Bb 9603	37,5 gf	45,5	35,0 c	71,9	95,0 a	6,1	92,5 abc	5,4	82,5 b	18,2	80,0 bc	20,4	92,5 abc	5,4	82,5 b	18,2	80,0 bc	20,4
Bb 9604	97,5 a	5,1	92,5 ba	5,4	**		82,5 bc	11,6	90,0 ab	9,1	97,5 a	5,1	82,5 bc	11,6	90,0 ab	9,1	97,5 a	5,1
Bb 9605	87,5 abc	14,4	92,5 ba	16,2	97,5 a	5,1	92,5 abc	16,2	92,5 ab	5,4	97,5 a	5,1	92,5 abc	16,2	92,5 ab	5,4	97,5 a	5,1
Bb 9606	69,7 dc	19,5	72,5 b	23,5	7,5 c	66,7	95,0 ab	6,1	92,5 ab	10,3	92,5 ab	10,3	95,0 ab	6,1	92,5 ab	10,3	92,5 ab	10,3
Bb 9607	85,0 abc	6,7	85,0 ba	15,2	7,5 c	127,6	97,5 a	5,1	92,5 ab	5,4	87,5 ab	10,9	97,5 a	5,1	92,5 ab	5,4	87,5 ab	10,9
Bb 9608	57,2 ed	38,1	**		(-)		90,0 abc	0,0	95,0 ab	6,1	95,0 a	6,1	90,0 abc	0,0	95,0 ab	6,1	95,0 a	6,1
Bb 9609	77,5 bc	12,3	7,5 d	127,6	(-)		95,0 ab	6,1	90,0 ab	9,1	87,5 ab	5,7	95,0 ab	6,1	90,0 ab	9,1	87,5 ab	5,7
Bb 9610	100,0 a	0,0	80,0 ba	17,7	59,2 b	43,0	87,5 abc	10,9	97,5 a	5,1	87,5 ab	5,7	87,5 abc	10,9	97,5 a	5,1	87,5 ab	5,7
Bb 9611	22,5 g	66,7	95,0 a	6,1	95,0 a	6,1	**											
Bb 9612	95,0 ab	10,5	12,5 d	40,0	25,0 c	23,1	95,0 ab	6,1	92,5 ab	5,4	95,0 a	6,1	95,0 ab	6,1	92,5 ab	5,4	95,0 a	6,1
Bb 9613	0,0		10,0 d	0,0	97,5 a	5,1	80,0 c	17,7	***									
Bb 9614	55,0 edf	23,4	0,0		(-)		92,5 abc	10,3	90,0 ab	0,0	95,0 a	10,5	92,5 abc	10,3	90,0 ab	0,0	95,0 a	10,5
Bb 9615	97,5 a	5,1	80,0 ba	20,4	97,5 a	5,1	92,5 abc	10,3	95,0 ab	6,1	70,0 c	20,2	92,5 abc	10,3	95,0 ab	6,1	70,0 c	20,2

¹SRB: Sin reactivar en broca; RB: Reactivado en broca.

* Valores seguidos de la misma letra en la misma columna, son iguales estadísticamente de acuerdo con la prueba de Tukey al 5%.

** No se estimó el promedio debido a que se contaminó el cultivo para obtener las unidades experimentales.

(-) Aislamientos que no presentaron crecimiento al cabo de tres subcultivos.

CV= Coeficiente de variación.

TABLA 5. Porcentaje de mortalidad sobre la broca del café, (*H. hampei*), del primero, segundo y tercer subcultivo sin reactivar (SRB) y reactivados en la broca (RB), de cultivos monoespóricos de *Beauveria bassiana*, procedentes de la segunda fuente multiespórica.

Cultivos Monoespóricos obtenidos de Bb 9205	SEGUNDA FUENTE MULTIESPÓRICA																
	Porcentaje de Mortalidad Cultivos monoespóricos a través de los subcultivos																
	1 SRB ¹			2 SRB			3 SRB			1 RB ¹			2 RB			3 RB	
\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV
Bb 9616	92,5 a	10,3	100,0 a	0,0	100,0 a	100,0 a	6,1	95,0 ab	6,1	90,0 a	9,1	90,0 a	9,1	90,0 a	9,1	90,0 a	9,1
Bb 9617	92,5 a	10,3	94,7 a	6,4	92,5 a	92,5 a	5,4	86,7 ab	6,8	97,5 a	5,1	97,5 a	5,1	97,5 a	5,1	97,5 a	5,1
Bb 9618	92,5 a	5,4	97,5 a	5,1	92,5 a	92,5 a	5,4	80,0 b	17,7	81,9 b	6,7	*					
Bb 9619	87,5 a	5,7	95,0 a	10,5	92,5 a	92,5 a	10,3	95,0 ab	6,1	95,0 ab	6,1	95,0 ab	6,1	95,0 a	6,1	95,0 a	6,1
Bb 9620	95,0 a	6,1	97,5 a	5,1	97,5 a	97,5 a	5,1	82,5 b	18,2	97,5 a	5,1	97,5 a	5,1	95,0 a	6,1	95,0 a	6,1
Bb 9621	92,5 a	10,3	92,5 a	10,3	97,5 a	97,5 a	5,1	82,5 b	6,1	100,0 a	0,0	95,0 a	6,1	95,0 a	6,1	95,0 a	6,1
Bb 9622	92,5 a	5,4	90,0 a	9,1	97,5 a	97,5 a	5,1	***									
Bb 9623	85,0 a	15,2	95,0 a	10,5	95,00 a	95,00 a	6,1	97,5 a	5,1	97,5 a	5,1	97,5 a	5,1	97,5 a	5,1	97,5 a	5,1
Bb 9624	97,5 a	5,1	100,0 a	0,0	97,5 a	97,5 a	5,1	95,0 a	6,1	97,5 a	5,1	97,5 a	5,1	97,5 a	5,1	92,5 a	10,3
Bb 9625	85,0 a	11,7	90,0 a	9,1	100,0 a	100,0 a	0,0	100,0 a	0,0	95,0 ab	6,1	95,0 ab	6,1	95,0 ab	6,1	**	

¹SRB: Sin reactivar en broca; RB: Reactivado en broca.

* Valores seguidos de la misma letra en la misma columna, son iguales estadísticamente de acuerdo con la prueba de Tukey al 5%.

** No fue estimado el promedio debido a que se contaminó el cultivo para obtener las unidades experimentales.

CV= Coeficiente de variación

TABLA 6. Porcentaje de germinación del primero segundo y tercer pase sin reactivar (SRB) y reactivados (RB) en la broca del café (*H. hampei*) de cultivos monoespóricos de *Beauveria bassiana*, procedentes de la primera fuente multiespórica.

Cultivos Monoespóricos obtenidos de Bb 9205	PRIMERA FUENTE MULTIESPÓRICA Porcentaje de Germinación																	
	Cultivos monoespóricos a través de los subcultivos																	
	1 SRB ¹			2 SRB			3 SRB			1 RB ¹			2 RB			3 RB		
	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV
Bb 9601	84,2 ab	8,9	90,7 a	6,5	85,7 c	5,3	91,6 bc	3,9	87,4 c	4,8	94,9 ab	6,4						
Bb 9602	44,3 g	19,4	10,0 e	73,7	90,7 bc	7,2	93,9 abc	3,2	94,6 a	4,3	91,1 abc	7,5						
Bb 9603	77,6 bc	9,9	18,0 de	61,6	96,4 ab	4,1	93,9 abc	6,7	94,7 a	3,8	89,2 bc	6,4						
Bb 9604	89,9 a	5,0	96,7 a	4,0	**		92,5 abc	5,0	95,0 a	4,1	93,2 abc	5,4						
Bb 9605	72,8 c	9,5	95,0 a	5,0	93,2 ab	4,6	92,5 abc	5,3	95,5 a	4,8	92,2 abc	5,4						
Bb 9606	57,4 ef	16,8	94,7 a	5,8	16,3 e	91,7	97,1 ab	3,9	93,0 ab	3,9	93,0 abc	8,6						
Bb 9607	67,1 cde	12,2	91,0 a	5,0	37,3 d	81,1	95,7 abc	2,8	95,0 a	4,4	96,0 a	4,1						
Bb 9608	75,0 bc	15,7	**				90,7 c	6,8	92,2 ab	4,3	88,0 c	5,2						
Bb 9609	91,7 a	5,5	16,4 de	109,1	(-)		90,7 c	5,3	94,9 a	3,3	81,0 d	4,5						
Bb 9610	67,6 cd	20,6	92,3 a	4,5	93,0 ab	5,1	93,1 abc	4,3	94,4 ab	5,1	90,4 abc	9,4						
Bb 9611	60,2 de	27,9	95,1 a	3,5	90,9 bc	6,5	**											
Bb 9612	69,8 cd	17,4	60,5 c	29,8	14,0 e	69,6	97,5 a	2,0	95,9 a	1,7	87,8 c	8,8						
Bb 9613	11,2 h	99,4	76,1 b	16,8	90,7 bc	7,8	28,2 d	62,6	**									
Bb 9614	48,5 fg	30,9	20,3 d	54,9	(-)		94,6 abc	2,9	90,5 bc	5,5	**							
Bb 9615	45,5 g	21,4	97,6 a	3,7	98,1 a	2,7	93,5 abc	6,0	92,8 ab	4,1	**							

¹SRB: Sin reactivar en broca; RB: Reactivado en broca.

** Valores seguidos de la misma letra en la misma columna, son iguales estadísticamente de acuerdo con la prueba de Tukey al 5%.

(-) No fue estimado el promedio debido a que se contaminó el cultivo destinado a las unidades experimentales, se contaminó.

CV= Coeficiente de variación.

TABLA 7. Porcentaje de germinación del primero, segundo y tercer subcultivo sin reactivar (SRB) y reactivados en la broca (RB), de cultivos monoespóricos de *Beauveria bassiana*, procedentes de la segunda fuente multiespórica.

Cultivos Monoespóricos obtenidos de Bb 9205	SEGUNDA FUENTE MULTIESPÓRICA																
	Porcentaje de Germinación de Cultivos monoespóricos a través de los subcultivos																
	1 SRB ¹			2 SRB			3 SRB			1 RB ¹			2 RB			3 RB	
\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV
Bb 9616	94,8 a*	3,5	93,4 a	4,0	89,4 a	6,3	92,0 a	4,8	91,7 abc	6,6	94,5 bc	4,0					
Bb 9617	95,7 a	3,3	93,3 a	5,3	85,2 abc	6,7	93,7 a	5,1	93,7 a	5,0	100,0 a	0,0					
Bb 9618	90,6 b	4,1	94,2 a	4,3	89,4 a	3,3	93,2 a	4,1	86,9 bcd	9,4	**						
Bb 9619	96,4 a	3,1	95,3 a	2,7	79,9 cd	9,9	91,3 a	3,9	94,2 a	5,9	90,3 c	8,6					
Bb 9620	90,3 b	2,5	92,4 a	5,5	86,8 ab	6,2	94,9 a	5,1	92,2 ab	3,8	94,3 bc	5,5					
Bb 9621	93,5 a	2,6	94,4 a	5,1	81,2 bcd	10,4	95,6 a	4,8	90,0 abc	4,7	97,4 ab	4,7					
Bb 9622	94,4 a	2,7	93,2 a	2,7	75,7 d	6,9	**										
Bb 9623	95,1 a	3,0	95,9 a	3,5	89,9 a	5,7	68,4 b	18,0	83,6 d	4,1	94,4 bc	5,1					
Bb 9624	96,6 a	2,9	91,6 a	6,2	85,4 abc	6,2	91,6 a	4,9	85,6 cd	6,0	95,9 ab	4,0					
Bb 9625	94,8 a	4,5	94,3 a	3,9	85,1 abc	6,8	93,1 a	4,8	86,3 bcd	12,5	**						

¹SRB: Sin reactivar en broca; RB: Reactivado en broca.

* Valores seguidos de la misma letra en la misma columna, son iguales estadísticamente de acuerdo con la prueba de Tukey al 5%.

** No se estimó el promedio debido a que se contaminó el cultivo destinado a obtener las unidades experimentales.

CV= Coeficiente de variación.

Producción de esporas. Los cultivos monoespóricos a través de los tres subcultivos SRB y RB, mostraron diferencias estadísticas ($P=0,05$) y no se observó una tendencia definida en la capacidad de esporulación de los aislamientos (Tablas 8 y 9).

Estabilidad de las características a través de los subcultivos. De acuerdo con los resultados de los subcultivos con respecto al cultivo monoespórico original, sólo los subcultivos SRB de la segunda fuente multiespórica, causaron mortalidades superiores al 85% durante los tres subcultivos (Tabla 5), teniendo en cuenta que en los cultivos monoespóricos originales, los promedios fluctuaron entre 12,5 y 100% (Tabla 3).

Es posible que esta uniformidad obtenida a través de los subcultivos, pueda atribuirse al intercambio de núcleos genéticamente parecidos durante la formación de esporas, tal como lo describe Hooker (14) para aislamientos monoespóricos del hongo *Septoria avenae*.

En cuanto a los aislamientos monoespóricos SRB que no presentaron comportamientos similares a través de los subcultivos, la literatura registra que aún cuando los hongos presenten esporas uninucleadas, no es posible asegurar una homogeneidad en el material obtenido, debido a que pueden ocurrir fenómenos tales como la heterocariosis y la anastomosis entre conidias, conidias y tubos germinativos e hifas, y por ende, no hacen posible la estabilidad de las características a través de los subcultivos (23, 24).

En cuanto a la relativa estabilidad en la actividad patogénica que presentaron algunos de los cultivos monoespóricos del hongo *B. bassiana*, al ser subcultivados tres veces, tanto en un medio artificial como a través del hospedante, cabe mencionar que la agresividad

del hongo hacia el hospedante no depende solamente del sustrato en el cual se cultiva este entomopatógeno (11), tal como sucede con otros microorganismos que deben recuperar la patogenicidad a través de pases sobre el insecto hospedante (8, 12, 20, 22), sino de características como la especificidad del hongo hacia el hospedante y/o adaptabilidad fisiológica (16).

Los aislamientos monoespóricos Bb 9609 y Bb 9614 no mostraron crecimiento a partir del tercer subcultivo SRB, lo que pudo estar relacionado con la baja producción de esporas y baja germinación observada en el segundo subcultivo (Tablas 6 y 8).

Aunque los cultivos monoespóricos no mostraron una relación directa entre las variables patogenicidad, germinación y esporulación, es importante destacar que se encontraron cultivos monoespóricos con buenas características de patogenicidad (100%), germinación (95,7%) y esporulación ($8,5 \times 10^7$ esporas/caja de petri).

Los resultados de este estudio sugieren el uso de cultivos monoespóricos como una alternativa para la selección de aislamientos con características de alta virulencia a la broca del café.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su reconocimiento a los Doctores Gabriel Alvarado A., Jairo Leguizamón C. y Luis Fernando Gil V., Investigadores de Cenicafé, por las valiosas contribuciones realizadas a este artículo.

Al personal auxiliar de la Disciplina de Entomología por su valiosa y oportuna colaboración.

TABLA 8. Producción de esporas del primero segundo y tercer subcultivo sin reactivar (SRB) y reactivados (RB) en la broca del café (*H. hampei*), de los monoespóricos de *Beauveria bassiana*, procedentes de la primera fuente multiespórica.

Cultivos Monoespóricos obtenidos de Bb 9205	PRIMERA FUENTE MULTIESPÓRICA																	
	Producción de esporas/caja petri (10 ⁷) Cultivos monoespóricos a través de los subcultivos																	
	1 SRB ¹			2 SRB			3 SRB			1 RB ¹			2 RB			3 RB		
	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV
Bb 9601	2,3 defg*	44,3	0,6 efg	45,4	6,0 a	42,2	20,8 cd	24,7	4,5 cde	55,7	2,2 a	10,8						
Bb 9602	4,3 bc	27,9	0,7 ef	52,4	2,6 bcd	51,2	29,8 ab	48,6	4,8 cde	37,9	0,1 f	48,9						
Bb 9603	1,0 gh	46,0	1,4 cd	21,6	1,6 cd	30,9	33,3 a	22,7	3,5 de	56,4	1,2 cde	67,2						
Bb 9604	2,7 cdef	10,5	2,4 ab	7,3	6,5 a	48,4	24,6 bc	37,0	7,0 abc	76,1	1,8 abc	53,6						
Bb 9605	3,6 cd	44,5	2,0 bc	31,6	2,6 bcd	45,4	12,1 efg	22,9	3,1 de	61,2	2,0 ab	54,7						
Bb 9606	9,0 a	21,0	1,5 c	21,4	1,1 d	25,8	9,3 g	18,7	5,8 bcd	50,1	0,9 ed	34,3						
Bb 9607	2,6 cdefg	30,6	3,0 a	42,1	1,5 cd	36,5	11,3 fg	29,3	3,5 de	64,5	0,9 de	29,6						
Bb 9608	1,1 fgh	37,3	**				19,0 cde	19,6	2,1 e	94,2	0,8 e	24,7						
Bb 9609	5,6 b	30,9	0,5 efg	36,6	(-)		5,8 hg	39,7	8,3 ab	35,3	1,1 de	27,4						
Bb 9610	4,1 bc	46,5	0,8 ed	30,7	2,1 cd	34,7	2,3 h	44,2	1,8 e	53,6	1,0 de	62,3						
Bb 9611	1,6 efgh	48,9	1,7 c	28,1	4,1 b	35,3	**											
Bb 9612	2,8 cde	34,7	1,6 c	18,0	3,1 bc	23,7	17,0 edf	21,0	9,5 a	24,6	0,9 de	36,2						
Bb 9613	0,2 h	64,5	0,1 fg	100,2	1,5 cd	12,7	1,3 h	40,2	**									
Bb 9614	10,1 a	18,0	0,1 g	36,7	(-)		26,0 abc	11,9	3,0 de	44,2	1,6 abcd	19,4						
Bb 9615	8,8 a	21,9	2,4 ab	15,5	4,1 b	35,3	17,5 edf	24,7	8,8 ab	41,3	1,4 bcde	21,6						

¹SRB: Sin reactivar en broca; RB: Reactivado en broca.

* Valores seguidos de la misma letra en la misma columna, son iguales estadísticamente de acuerdo con la prueba de Tukey al 5%.

** No se estimó el promedio debido a que el cultivo para obtener las unidades experimentales, se contaminó.

(-) Aislamientos que no presentaron crecimiento al cabo de tres subcultivos.

CV= Coeficiente de variación.

TABLA 9. Producción de esporas del primero, segundo y tercer pase sin reactivar (SRB) y reactivados (RB) en la broca del café (*H. hampei*), de cultivos monoespóricos de *Beauveria bassiana*, procedentes de la segunda fuente multiespórica.

Cultivos Monoespóricos obtenidos de Bb 9205	SEGUNDA FUENTE MULTIESPÓRICA																	
	Producción de esporas/caja petri (10 ⁷) Cultivos monoespóricos a través de los subcultivos																	
	1 SRB'			2 SRB			3 SRB			1 RB'			2 RB			3 RB		
	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV
Bb 9616	3,5 d	82,3	1,6 d	48,9	2,3 b	51,9	2,0 b	54,7	2,3 de	58,5	8,1 a	42,0						
Bb 9617	2,1 d	34,7	5,6 abc	46,9	4,5 a	48,1	0,4 cd	18,0	7,8 ab	34,6	3,0 d	42,1						
Bb 9618	7,3 b	40,1	7,3 a	26,8	2,3 b	75,0	1,6 bc	48,9	0,5 e	47,7	**							
Bb 9619	2,3 d	51,9	7,8 a	34,6	2,3 b	51,9	1,5 bc	36,5	4,5 cd	27,2	4,5 bcd	23,3						
Bb 9620	10,5 a	37,0	6,1 ab	36,1	1,4 b	42,0	0,5 cd	34,7	7,5 ab	21,9	2,0 d	44,7						
Bb 9621	4,3 cd	40,4	2,6 d	38,7	1,6 b	40,5	1,2 bcd	48,8	8,0 a	27,3	7,5 ab	31,2						
Bb 9622	2,5 d	33,4	6,5 a	53,9	1,9 b	23,9	**											
Bb 9623	3,6 d	72,4	3,0 cd	86,9	2,7 b	22,7	0,1 d	38,7	5,0 bcd	74,8	4,3 cd	82,1						
Bb 9624	6,8 bc	38,6	3,6 bcd	44,5	2,0 b	44,7	0,5 cd	35,5	7,1 abc	38,8	7,1 abc	39,8						
Bb 9625	2,3 d	75,0	3,1 cd	50,5	1,5 b	36,5	3,5 a	71,7	5,3 abc	42,2	**							

'SRB: Sin reactivar en broca; RB: Reactivado en broca.

* Valores seguidos de la misma letra en la misma columna, son iguales estadísticamente de acuerdo con la prueba de Tukey al 5%.

** No fue estimado el promedio debido a que se contaminó el cultivo destinado a obtener las unidades experimentales.

CV= Coeficiente de variación.

LITERATURA CONSULTADA

1. BUSTILLO, A. E.; POSADA, F. J. El desarrollo y uso de entomopatógenos en el control de la broca del café. *In: Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología*, 23. Cartagena, julio 17-19 de 1996. Memorias. Cartagena, Socolen, 1996. p.232-253.
2. BUSTILLO, A. E.; POSADA, F. J. Elementos biológicos para un programa de manejo integrado de la broca del café en Colombia. *In: Curso de Actualización sobre Manejo Integrado de la Broca del Café*, 2. Medellín, Octubre 23-25 de 1996. Medellín, Comité Departamental de Cafeteros de Antioquia-Siada-Cenicafé, 1996. p.1-11.
3. CENTRONACIONAL DE INVESTIGACIONES DE CAFÉ-CENICAFÉ. CHINCHINÁ. ¿Tiene la broca del café enemigos nativos en Colombia?. Brocarta No.23:1-2. 1994.
4. DOBERSKI, J. W. Comparative laboratory studies on three fungal pathogens of the elm bark beetle *Scolytus scolytus*: Pathogenicity of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces farinosus* to larvae and adults of *S. scolytus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 37: 188-194. 1981.
5. ESTRADA, M. N.; VÉLEZ, P. E.; LÓPEZ, J. C. Estandarización de una metodología para obtener cultivos monoespóricos del hongo *Beauveria bassiana*. *Cenicafé* 48 (1): 59-65. 1997.
6. ESTRADA, M. N.; VELEZ, P. E.; MONTOYA, E. C. Caracterización de cultivos monoespóricos del hongo *Beauveria bassiana*. *Cenicafé* 48 (4): 217-224. 1997.
7. FARGUES, J. Etude des conditions d'infection des larves de doryphore, *Leptinotarsa decemlineata* say, par *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Entomophaga* 17 (3): 319-337. 1972.
8. FARGUES, J. Specificite des hyphomycetes entomopathogenes et resistance interspecifique des larves d'insects. These Doctorat es Sci., University of Paris VI. 1981. Citado por: FERRON, P.; FARGUES, J.; RIBA, G. Fungi as microbial insecticides against pests. *In: ARORA, D.K.; AJELLO, L.; MUKERKJI, K.G. eds. Handbook of applied micology. Vol. 2. Humans, animals and insects.* New York, Marcel Dekker, 1991. p. 665-706.
9. FENG, M. G.; JOHNSON, J. B. Relative virulence of six isolates of *Beauveria bassiana* on *Diuraphis noxia* (Homoptera:Aphididae). *Environmental Entomology* 19 (3): 785-790. 1990.
10. FERRON P. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Annual Review of Entomology* 23: 409-42. 1978.
11. FRIGO, S. M.; AZEVEDO, J. L. Variabilidade natural para crescimento, conidiacao e sobrevivencia a luz ultravioleta em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. *Revista da Agricultura* 61: 137-47. 1984.
12. GONZALEZ, M. T.; POSADA, F. J.; BUSTILLO, A. E. Desarrollo de un bioensayo para evaluar la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*. *Cenicafé* 44 (3): 93-102. 1993.
13. HALL, R. A. Effect of repeated subculturing on agar and passaging through an insect host on pathogenicity morphology, and growth rate of *Verticillium lecanii*. *Journal of Invertebrate Pathology* 36: 216-222. 1980.
14. HOOKER, A. L. Cultural variability in *Septoria avenae* through successive single-macrospore transfers. *Phytopathology* 47: 460-468. 1957.
15. MILNER, R. J. Selection and characterization of strains of *Metarhizium anisopliae* for control of soil insects in Australia. *In: LOMERCJ.; PRIOR, C. Biological control of locusts and grasshoppers.* Oxon, CAB International, 1991. p.200-207.
16. MOORE, D.; PRIOR, C. The potential of mycoinsecticides. *Biocontrol News and Informations* 14 (2): 31N-40N. 1993.
17. MORROW, B. J.; BOUCIAS, D. G.; HEATH, M. A. Lost of virulence in an isolate of an entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*, after serial *in vitro* passage. *Journal of Economic Entomology* 82 (2): 404-407. 1989.
18. MULLER-KOGLER, E. Pilzkrankheiten bei Insekten. P. Parey, Berlin and Hamburg. Citado por: FARGUES, J.; ROBERT, P. H. Effects of passaging through scarabeid hosts on virulence and host specificity of two strains of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. *Canadian Journal of Microbiology* 29: 576-583. 1983.
19. PACCOLA-MEIRELLES, L. D.; AZEVEDO, J. L. Variabilidade natural no fungo entomopatogénico *Beauveria bassiana*. *Arquivos de Biología e Tecnologia* 33 (3): 657-672. 1990.

20. RIBEIRO, G. P. Estudo sobre a variabilidade de isolamentos e culturas monospóricas de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Scrib. e identificação de racas fisiológicas que ocorrem em alguns municípios de Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro. Vicosá, Minas Gerais, Universidade Federal de Vicosá, 1974. 55p.
21. SAMSINAKOVA, A.; KALALOVA, S. The influence of a single spore isolated and repeated subculturing on the pathogenicity of conidia of the entomophagous fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology* 42: 156 -161. 1982.
22. SCHAEFFENBERG, B. Biological and environmental conditions for the development of mycoses caused by *Beauveria* and *Metarhizium*. *Journal of Insect Pathology* 6: 8-20. 1964.
23. TINLINE, R. D. Nuclear distribution in *Metarhizium anisopliae*. *Mycologia* 63: 714-721. 1971.
24. TINLINE, R.D.; NOVIELLO, C. Heterokaryosis in the entomogenous fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Mycologia* 63: 701-712. 1971.
25. VARELA, A.; MORALES, E. Characterization of some *Beauveria bassiana* isolates and their virulence toward the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. *Journal of Invertebrate Pathology* 67: 147-152. 1996.
26. VEEN, K. H. A technique for monospore cultures and the determination of nucleus numbers in *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 9: 276-279. 1967.
27. VÉLEZ, P. E.; BENAVIDES, M. Registro e identificación de *Beauveria bassiana* en *Hypothenemus hampei* en Ancuya (Nariño), Colombia. *Cenicafé* 4 (12): 50-57. 1990
28. VÉLEZ, P. E.; POSADA, F. J; MARIN, P.; GONZALEZ, M. T.; OSORIO, E.; BUSTILLO, A. E. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. *Cenicafé*, 1997. 34p. (Boletín Técnico No. 17).
29. WAINWRIGHT, M. Introducción a la biotecnología de los hongos. Zaragoza, Editorial Acribia, 1995. p.173-204.