



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

Interacción intraespecífica de aislamientos del hongo

Zoophthora radicans* en larvas de *Plutella xylostella

SANTO MORALES VIDAL

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2012

La tesis titulada **INTERACCIÓN INTRAESPECÍFICA DE AISLAMIENTOS DEL HONGO *Zoophthora radicans* EN LARVAS DE *Plutella xylostella***, realizada por el alumno **SANTO MORALES VIDAL** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA: 
DRA. RAQUEL ALATORRE ROSAS

ASESOR: 
DR. ARIEL W. GUZMÁN FRANCO

ASESORA: 
DRA. MARÍA DE JESÚS YÁÑEZ MORALES

ASESOR: 
DR. ESTEBAN RODRÍGUEZ LEYVA

ASESORA: 
DRA. MARÍA DEL PILAR RODRÍGUEZ GUZMÁN

AGRADECIMIENTOS:

Al ser más supremo del universo, Nuestro Padre Celestial por darme la existencia.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca que me otorgó para poder realizar esta investigación y terminar mis estudios de Doctorado.

Al Colegio de Postgraduados, por acogerme en sus instalaciones y darme la oportunidad de seguir estudiando para obtener mí grado de doctor en ciencias.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT) por el apoyo brindado para la realización de esta tesis en una de sus etapas.

A la Dra. Raquel: por su valiosa amistad, por su guía y por todo el apoyo que me brindó durante mi estancia en el Colegio de Postgraduados, sin el cual no habría podido terminar esta tesis, mil gracias.

Al Dr. Ariel: por su amistad y por todas la revisiones, análisis estadístico, sugerencias y por invitarme a formar parte de este gran proyecto de *Plutella xylostella*. Gracias.

A la Dra. Ma. De Jesús: por su amistad, por apoyarme en la revisión de esta tesis y sugerencias con la parte molecular, gracias.

Al Dr. Esteban: por su amistad, redacción y revisión de esta tesis, gracias.

A la Dra. Pilar: por su amistad, sugerencias y revisión de esta tesis, gracias.

A la familia Morales Vidal, por ser parte de mi esencia, por apoyarme incondicionalmente en todos los momentos de mi vida, gracias.

A la familia Cordero Morales, por ser parte de mi familia y por sus apoyos inmensamente grandes en mi vida.

A la familia Carmona Zuñiga, por ser parte de mi familia y por sus mil apoyos que me han brindado, gracias.

A todos mis amigos y compañeros con los he convivido en múltiples situaciones y que siempre me animaron a seguir adelante, son muchos, mil gracias.

A todos mis amigos y compañeros del laboratorio de Patología de Insectos y del CP: Lupita, Jorge, Fabián, Román, Nicolás, Erika, Beto, Caro, Gaby, Jhony, Alfredo, Fanny, Erika, Nubia, Iliana, Imelda, Hilda, Leticia, Alfricia, Alma, Manolo, Israel, Julio, Rebeca, Clemente, Claudio, Abimael, Daniel, Chava y se me escapan muchísimos nombres, gracias.

A la mujer que forma parte especial de mi vida, Edith, mil gracias.

A mis dos hermosas hijas Nadia y Diana, por el tiempo que no les dediqué durante mis estudios, gracias por su comprensión.

A mi mamá por traerme al mundo, guiarme y ayudarme incondicionalmente cuando no podía volar sólo, mil gracias.

Son muchísimas las personas que me han ayudado a construir mi camino, a todos ustedes, un agradecimiento infinito.

DEDICATORIAS

A un ser especial en mi vida: Edith
Por tu infinito amor, tú ahí estás... siempre a mi lado.

A mis adorables hijas: Nadia Esmeralda y Diana Isel
Por el amor especial que siento por ustedes.

A mamá y papá: Guadalupe y Joaquín †
Por ser los seres que me dieron la vida.

A todos mis hermanos y sobrinos:
Por todos los momentos que hemos compartido juntos.

A las familias Cordero Pérez y Carmona Zuñiga
Por sus innumerables apoyos.

A los académicos del Colegio de Postgraduados
Por sus valiosas contribuciones en mi formación.

Instruye al niño en su camino,
y aun cuando fuere viejo
no se apartará de él.

CONTENIDO

CONTENIDO.....	i
INDICE DE CUADROS	v
INDICE DE FIGURAS	vii
RESUMEN	xiii
Abstract	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivo General	5
1.2. Objetivos específicos	5
2. HIPÓTESIS	6
3. ANTECEDENTES	8
3.1. Interacciones entre organismos	8
3.1.1. Tipos de interacciones que se dan entre poblaciones de organismos.....	8
3.1.2. Interacciones entre entomopatógenos y otros agentes de control biológico	13
3.1.3. Interacciones entre hongos.....	17
3.2. La palomilla dorso de diamante	20
3.2.1. Biología y hábitos	21
3.2.2. Situación actual como plaga nacional e internacional	23
3.2.3. Métodos de control	24
3.2.4. Control biológico	24
3.2.4.1. Control microbial.....	26
3.3. Entomophthorales	29

3.3.1. Biología del Orden Entomophthorales	29
3.3.2. Especies importantes.....	32
3.4. <i>Zoophthora radicans</i> (Brefeld) Batko (1966)	32
3.4.1. Biología.....	32
3.4.2. Descripción morfológica.....	33
3.4.3. Situación actual de <i>Zoophthora radicans</i>	37
3.4.4. <i>Zoophthora radicans</i> como agente de control microbiano	38
3.4.5. <i>Zoophthora radicans</i> en el manejo de <i>Plutella xylostella</i>	39
3.5. Definición de PCR convencional.....	43
3.5.1. PCR como herramienta en la investigación ecológica	44
4. MATERIALES Y MÉTODOS	45
4.1. Cría de <i>Plutella xylostella</i>	45
4.2. Manejo de los aislamientos de <i>Zoophthora radicans</i>	47
4.2.1. Propagación en medio SEMA.....	48
4.2.2. Conservación en nitrógeno líquido	50
4.2.3. Recuperación de nitrógeno líquido	51
4.3. Estimación de la virulencia relativa de aislamientos de <i>Zoophthora radicans</i> hacia larvas de <i>Plutella xylostella</i>	53
4.3.1. Procedimiento.....	53
4.3.2. Diseño experimental.....	55
4.3.3. Análisis estadístico	56
4.4. Virulencia de aislamientos seleccionados de <i>Z. radicans</i> en larvas de <i>P.</i> <i>xylostella</i> y su interacción con temperaturas.....	57
4.4.1. Procedimiento.....	57

4.4.2. Diseño experimental	57
4.4.3. Análisis estadístico	59
4.5. Interacción intra-específica <i>in vitro</i> de cuatro aislamientos de <i>Z radicans</i>	59
4.5.1. Procedimiento	59
4.5.2. Diseño experimental	60
4.5.3. Análisis estadístico	60
4.6 Interacción intra-específica <i>in vivo</i> de dos aislamientos seleccionados de <i>Z. radicans</i>	62
4.6.1. Procedimiento	62
4.6.1.1. Extracción de ADN	66
4.6.1.2. Amplificación mediante PCR	67
4.6.1.3. Análisis PCR-RFLP	68
4.6.2. Diseño experimental	69
4.6.3. Análisis estadístico	69
5. RESULTADOS	71
5.1. Virulencia relativa de aislamientos de <i>Zoophthora radicans</i> en larvas de <i>Plutella xylostella</i> con temperatura constante	71
5.2. Virulencia con aislamientos seleccionados de <i>Zoophthora radicans</i> en larvas de <i>P. xylostella</i> y su interacción con temperatura	72
5.3. Interacción intraespecífica <i>in vitro</i> de los aislamientos NW386, NW250, ARSEF1699 y ARSEF6003	75
5.3.1. Comparación entre los tamaños de un aislamiento específico en presencia de los otros aislamientos.....	75

5.3.2. Comparación entre los tamaños de un aislamiento determinado obtenidos en presencia de los otros aislamientos a través del tiempo	80
5.4. Interacción intraespecífica <i>in vivo</i> de dos aislamientos de <i>Z. radicans</i> a dos temperaturas en una población de larvas de <i>P. xylostella</i>	88
5.4.1. Proporción de larvas de <i>P. xylostella</i> infectadas con NW250	88
5.4.2. Proporción de larvas de <i>P. xylostella</i> infectadas con NW386	89
5.4.3. Proporción de larvas de <i>P. xylostella</i> infectadas con los aislamientos NW386 y NW250	91
6. DISCUSIÓN GENERAL	96
7. CONCLUSIONES.....	101
9. LITERATURA CONSULTADA.....	103

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Tamaño de conidios primarios, capiliconidios y esporas de reposo de *Zoophthora radicans* (Brefeld) Batko, obtenidos de *Tortrix viridana*, de cultivos y de pulgones infectados experimentalmente.....36

Cuadro 2. Cantidades que se utilizaron de ingredientes para preparar medio SEMA, para crecer los aislamientos de *Zoophthora radicans* que se emplearon en los bioensayos de virulencia.49

Cuadro 3. Combinaciones duales de los aislamientos de *Z. radicans* NW386, NW250, ARSEF1699 y ARSEF6003.....62

Cuadro 4. Tratamientos representando diferentes proporciones relativas de conidios de cada aislamiento de *Z. radicans*. En los tratamientos duales (1-4) sólo se representa la concentración de conidios (promedio de las tres repeticiones), debido a que no fue posible la separación entre aislamientos por la morfología de los conidios. La dosis alta corresponde a una exposición de 25 min (H), y la baja a una exposición de 5 min (L).70

Cuadro 5. Virulencia (CL_{50} s en escala log con intervalos de confianza de 95%) de seis aislamientos de *Zoophthora radicans* contra *Plutella xylostella* a 22°C. CR=coeficiente de regresión (pendiente). Error estándar (ES). Intervalo de confianza (IC).72

Cuadro 6. Resultados del análisis probit de modelos paralelos realizado con cuatro aislamientos a 15, 21 y 27°C. Intercepto=a, Pendiente=b, P=Probabilidad del modelo.73

Cuadro 7. Virulencia (CL₅₀s en escala log con intervalos de confianza de 95%) de cuatro aislamientos de *Zoopthora radicans* contra *Plutella xylostella* en tres temperaturas diferentes. CR=coeficiente de regresión (pendiente). Error estándar (ES). Intervalo de confianza (IC). ES= error estándar, Intercepto (a), Pendiente (b)= Coeficiente de Regresión (CR).....74

Cuadro 8. Tamaño promedio de la colonia (cm²) de los aislamientos creciendo en presencia de cada tratamiento, a 22°C. GLT=Grados de libertad de los tratamientos, GLE=Grados de libertad del error, F=radio de la varianza de los tratamientos sobre la varianza residual, P=probabilidad de los valores F tomados de una distribución F con GLT, GLE. EE=error estándar de las diferencias de las medias.....80

Cuadro 9. Tamaño promedio de la colonia (cm²) alcanzado de cada aislamiento creciendo en presencia de otro, en el tiempo. GLT=Grados de libertad de los tratamientos. GLE=Grados de libertad del error. EE₁=error estándar de las diferencias de las medias entre tratamientos. EE₂=error estándar de las diferencias de las medias del mismo tratamiento en el tiempo. P= Probabilidad del modelo. ...86

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Palomilla dorso de diamante. A, huevos. B, cuatro instares larvales (L). C, larva del último ínstar larval. D, pupa y E, adulto.22

Figura 2. A, conidios primarios de *Zoophthora radicans*. B, conidio secundario emergiendo del primario a través de un tubo. C, capilicio emergiendo del conidio primario. D, espora de reposo, sólo algunos aislamientos los forman. E, larva esporulada donde se observan los rizoides con terminación en forma discoidal. F, rizoides emergiendo en la parte ventral de la larva. Barra horizontal= 30 µm, Objetivo, 40X. Créditos: Santo Morales-Vidal.34

Figura 3. A, conidios primarios de los diferentes aislamientos de *Zoophthora radicans*, 1. NW386, 2. ARSEF6003, 3. NW353, 4. NW250, 5. NW379, 6. ARSEF1699. B, micelio con conidióforos. C, larva con abundante esporulación, D, larva con rizoides ramificados emergiendo de la parte ventral. E, larva aparentemente sana, pero ya estaba infectada. F, larva con rizoides ventrales con terminación en forma discoidal. Barra horizontal= 30 µm, Objetivo, 40X. Créditos: Santo Morales-Vidal.35

Figura 4. Infraestructura en el insectario para criar *Plutella xylostella*. A, insectario. B, jaulas. C, plantas en jaulas. D, clima para mantener temperatura a 22°C.....45

Figura 5. A, Invernadero con plantas de brócoli. B, C, Camas con macetas con plantas de brócoli.46

Figura 6. A, incubadora. B, medio SEMA almacenado en incubadora a 22°C. C, aislamientos de *Zoophthora radicans* creciendo a 22°C. D, aislamiento ARSEF6003 creciendo en medio SEMA.50

Figura 7. Materiales para criopreservar aislamientos. A, termo beacons para NL. B, C, chiling jar; D, tanque de NL y contenedores, E, contenedor grande y F, tubos crioviales.53

Figura 8. Experimento de virulencias de *Zoophthora radicans*. A, rodajas de medio SEMA con hongos esporulados. B, inoculación de larvas. C, recipiente con cajas que tienen las larvas en incubadora. D, preparaciones para contar conidios. E, F, cajas con hojas para alimentar larvas inoculadas.58

Figura 9. Colocación de las rodajas de los aislamientos en la caja Petri en la interacción intraespecífica dual.60

Figura 10. Inoculación en larvas de *P. xylostella* de los aislamientos NW386 y NW250. A, hoja de brócoli adicionándose humus líquido de vermicomposta esterilizado. B, inoculación de larvas. C, hojas en cajas chicas. D, larva que esporuló en tubo Eppendorf. E, cajas con hojas.65

Figura 11. Tamaño promedio de la colonia (cm²) del aislamiento NW250 creciendo en presencia de aislamientos con-específicos (indicados en el eje de las x) (n=6).

La línea vertical sólida representa el error estándar (1.663) de las diferencias de las medias entre los tratamientos (15 g.l.).76

Figura 12. Tamaño promedio de la colonia (cm^2) del aislamiento ARSEF1699 creciendo en presencia de aislamientos con-específicos (indicados en el eje de las x) ($n=6$). La línea vertical sólida representa el error estándar (1.596) de las diferencias de las medias entre los tratamientos (15 g.l.).77

Figura 13. Tamaño promedio de la colonia (cm^2) del aislamiento ARSEF6003 creciendo en presencia de aislamientos con-específicos (indicados en el eje de las x) ($n=6$). La línea vertical sólida representa el error estándar (1.791) de las diferencias de las medias entre los tratamientos (15 g.l.).78

Figura 14. Tamaño promedio de la colonia (cm^2) del aislamiento NW386 creciendo en presencia de aislamientos con-específicos (indicados en el eje de las x) ($n=6$). La línea vertical sólida representa el error estándar (1.177) de las diferencias de las medias entre los tratamientos (15 g.l.).79

Figura 15. Tamaño promedio de la colonia (cm^2) del aislamiento NW250 creciendo en presencia de aislamientos con-específicos, cada intervalo de tiempo abarcó dos días. La línea vertical punteada representa el error estándar (1.551, 38.4 g.l.) para las comparaciones entre tiempos (cada intervalo=2 días) para cualquier aislamiento con-específico dado; la línea vertical sólida representa el error estándar (2.197, 37.6 g.l.) para todas las comparaciones entre tratamientos.82

Figura 16. Tamaño promedio de la colonia (cm^2) del aislamiento ARSEF1699 creciendo en presencia de aislamientos con-específicos, cada intervalo de tiempo = 2 días. La línea vertical punteada representa el error estándar (2.029, 35.3 g.l.) para las comparaciones entre tiempos (cada intervalo=2 días) para cualquier aislamiento con-específico dado; la línea vertical sólida representa el error estándar (2.465, 47.0 g.l.) para todas las comparaciones entre tratamientos.....83

Figura 17. Tamaño promedio de la colonia (cm^2) del aislamiento ARSEF6003 creciendo en presencia de aislamientos con-específicos, cada intervalo de tiempo = 2 días. La línea vertical punteada representa el error estándar (1.869, 34.2 g.l.) para las comparaciones entre tiempos (cada intervalo=2 días) para cualquier aislamiento con-específico dado; la línea vertical sólida representa el error estándar (2.491, 40.6 g.l.) para todas las comparaciones entre tratamientos.....84

Figura 18. Tamaño promedio de la colonia (cm^2) del aislamiento NW386 creciendo en presencia de aislamientos con-específicos, cada intervalo de tiempo = 2 días. La línea vertical punteada representa el error estándar (1.860, 56.2 g.l.) para las comparaciones entre tiempos (cada intervalo=2 días) para cualquier aislamiento con-específico dado; la línea vertical sólida representa el error estándar (2.086, 66.5 g.l.) para todas las comparaciones entre tratamientos.....85

Figura 19. Crecimiento dual del área micelial *in vitro* de algunos aislamientos de *Zoophthora radicans*, a los 14 días después de sembrados en medio SEMA, tiempo en el cual, por lo general, la colonia alcanza la periferia de la caja Petri. Los testigos

correspondieron a los platos donde hubo confrontación dual entre el mismo aislamiento.87

Figura 20. Proporción de larvas de *Plutella xylostella* infectadas con el aislamiento NW250 (n=3), a dos temperaturas de incubación (22 y 27°C), cuando se inoculó por 25 (dosis altas= H) o 5 (dosis bajas=L) minutos, solo y en combinación con los diferentes tratamientos de NW386. Las barras representan el error estándar (EE).89

Figura 21. Proporción de larvas de *Plutella xylostella* infectadas con el aislamiento NW386 (n=3), a dos temperaturas de incubación (22 y 27°C), cuando se inoculó por 25 (H) o 5 (L) minutos, solo y en combinación con los diferentes tratamientos de NW250. Las barras representan el error estándar (EE).90

Figura 22. Proporción de larvas de *Plutella xylostella* infectadas con los aislamientos NW386 y NW250 (infección dual), (n=3), a dos temperaturas de incubación (22 y 27°C), cuando se inocularon ambos aislamientos a 25 (dosis alta) o 5 (dosis baja) minutos simultáneamente por combinación de los mismos periodos de tiempos. Las barras representan el error estándar de la medias.92

Figura 23. Ejemplo del perfil de RFLP de los aislamientos NW386 y NW250 de *Z. radicans* generados por la enzima de restricción DdeI utilizando producto de PCR amplificado de la región ITS, utilizando DNA genómico extraído de larvas infectadas e incubadas a 22°C. Los números superiores en cada línea representan

los tratamientos inoculados sobre las larvas (Cuadro 4). T1 y T2 son los controles negativos utilizando agua destilada estéril. Tamaño del marcador 100 pb.94

Figura 24. Ejemplo del perfil de RFLP de los aislamientos NW386 y NW250 de *Z. radicans* generados por la enzima de restricción Ddel utilizando producto de PCR amplificado de la región ITS, utilizando DNA genómico extraído de larvas infectadas e incubadas a 27°C. Los números superiores en cada línea representan los tratamientos inoculados sobre las larvas (Cuadro 4). T1 y T2 son los controles negativos utilizando agua destilada estéril. Tamaño del marcador 100 pb.95

RESUMEN

La existencia de interacciones intraespecíficas entre aislamientos de una misma especie al infectar un mismo hospedante es muy probable. En esta investigación se estudiaron las interacciones entre aislamientos de *Zoophthora radicans* (Brefeld) Batko, *in vitro* e *in vivo* durante la infección de larvas de *Plutella xylostella* L. La identidad de los aislamientos causantes de la infección de larvas de *P. xylostella* se realizó con base en análisis de PCR-RFLP. Se encontraron diferencias significativas en la virulencia de aislamientos de *Z. radicans* contra larvas de *P. xylostella*, los aislamientos obtenidos de larvas infectadas de *P. xylostella* (NW386 y NW250) fueron más virulentos que aquellos aislamientos obtenidos de otros hospedantes. La temperatura también tuvo un efecto significativo; NW250 fue más virulento a 27°C y NW386 fue más virulento a 22°C. El crecimiento *in vitro* de todos los aislamientos fue afectado por la presencia del crecimiento de otros aislamientos en el mismo medio artificial, excepto para el aislamiento NW386. El resultado de las interacciones entre NW386 y NW250 dentro de la larva fueron significativamente afectadas por la concentración de conidios inoculados, el aislamiento con más concentración infectó exitosamente más larvas que su competidor. Larvas infectadas con ambos aislamientos únicamente se encontraron en los tratamientos donde la concentración de conidio para ambos aislamientos fue alta. En tratamientos donde la concentración de conidios inoculados fue baja para ambos aislamientos, sólo el aislamiento NW250 fue exitoso en la infección. En este trabajo se discuten las implicaciones de estos resultados en la ecología de *Z. radicans*.

Palabras clave: Infecciones mixtas, virulencia, inoculación dual, palomilla dorso de diamante.

Abstract

Intraspecific interactions amongst isolates of the same species are likely to occur during competition for the same host. We investigated these interactions, both *in vitro* and during infection of larvae of the diamondback moth, *Plutella xylostella* L., using isolates of *Zoophthora radicans* (Bref.) Batko, that had been characterised for their virulence and temperature attributes. We distinguished between isolates within infected hosts using PCR-RFLP. Significant differences were found in the virulence of the *Z. radicans* isolates against *P. xylostella*; isolates obtained from field-infected *P. xylostella* larvae (NW386 and NW250) were more virulent than isolates obtained from other insect hosts. Temperature had a significant effect; isolate NW250 was most virulent at 27 °C and isolate NW386 was most virulent at 22 °C. *In vitro* growth of all isolates was affected by the presence of other isolates grown in the same artificial medium, except for isolate NW386. The outcomes of interactions between NW250 and NW386 within larvae were significantly affected by conidial concentration at the time of inoculation as the isolate with the greatest concentration successfully infected (i.e. resulted in sporulation on the dead host) more larvae than its competitor. Dual infected larvae were only found in treatments where the concentration of conidia at inoculation was high for both isolates. In treatments where the concentration of conidia at inoculation was low for both isolates, only NW250 caused any successful infection. The implications of these results for the ecology of *Z. radicans* are discussed.

Keywords: mixed infections, virulence, dual inoculations, diamondback moth.

1. INTRODUCCIÓN

La palomilla dorso de diamante, *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) está distribuida en todas las partes productoras de crucíferas alrededor del mundo (Talekar y Shelton, 1993). A nivel mundial se encuentra entre las 20 principales plagas que causan daños a los cultivos y en crucíferas es considerada la plaga número uno (Talekar y Shelton, 1993), los costos anuales a nivel mundial para su control fluctúan alrededor de un billón de dólares (Talekar, 1992; Shelton, 2004). En el estado de Guanajuato, México, se considera la plaga más importante en el cultivo del brócoli y de no aplicarse insecticidas puede haber pérdidas considerables en la producción (Bujanos, 2000; Díaz *et al.*, 2000; Bujanos y Marín, 2005).

El uso indiscriminado de insecticidas para controlar a la palomilla dorso de diamante ha generado resistencia al menos a 73 productos diferentes, incluyendo algunas cepas de *Bacillus thuringiensis* Berliner y sus toxinas (Tabashnik, 1994; Ferré y van Rie, 2002; Gujar y Mohan, 2002; Arthropod Pesticide Resistance Database, n.d.). Como consecuencia, *P. xylostella* está considerada entre los 20 artrópodos más resistentes en el mundo (Mota-Sanchez *et al.*, 2002), por lo que la búsqueda de alternativas de control que coadyuven en el manejo integrado de esta plaga es importante.

Una alternativa importante de control de plagas es el uso de agentes microbiales. Diferentes patógenos han sido sugeridos para el control microbioal de *P. xylostella*

(Pell, *et al.*, 2001) y entre ellos, el hongo entomopatógeno *Zoophthora radicans* (Bref.) Batko (Entomophthorales: Entomophthoraceae) es uno de los potenciales. Este es un hongo que ha sido reportado causando epizootias en diferentes especies de insectos incluyendo *P. xylostella* (McGuire *et al.*, 1987a; Galaini-Wraight *et al.*, 1991; Riethmacher *et al.*, 1992; Yeo *et al.*, 2001).

En forma natural, se han encontrado a los hongos entomopatógenos *Z. radicans* y *Pandora blunckii* (Lakon y Zimmerman) Humber, infectando larvas en poblaciones de *P. xylostella* en brócoli en algunas regiones del estado de Guanajuato. Ambos patógenos se han encontrado en el mismo tiempo y espacio, por lo que las interacciones interespecíficas son muy posibles (Alatorre *et al.*, 2000; Velasco-Silva *et al.*, 2000; Alatorre y Hernández, 2003).

Cuando seleccionamos una especie o aislamiento para el control microbial de cierta especie de insecto plaga, la virulencia hacia este hospedante, otras especies de insectos y su persistencia en campo se consideran normalmente (Posada y Vega, 2005); sin embargo, no se realizan estudios básicos y fundamentales sobre las interacciones que pudieran ocurrir entre especies liberadas y otras especies de patógenos o aislamientos nativos. Estas interacciones son importantes, porque en combinación con la variación de algunas condiciones abióticas, podrían modificar la capacidad infectiva del aislamiento liberado (Guzmán-Franco, *et al.*, 2009; Guzmán-Franco, *et al.*, 2011; Zamora-Macorra *et al.* en prensa). Mientras las interacciones intraespecíficas entre aislamientos de la misma especie de hongos son particularmente escasas, a pesar de que su importancia es aceptada (Read y

Taylor, 2001; Quesada y Vey, 2003; de Roode *et al.*, 2005), no existen estudios para especies de hongos entomoftorales.

Se cree que las interacciones entre microorganismos siempre se dan en forma natural (Douglas, 2010), e incluso que es una regla para estos (Read y Taylor, 2001), y también es común que se den infecciones por múltiples patógenos o parásitos en los mismos hospederos (Cox, 2001).

Existen siete tipos principales de interacciones entre organismos: cooperación, mutualismo, comensalismo, amensalismo, competencia, depredación y parasitismo; los organismos a lo largo de su vida pueden adoptar más de un tipo de interacción, volviéndose un sistema dinámico (Sutton, 2007).

A diferencia del orden Hypocreales que producen metabolitos secundarios en el proceso de infección (Ownley *et al.* 2010), en los hongos entomopatógenos del orden Entomophthorales no se han encontrado metabolitos secundarios o antibióticos al momento de inoculación, durante el proceso de virulencia o cuando se colocan de manera dual entre especies *in vitro* o *in vivo* (Guzmán-Franco, 2005; Roy *et al.*, 2006), entonces, la interacción que se presenta en las especies de *Z. radicans* y *P. blunckii* es del tipo competencia, donde la presencia de una de ellas, puede afectar el desarrollo o virulencia de la otra especie (Guzmán-Franco *et al.*, 2009).

Hay varios trabajos de relaciones intra-específicas en diversas especies de organismos como son: variación intraespecífica en virulencia de aislamientos de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin contra langosta (Quesada y Vey, 2003); variación intraespecífica de hongos ectomicorrízicos de la raíz del *Quercus* sp. (Smith *et al.*, 2007).

Una razón de la falta de estudios sobre la ecología de infecciones duales causadas por aislamientos con-específicos, es la dificultad para distinguir entre dos o más aislamientos infectando al mismo hospedero cuando los conidios tienen el mismo tamaño y morfología; sin embargo, este problema puede ser resuelto utilizando técnicas moleculares (Enkerli y Widmer, 2010). En estudios recientes, se ha demostrado que *Z. radicans* está comprendida en líneas genéticas diversas que pueden ser separadas usando técnicas moleculares (Guzmán-Franco *et al.*, 2008a) y esto representa un modelo importante para el estudio de interacciones entre aislamientos de la misma especie.

En algunas especies del orden entomoftorales se ha logrado saber que presentan variación intraespecífica al estudiarlas con técnicas moleculares como son ITS-RFLP, ISSR, ERIC y RAPD en *Entomophthora muscae* (Cohn) Fresen (Jensen *et al.*, 1998), *Z. radicans* (Tymon *et al.*, 2004; Guzmán-Franco, 2008a), *Entomophthora maimaiga* Humber, Shimazu & Soper (Nielsen *et al.*, 2005), *Pandora neoaphidis* (Remaudière & Hennebert) Humber (Tymon y Pell 2005), *P. blunckii* y *Conidiobolus* spp. (Tymon *et al.*, 2004; Guzmán-Franco *et al.*, 2008a); pero, en ningún trabajo de investigación se han puesto a competir de manera directa dos

aislamientos de la misma especie de hongos entomoftorales sobre un mismo hospedante.

Con base en lo anterior, se realizó la presente investigación donde se estudió la interacción intraespecífica de aislamientos de *Z. radicans* *in vitro* e *in vivo* al infectar larvas de *P. xylostella*. Para esto se realizó una serie de experimentos donde se estimó la virulencia y su interacción con temperatura de seis aislamientos hacia larvas de *P. xylostella*. Posteriormente, con un número menor de aislamientos (cuatro) se estudió su interacción *in vitro*, para finalmente seleccionar dos aislamientos y cuantificar su interacción al infectar larvas de *P. xylostella*. Los aislamientos fueron distinguidos entre sí utilizando un análisis de PCR-RFLP; cada aislamiento produjo un patrón de banda de RFLP diferente (Guzmán-Franco *et al.*, 2008a) permitiendo categorizar las larvas infectadas con respecto a si ellas fueron infectadas por NW250, NW386 o ambos aislamientos.

1.1. Objetivo General

Estudiar la interacción intraespecífica de aislamientos biológica y genéticamente diferentes de *Z. radicans* en larvas de *P. xylostella*.

1.2. Objetivos específicos

- Estimar la virulencia relativa de aislamientos de *Z. radicans* sobre larvas de *P. xylostella* a temperatura constante.

- Estudiar el efecto de la temperatura en la virulencia relativa de aislamientos seleccionados de *Z. radicans* hacia larvas de *P. xylostella*.
- Estudiar la interacción intra-específica *in vitro* de cuatro aislamientos de *Z. radicans*.
- Estudiar bajo el efecto de dos temperaturas, la interacción intraespecífica de dos aislamientos de *Z. radicans* en larvas de *P. xylostella*.

2. HIPÓTESIS

No todos los aislamientos de *Z. radicans* tienen la misma virulencia a la misma temperatura sobre larvas de *P. xylostella*. La temperatura influye en la virulencia de algunos aislamientos.

En una competencia intraespecífica dual *in vitro* del crecimiento micelial de aislamientos de *Z. radicans*, hay un efecto negativo para uno o para los dos aislamientos que compiten por la misma fuente de alimento.

En una infección dual en una competencia intraespecífica coexiste más de un aislamiento de *Z. radicans* al mismo tiempo y en la misma larva infectada.

En una interacción intraespecífica dual de aislamientos de *Z. radicans* gana la competencia intraespecífica el que tenga mayor concentración de conidios al momento de inoculación.

3. ANTECEDENTES

3.1. Interacciones entre organismos

Las comunidades consisten de todos los organismos que viven en un área particular. Cada organismo ocupa su propio nicho y tiene sus propios requerimientos para sobrevivir, muchos de ellos incluyen interacciones con otras especies en la comunidad. Cada especie se encuentra con otras y una gran variedad de interacciones pueden presentarse en una cadena compleja que forma las bases de la estabilidad de la comunidad. Cada una de éstas interacciones algunas veces son llamadas relaciones “simbióticas” o “vivir juntos” (Douglas, 2010), aunque éste término en sentido estricto sólo se utiliza para referirse a aquellas relaciones en las cuales los organismos permanecen en contacto constante y necesario, mejor conocida como “interacción mutualista”. Dependiendo de qué tipo de interacciones ocurran entre los organismos se puede llevar a la población a tres respuestas: la población crece (+), decrece (-), o se mantiene sin alteración aparente (0), (Mann *et al.*, 1992).

3.1.1. Tipos de interacciones que se dan entre poblaciones de organismos

Se conocen siete tipos básicos de interacción entre los organismos, éstos, pueden cambiar de un tipo a otro a lo largo de su vida, volviéndose un sistema dinámico; todas estas interacciones están involucradas en la resistencia ambiental extrínseca (factores externos que afectan a la población). Estas interacciones son:

cooperación, mutualismo, comensalismo, amensalismo, competencia, depredación y parasitismo. En la cooperación (+/+), ambas poblaciones se benefician, la interacción es opcional para ambas especies; en el mutualismo (+/+), ambas poblaciones se benefician, la interacción es necesaria para la supervivencia y crecimiento de cada una de las especies; en el comensalismo (+/0), una de las poblaciones se beneficia, la otra resulta inafectada; en el amensalismo (-/0), una de las poblaciones es inhibida, la otra resulta inafectada; en la competencia (-/-), una población elimina a la otra, en el proceso ambas sufren; en la depredación (+/-), una de las poblaciones se beneficia, la interacción es necesaria para la supervivencia del depredador; y por último, en el parasitismo (+/-), ocurre lo mismo que con la anterior, la interacción es necesaria para la supervivencia del parásito (Sutton, 2007).

Un gremio ecológico es un grupo de especies que explotan el mismo recurso en una forma similar, dándose interacciones entre los miembros de ese gremio (Root, 1972). La competencia es una interacción entre individuos que tienen en común una misma fuente de recursos de manera limitada, dando como resultado reducción en la supervivencia, crecimiento o reproducción al menos en algunos de los individuos compitiendo (Begon *et al.*, 1996).

A nivel de especies, existen dos tipos de interacciones entre individuos, la interespecífica y la intraespecífica (Begon *et al.*, 1996; Price, 1997); la interacción interespecífica se da entre especies diferentes que se encuentran compitiendo por la misma fuente de alimento al mismo tiempo, pudiendo salir afectadas de dos

maneras, la primera es que una especie excluya a la otra y la segunda tendencia es que las dos especies coexistan, al final una de las dos o las dos son afectadas en su longevidad o fecundidad (Read y Taylor, 2001); las interacciones intraespecíficas se dan en individuos de la misma especie que se encuentran compitiendo por la misma fuente de recursos (territorio y tensión social entre los organismos involucrados); en estas interacciones los nichos son los mismos, por tanto la intensidad de competencia es alta (Begon *et al.*, 1996; Read y Taylor, 2001; Sutton, 2007; Meyling y Hagek, 2010).

El impacto de la competencia en la población es una reducción de la supervivencia, efecto negativo en el crecimiento y en la reproducción. La competencia se puede dar de manera directa (competencia de interferencia) o indirecta (competencia de explotación), en la interacción de competencia directa, ambas especies actúan directamente en tratar de quitar o evitar que la otra ocupe el mismo espacio o trate de disponer de la misma fuente de recursos, a través de la producción de químicos que son tóxicos para la otra especie; en la competencia de explotación, una especie responde a la cantidad de recurso dejado por otras especies (Begon *et al.*, 1996).

La competencia de exclusión se da cuando una especie excluye a la otra; cuando dos especies tratan de obtener el mismo recurso en el mismo espacio, pero una de ellas sufre reducción en la supervivencia o en la fecundidad se denomina coexistencia; cuando ambas especies se afectan negativamente se da el antagonismo mutualista (Begon *et al.*, 1996).

Las interacciones que ocurren en las poblaciones de la misma especie son factores internos de la población llamados factores intrínsecos (Read y Taylor, 2001). Los factores de la resistencia ambiental intrínseca, que afectan a la población de una misma especie, se dan porque los miembros de la misma especie tienden a competir por los mismos recursos de manera más intensa que en las interacciones anteriores, la gran mayoría proviene de las interacciones intra-específicas (territorio y tensión social entre los organismos involucrados); en estas interacciones los nichos son los mismos, por tanto la intensidad de competencia es muy alta, en las interacciones interespecíficas los nichos son diferentes, sólo cuando se traslapan se dan las interacciones, por lo tanto, la intensidad de competencia es baja (Sutton, 2007).

Es bien conocido que la respuesta de la competencia no depende solamente de la habilidad de cada especie, sino que hay otros factores que considerar, como la cantidad de inóculo en el tiempo de inicio de la competencia, tiempo de llegada primero a la fuente de recurso, la temperatura, entre los más importantes (Santamarina, *et al.*, 2003; Fargues y Bon, 2004; Furlong and Pell, 2005; Bleiker y Six, 2009; Guzmán-Franco *et al.*, 2009).

En una revisión de Read y Taylor (2001) se discutieron las investigaciones de trabajos experimentales de cómo los clones de una misma especie pueden ser afectados entre sí, por ejemplo, *Plasmodium berhei* Vinck & Lips un protozoo unicelular transmisor de malaria y su vector es el mosquito *Anopheles stephensi* Liston. Cuando una cepa virulenta de *P. berhei* se inoculó en ratones nativos, se

alcanzaron altos niveles de parasitemias y los ratones murieron, pero cuando se inoculó primero una cepa atenuada y tres días después se inoculó la cepa virulenta, el resultado fue que los niveles de parasitemias fueron más bajos y ningún ratón murió; con *Plasmodium chabaudi* Landau, inoculado en ratones ocurrió algo similar, los clones AS o CB actuando sólo había mayor número de parásitos por infección, pero los clones al actuar en infecciones en mezcla, el número de parásitos por infección fue menor. La misma respuesta se dio al inocular con *Salmonella typhimurium* (ex Kauffmann & Edwards) Le minor & Popoff a pollos de un día de edad con una cepa virulenta y una atenuada inoculada previamente, la cepa virulenta fue afectada por la cepa atenuada a partir de las primeras horas, bajando drásticamente a las 24 horas y después de las 48 horas ningún pollo se moría. La nagana o enfermedad del sueño la produce el *Trypanosoma congolense*, en ganado, había individuos con enfermedad crónica que tenían la línea IL-311 de este parásito y había individuos sanos, cuando la mosca tsé-tsé los infectó con la línea IL-285, los sanos mostraron alta parasitemia a las dos semanas, y los que estaban enfermos crónicamente fue nula la parasitemia. Cuando los clones individuales del *P. chabaudi* fueron adquiridos por contagio de ratones a mosquitos, sucedió que el número de parásitos por mosquito fue mayor en las infecciones mezcladas de los clones que en las enfermedades de clones individuales, a pesar de la supresión competitiva. En muchos experimentos entre microorganismos de la misma especie encontraron que líneas avirulentas ganaban la competencia sobre cepas virulentas en un hospedero en específico. Las vacunas siguen el principio de atenuación para atenuar virus virulentos.

3.1.2. Interacciones entre entomopatógenos y otros agentes de control biológico

Las interacciones entre agentes de control microbiano y enemigos naturales (parasitoides, depredadores) pueden suceder cuando tienen una misma población hospedante de insectos, resultando en efectos benéficos o perjudiciales; sin embargo, estos efectos pueden ser evitados o minimizados a través de la selección cuidadosa de patógenos específicos. En este contexto, varios investigadores comprueban la presencia de interacciones sinérgicas que demuestran la posibilidad de coexistencia de estos agentes dentro de un mismo ambiente, no obstante, las interacciones antagonistas entre entomopatógenos y parasitoides también pueden ocurrir (Furlong y Pell, 2005; Dos Santos, *et al.*, 2006).

Estudios desarrollados por Furlong y Pell (2000) con el hongo entomopatógeno *Z. radicans* sobre el parasitoide de *P. xylostella*, *Diadegma semiclausum* Hellén, demostraron que los adultos del parasitoide fueron susceptibles al hongo. En larvas parasitadas a los tres y cuatro días previos a la inoculación con *Z. radicans*, este hongo mostró una gran desviación negativa en la producción de conidios, produciendo menos conidios, lo que indica una fuerte competencia ejercida por las larvas del parasitoide. No hubo diferencias significativas en larvas parasitadas un día antes de inocularlas con el hongo.

También, en estudios desarrollados por Mesquita *et al.* (1999) con el hongo entomopatógeno *Paecilomyces fumosoroseus* (Wise) Brown y Smith, sobre la

actividad depredadora y parasítica de *Aphelinus asychis* Walker. Éste es un parasitoide del pulgón ruso del trigo *Diuraphis noxia* (Mordvilko) Kurdjumov y fue investigado bajo tres humedades relativas (67-73%, 85-89%, y de 94-98%). Estos autores encontraron que el parasitoide fue susceptible de ser infectado por el hongo, pero únicamente a altas temperaturas.

En otro estudio con parasitoides, Tillman *et al.* (2004) encontraron que tres parasitoides, *Cardiochiles nigriceps* Viereck, *Campolestis sonorensis* Cameron y *Microplitis croceipes* Cresson, que atacan la larva de *Heliothis virescens* F. eran capaces de transmitir los ascovirus con el ovipositor a nuevos hospederos; sin embargo, el virus tenía un efecto negativo en la supervivencia del parasitoide, sobre todo si este tenía menos de 48 horas dentro de la larva hospedera

En el estudio sobre las interacciones de hongos entomopatógenos y depredadores Pell *et al.* (1997) investigaron las interacciones entre el áfido *Acyrtosiphon pisum* Harris y dos de sus enemigos naturales, la catarinita *Coccinella septempunctata* L. y el hongo *P. neoaphidis*. Estos autores demostraron que bajo condiciones de laboratorio, los adultos de *C. septempunctata* particularmente cuando se someten a un ayuno de 48 horas, aceptan comer los pulgones *A. pisum* infectados con el hongo entomopatógeno *P. neoaphidis*. Ésta es una interacción antagónica potencialmente como inóculo necesario para la transmisión extensa y el desarrollo de epizootias en las poblaciones del áfido; sin embargo, los depredadores gastaron menos tiempo en la alimentación, excepto para los individuos que se sometieron a ayuno durante 48 horas sobre los áfidos infectados en comparación con los no

infectados, y el número de áfidos devorados fue mayor en los no infectados. Los adultos de *C. septempunctata* fueron capaces de ser vectores pasivamente de conidios de *P. neoaphidis* a los áfidos susceptibles, en 10-11% de la población, bajo las condiciones del laboratorio.

Un depredador capaz de transmitir conidios a pulgones sanos fue *Hippodamia convergens* Guérin-Ménéville. Pell y Vandenberg (2002), evaluaron la interacción entre los hongos entomopatógenos *Paecilomyces fumosoroseus* Wize, que infecta al áfido *D. noxia* y el depredador *H. convergens*. Se observaron interacciones negativas intragremio. Cuando el hongo estaba esporulando sobre el pulgón la catarinita no se alimentaba de estos, o lo realizaba en menor cantidad, lo cual fue positivo para el hongo porque el inóculo secundario no fue removido de transmisiones subsecuentes. Cuando el depredador forrajeaba era capaz de transmitir el hongo a poblaciones de pulgones sanas hasta en un 22%, bajo ciertas condiciones tales como períodos largos de humedad alta y estrés.

Koppenhofer y Kaya (1996) evaluaron las interacciones entre los nematodos entomopatógenos *Steinernema carpocapsae* Weiser, y *Steinernema glaseri* Steiner, en larvas de *Galleria mellonella* L. *S. glaseri* fue más competitivo que *S. carpocapsae*, cuando ambas fueron inoculadas simultáneamente a la misma concentración. La competencia fue medida basada en número de progenie producido por cada especie en el hospedero. Ambas especies sufrieron una reducción en el número de progenie en inoculaciones en pareja; sin embargo, *S. carpocapsae* fue más afectado por la presencia de *S. glaseri*. Los autores sugieren

que el desarrollo más rápido de *S. glaseri* podría ser responsable de este resultado. Bajo condiciones de campo, es posible que dos o más nematodos entomopatógenos pudieran coexistir si los nematodos tienen diferentes conductas de búsqueda, separándolos especialmente por susceptibilidad de hospederos diferenciales (Koppenhöfer y Kaya, 1996).

Cuando dos patógenos con atributos biológicos diferentes, tales como especificidad del hospedero (especialistas contra generalistas) interactúan dentro de un hospedero, los patógenos especialistas usan los recursos (hospederos) más eficientemente que los generalistas (Perlman y Jaenike, 2001). Estos autores investigaron las interacciones entre los nematodos especialistas *Parasitylenchus nearcticus* Poinar y el nematodo generalista *Howardula aoronymphium* Welch, ambos infectando a la mosca *Drosophila recens* Wheeler. Ellos encontraron que los nematodos especialistas podrían excluir competitivamente a los nematodos generalistas en hospederos individuales y en los niveles de población, a pesar de estos resultados, ambos nematodos se encontraron en el campo infectando a *D. recens* y se sugirió que los nematodos generalistas persisten en el campo infectando hospederos alternos.

Bauer *et al.* (1998) usando *Limantria dispar* L., investigaron las interacciones entre los microsporidios *Nosema* sp. y el virus de la poliedrosis nuclear (NPV), ambos infectivos de la larva. Ellos encontraron que las larvas susceptibles al virus no fueron afectados por *Nosema* sp., la subsecuente infección por el virus fue más virulenta, lo cual sugirió un sinergismo entre estos dos patógenos. Esto en esencia

es considerado positivo desde el punto de vista de control de la plaga, es decir, estos dos entomopatógenos cuando coinciden infectando una misma población de larvas de la plaga, son efectivos contra ésta, incluso puede haber sinergismo en la virulencia, los dos logran su supervivencia, y al haber menos unidades infectivas de virus, no afectan o muy poco a otras larvas de enemigos naturales. Sin embargo, se encontró, un efecto negativo para el NPV, ya que la producción de unidades virales fue menor, incluso la larva produjo tanto unidades virales infectivas como esporas de *Nosema* sp.

3.1.3. Interacciones entre hongos

La temperatura de una región, la especificidad de un hongo entomopatógeno y la producción de metabolitos secundarios hacia un hospedante son factores importantes para determinar la respuesta de competencia entre muchas especies de hongos. Los investigadores entienden mejor estas interacciones gracias a los avances de la biología molecular. Trabajos recientes han demostrado fuertes interacciones competitivas entre los fitopatógenos y hongos endófitos de la hoja (mutualismo con la planta) (Arnold *et al.* 2003), entre hongos ectomicorrízicos (Kennedy y Bruns 2005) y hongos saprotróficos (Boddy, 2000). En ecología de poblaciones se tienen las herramientas para estudiar organismos que son fáciles de separar a especie, incluso a individuos por sus características y tamaño, cuantificar sus efectos en sus relaciones con plantas y animales; los investigadores realizan estudios de competencia entre éstas poblaciones de una manera relativamente fácil, cuantificando sus efectos mediante análisis estadísticos; no

obstante, se sospecha que los mismos patrones de interacciones que se dan en organismos pudieran presentarse en los microorganismos como son los hongos; aunque a diferencia de los anteriores, es difícil medir los efectos de competencia que presentan los microorganismos, debido a su tamaño, o que son difíciles de identificar morfológicamente. A pesar de ello, con las herramientas moleculares se está avanzando en el campo de la micro-ecología de poblaciones. Por ejemplo, Kennedy y Bruns (2005) utilizaron un protocolo con PCR-RFLP simple para conocer entre dos especies de micorrizas (no identificables una de la otra por su morfología) cuál era la que lograba colonizar las raíces de una planta hospedante, esto se logró mediante la extracción de su ADN, es decir, la presencia de producto de PCR digerido con enzimas de restricción con la técnica de RFLP, para conocer cual de las dos era detectada (presencia de ADN), concluyéndose exclusión competitiva de una si no era detectado su producto de RFLP. El uso de métodos como el PCR en tiempo real también ha facilitado el estudio de competencia entre hongos permitiendo cuantificar directamente la cantidad de biomasa que pertenece a diferentes especies en los tratamientos de especies mezcladas (Kennedy, *et al.*, 2007; Kennedy, 2010; Peay *et al.*, 2008).

La temperatura puede definir una respuesta competitiva cuando dos hongos entomopatógenos se aplican juntos sobre una población de insectos, Inglis *et al.* (1997) estudiaron esto en chapulines infectados al mismo tiempo con *B. bassiana* y *Metarhizium anisopliae* (Metchnikof) Sorokin. Así, encontraron que a altas temperaturas la competencia la ganaba *M. anisopliae* y a bajas temperaturas la ganaba *B. bassiana*, a las mismas concentraciones en los dos casos.

Adicionalmente observaron que si los chapulines los exponían al sol cuatro horas, la mortalidad se bajaba en el caso de *B. bassiana* hasta un 98%, en el caso de *M. anisopliae* la mortalidad solo disminuía hasta un 23%, lo cual significó que altas temperaturas afectan más a *B. bassiana* y a *M. anisopliae* las bajas temperaturas. En ningún caso se encontraron coinfectando chapulines, lo que indica que hubo exclusión competitiva en todos los casos.

Cuando un hongo entomopatógeno es más específico hacia un hospedante, actuando solo, podría expresar una mayor virulencia en comparación con otro más generalista (avirulento), pero cuando los dos entomopatógenos se inoculan juntos sobre un mismo hospedante podría resultar en una competencia negativa para uno de ellos o para los dos, ya que hay atenuación de la virulencia, esto fue estudiado por Thomas *et al.* (2000). Estos trabajaron con adultos de *Schistocerca gregaria* Forskål usando un aislamiento virulento de *M. anisopliae* var. *acridum* y dos avirulentos de *B. bassiana*. Con el trabajo de estos autores se encontró que inoculados solos, la mortalidad de *B. bassiana* siempre fue baja y la de *M. anisopliae* var. *acridum* alta; en cambio, cuando fueron coinoculadas las dos especies, la mortalidad por *M. anisopliae* se anuló en un gradiente de temperatura que fue aumentando en el tiempo de 20 a 40°C y después se mantuvo constante a 30°C. Los autores concluyeron que la presencia de un patógeno avirulento (*B. bassiana*) afectó el desempeño de un patógeno virulento (*M. anisopliae*) y que este es también influenciado por la temperatura y orden de infección.

La producción de metabolitos secundarios también define la respuesta de competencia entre hongos. Por ejemplo, el efecto de la competencia intraespecífica de *Aspergillus flavus* Link en la formación de aflatoxinas (aislamientos de maíz). En este caso se colocaron aislamientos que no producían las aflatoxinas contra los que sí tenían este gen, en diferentes proporciones suspendidas en cultivos en discos, los resultados fueron que las cepas productoras de aflatoxinas en presencia de las no productoras eran inhibidas, estos autores concluyen que pudo ser debido a la exclusión física del aislamiento que tenía el gen productor por los aislamientos no productores o por la competencia de obtención de nutrientes necesarios para la biosíntesis de las aflatoxinas, o por cooperación mutua del micelio de los aislamientos con el gen que codifica para la producción de aflatoxinas y los aislamientos que no la producían para formar una red de trabajo cuando infectaban al mismo tiempo (Wicklow *et al.*, 2003).

3.2. La palomilla dorso de diamante

La palomilla dorso de diamante, *P. xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae) es originaria de Asia, se distribuye por todas las zonas donde se encuentran las crucíferas y es la plaga más importantes de estos cultivos de crucíferas (Talekar y Shelton, 1993).

En la región del Bajío, Guanajuato, México, *P. xylostella* reduce severamente el rendimiento y la calidad del brócoli (*Brassica oleracea* var. *Itálica*), considerándose la principal plaga del cultivo. Si no se aplican insecticidas para su combate toda la

producción puede perder su valor comercial (Bujanos, 2000; Díaz *et al.*, 2000; Bujanos y Marín, 2005); desarrolla rápidamente poblaciones resistentes a diferentes grupos toxicológicos de insecticidas que se emplean para su combate, e incluso a los de tipo biológico como *B. thuringiensis* (Shelton *et al.*, 1993; Talekar y Shelton, 1993). Este insecto es una de las plagas considerada en la lista de los 20 artrópodos más resistentes a productos químicos sintéticos (Mota-Sánchez *et al.*, 2002).

3.2.1. Biología y hábitos

P. xylostella es una especie de metamorfosis completa, que pasa por los estados biológicos de huevo, larva, pupa y adulto (Fig. 1) (Sánchez, 2000). Su ciclo biológico puede ser muy corto, de 15 días a 24 °C (Liu *et al.*, 2002), o puede durar de 3 a 6 semanas dependiendo de la temperatura y otras condiciones ambientales (Sánchez, 2000).

Las palomillas son de hábitos crepusculares ya que son más activas al atardecer y al inicio de la noche (Bujanos, 2000). Regularmente los adultos emergen durante la mañana y se encuentran listos para copular al atardecer del mismo día. Los huevos son colocados uno a uno o en grupos pequeños (Miner, 1970). Sánchez (2000) observó que las palomillas ovipositan entre las 7:00 y las 8:00 durante la noche dos o tres días después del apareamiento. Pueden depositar de 18 a 245 huevos en el envés y con menor frecuencia en peciolos y tallos; sin embargo, en condiciones de

alta infestación y cuando la inflorescencia del brócoli está presente, pueden encontrarse huevos en las cabezas del brócoli (Bujanos, 2000).

El periodo de incubación de los huevos va de 2 a 8 días, después emergen las larvas que se alimentan de las hojas, al pasar al segundo ínstar minan entre la capa superior e inferior de esta, mientras que los ínstares más avanzados se alimentan del envés, haciendo pequeños orificios en la hoja y como resultado producen una sintomatología denominada “tiro de munición” (Machain *et al.*, 1975).

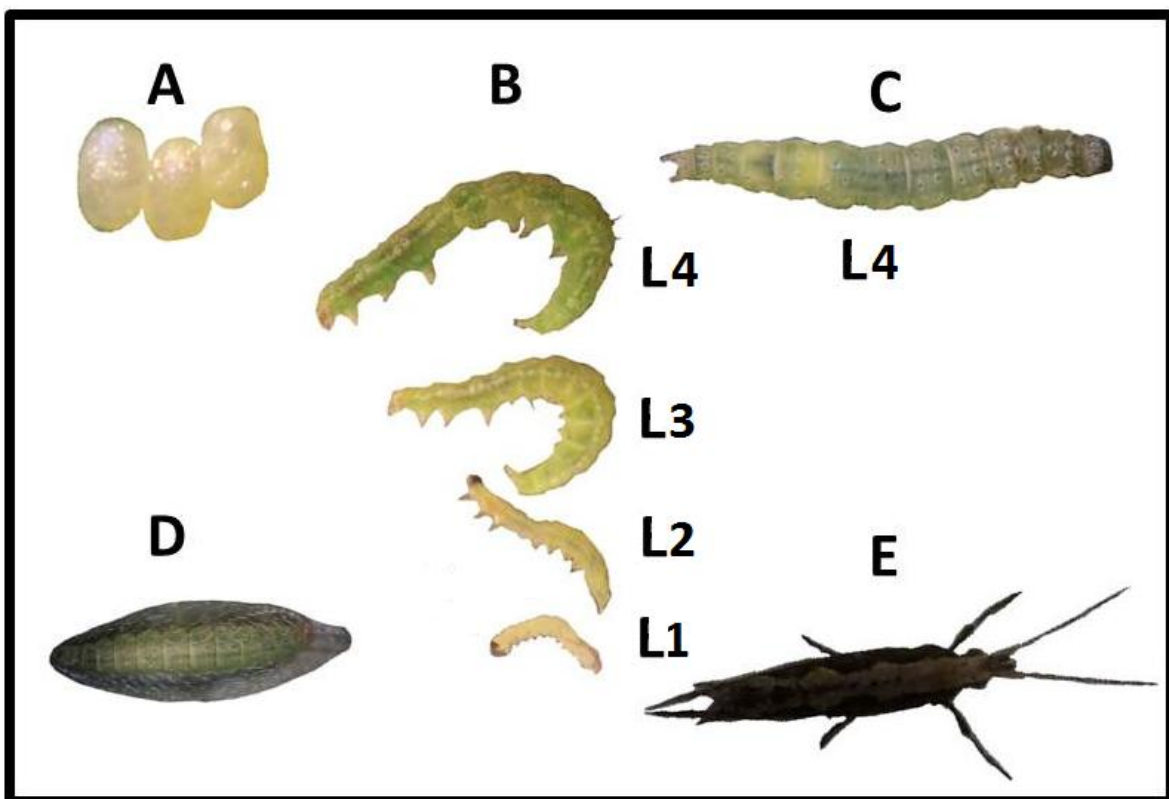


Figura 1. Palomilla dorso de diamante. A, huevos. B, cuatro ínstares larvales (L). C, larva del último ínstar larval. D, pupa y E, adulto.

Cuando las larvas son molestadas presentan un hábito característico de desplazamiento ondulante hacia atrás y se dejan caer de la planta utilizando un hilo de seda, este comportamiento las distingue de otras larvas que atacan crucíferas (Machain *et al.*, 1975; Pacheco, 1985). Las larvas pasan por 4 instares y aproximadamente en seis a quince días alcanzan su máximo desarrollo, llegando a medir 1 cm de largo; hilan un capullo de seda que es adherido a las hojas y tallos de la planta y dentro de este pupan. El adulto emerge después de una o dos semanas y vive aproximadamente dos semanas, los primeros días realiza la cópula, de dos a tres días después de la cópula la hembra coloca los huevos (Ho, 1965). El ciclo de la palomilla dorso de diamante, como la mayoría de los insectos, está relacionado estrechamente con la temperatura; se ha determinado que requiere de aproximadamente 340 Unidades Calor (U.C.), arriba de 7.3°C, para el desarrollo de su ciclo, tiene una longevidad promedio adultos hembra de 255.5 ± 21.7 U.C. y de adultos macho de 278.4± 29.5 U.C. (Bujanos, 2000).

3.2.2. Situación actual como plaga nacional e internacional

La palomilla dorso de diamante es la plaga más importante en el cultivo del brócoli, si se encuentran en promedio tres larvas en un embarque para exportación, se rechazará éste. Para interrumpir el desarrollo de sus generaciones, pues puede tener de 6 a 16 generaciones por año, se han establecido dos periodos de vedas en la zona del Bajío en el estado de Guanajuato y Querétaro. Norma oficial mexicana 081-NOM-FITO-2001 por la que se establece el Manejo y eliminación de focos de infestación de plagas, mediante el establecimiento o reordenamiento de

fechas de siembra, cosecha y destrucción de residuos, comprendiendo los siguientes periodos: Zona Bajío (Guanajuato y Querétaro) del 30 de abril al 15 de junio, para la zona norte de Guanajuato del 15 de enero al 28 de febrero, zona centro de Querétaro del 1° de enero al 14 de febrero y zona sur de Querétaro del 15 de diciembre al 1° de febrero (DOF, 2002; Bujanos, 2000; Bujanos y Marín, 2005).

A nivel internacional la palomilla dorso de diamante se encuentra distribuida en todas las zonas productoras de crucíferas, y se menciona que su manejo cuesta más de un billón de dólares por año (Talekar y Shelton, 1993; Shelton *et al.*, 1997; Grzywacz *et al.*, 2010).

3.2.3. Métodos de control

Existen varios métodos para controlar esta plaga como son el cultural, biológico, el legal y el químico. Dentro los métodos alternativos se mencionarán el biológico en general y el uso de microorganismos en particular.

3.2.4. Control biológico

El control biológico se refiere a la reducción de una población plaga a través de sus enemigos naturales, con la participación del hombre (control biológico inducido) o sin involucrar la actividad humana (control biológico natural); dichos enemigos

naturales de insectos-plaga incluyen a parasitoides, depredadores y entomopatógenos (Bujanos *et al.*, 1993).

En cuanto a parasitoides de *P. xylostella* Lim (1986) menciona principalmente las familias Ichneumonidae y Braconidae (Hymenoptera) y están en orden decreciente *Diadegma*, *Apanteles* (=Cotesia) y *Microplitis*. Bujanos *et al.* (1993), mencionaron que en la región del Bajío se presentan los géneros *Diadegma*, *Cotesia*, *Campoletis*, *Tetrastichus*, *Gelis* y *Habrocitus*; pero la especie más frecuente es *Diadegma insulare* Cresson con índices de parasitismo de 10 a 30%. Martínez *et al.* (2002) encontraron en el estado de Querétaro, México un total de cuatro parasitoides primarios y un hiperparasitoide e indicaron que el más frecuente fue *D. insulare*.

Talekar y Shelton (1993) mencionaron que existen alrededor de 90 especies de parasitoides que atacan al género *Plutella*, de los cuales 57 son de importancia: 6 en huevos, 38 en larvas y 13 en pupas. De estos sólo 40 atacan a *P. xylostella* y según Lim (1986), sólo dos especies: *Diadegma semiclausum* Hellén (Hymenoptera: Ichneumonidae) y *Cotesia plutellae* Kurdjumov (Hymenoptera: Braconidae) se han introducido exitosamente en varios países tropicales y subtropicales.

Los depredadores también juegan un papel importante en la densidad de población de la palomilla dorso de diamante. Eigenbrode *et al.* (1995) examinaron el papel de los depredadores, observando que tanto en campo como en invernadero se

reducía la sobrevivencia de *P. xylostella* por depredadores como *H. convergens* y *Orius insidiosus* Say, efectivos en hojas brillosas, y *Chrysoperla carnea* Stephens en hojas de coloración normal.

Algunas de los grupos de especies depredadoras benéficas que se encuentran en la región del Bajío, México, asociadas a crucíferas y que pudieran tener algún papel en la regulación de la población de *P. xylostella* incluyen catarinitas, moscas sírfidas, carábidos, chinche asesina y chinche damisela (Bujanos y Marín, 2005).

3.2.4.1. Control microbial

En el control microbial se han investigado microorganismos de los grupos de bacterias, hongos, virus y nematodos. Referente a las bacterias, durante las últimas décadas, el uso de *Bacillus thuringiensis* se ha generalizado como una práctica común para controlar diferentes especies de lepidópteros, y se ha constituido como una herramienta valiosa dentro de las estrategias de Manejo Integrado de Plagas. Sin embargo, en la región del Bajío, México, a últimas fechas se ha observado una tendencia de la palomilla dorso de diamante a la adquisición de resistencia al bioinsecticida (Bujanos y Marín, 2005).

También los hongos se han empleado para regular poblaciones de la palomilla dorso de diamante. En Benín, Godonou *et al.* (2009) aplicaron *B. bassiana* y *M. anisopliae* a dosis de 1 kg/ha para controlar *P. xylostella*, en esas condiciones el producto formulado de los hongos fue más efectivo que el insecticida bifentrin, o los

controles, en el número de larvas muertas; esto fue posible bajo condiciones de alta humedad (julio y agosto) óptima para que actuaran estos entomopatógenos.

En Australia, Vickers *et al.* (2004), realizaron autodiseminación de *Z. radicans* en un campo cultivado con plantas de brócoli. A los cuatro días de haber liberado las palomillas machos encontraron larvas infectadas con el hongo sobre las plantas y transcurridos 48 días el nivel de infección alcanzó el 70%, dándose una epizootia inducida. También se muestrearon los conidios vía aérea y se observó que estos jugaron un papel importante en la dispersión del entomopatógeno hacia la población de *P. xylostella*.

Padmavathamma y Veeresh (1995) al alimentar larvas de *P. xylostella* sobre hojas en las cuales se había aplicado el virus de la poliedrosis nuclear (VPNPx), a concentraciones dentro del rango de 1.7×10^9 a 1.7×10^{11} PIB/mL y mantenidas en el laboratorio a 28.5 ° C y 89 % de HR, encontraron que el periodo de incubación del virus se incrementó y que la mortalidad decreció con el avance de la edad de la larva al tiempo de aplicación; asimismo, la tasa de pupación disminuyó con el incremento de las dosis aplicadas a los primeros instares larvales, pero para tratamientos en el cuarto ínstar todas las larvas puparon. A concentraciones bajas la proporción de adultos malformados que emergieron fue más bajo para larvas tratadas del primer a tercer ínstar que para aquellas del cuarto ínstar.

En Bangalore, India, al aplicarse el virus de la poliedrosis nuclear en campos de col (var. Pride de la India), a concentraciones de 1.7×10^8 , 1.7×10^7 o 1.7×10^6 PIB/mL

en suspensiones con dos protectores de la luz solar en diferentes combinaciones, se encontró que la reducción más grande en las poblaciones de *P. xylostella* ocurría con el tratamiento de 1.7×10^8 PIB/mL mezclado con ink de la India (Padmavathamma y Veeresh, 1995).

Baur *et al.* (1997) investigaron la habilidad de los nematodos entomopatógenos para infectar a la dorso de diamante, y encontraron un rango de mortalidad en las larvas de *P. xylostella* desde 7%, causado por *Steinernema kushidai* Mamiya, hasta 95% causado por *S. carpocapsae*; los valores de CL_{50} para *S. carpocapsae*, *S. riobravis* Cabanillas, Poinar, Raulston y *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar fueron 14.6, 15.4, y 65.4 nematodos/ larva, respectivamente. En resumen, la sobrevivencia de los nematodos y la infección hacia las larvas de *P. xylostella* fueron más bajas para *S. riobravis* que en *S. carpocapsae*; además, la mortalidad de *P. xylostella* fue más alta en hojas pubescentes que en hojas lisas.

Choo *et al.* (1989) mencionan que la patogenicidad de los nematodos entomopatógenos de Corea, contra insectos plagas locales, difieren dependiendo de la especie de nematodo usada o del insecto problema. Así, las mortalidades de las larvas de *P. xylostella* fueron 51.8, 77.8, 96.3 o 100% para *Steinernema sp.*, y 50.0, 74.1, 96.3 o 98.1% para *Heterorhabditis sp.* cuando se expusieron a 3, 6, 12 o 24 nematodos/larva, respectivamente.

3.3. Entomophthorales

Papierok y Hajek (1997) mencionan que el orden Entomophthorales incluye cerca de 200 especies patógenas de insectos y ácaros. Keller (2007) menciona alrededor de 220 especies. Los autores también mencionan que estos entomopatógenos son diferentes de otros grupos de hongos patógenos por causar epizootias de manera natural principalmente a los insectos de los órdenes Diptera, Hemiptera, Lepidoptera y Ortoptera.

La última clasificación de los entomoftorales los ubica en el Subphylum Entomophthoromycotina, Orden Entomophthorales, Familia Entomophthoraceae, no tienen definido el Phylum ni la Clase (Mycobank, 2012).

Batko y Weiser (1965), citados por Humber (1981), mencionan cerca de 150 especies que agruparon dentro del género *Entomophthora*, pero Humber (1981) reconsidera una reclasificación tomando en cuenta varios aspectos de las características de los Entomoftorales, incluso realiza observaciones a la clasificación europea de los Entomophthorales por Keller y en 1998 publicó una clave para la identificación de este orden (Humber, 1998).

3.3.1. Biología del Orden Entomophthorales

Básicamente los Entomophthorales son parásitos obligados que se caracterizan por disparar los conidios a partir de los insectos hospederos una y otra vez hasta que

logran dar con su objetivo, en el caso de *Z. radicans* infecta todos los estados inmaduros y al adulto presentando entonces esporas primarias, secundarias y en algunas especies hasta la séptima espora. El protoplasma de las esporas pasa a través de un tubo germinativo, para dar lugar a la subsiguiente, pero éstas son más pequeñas y capaces de infectar cuando encuentran la cutícula del insecto, algunos géneros presenta esporas de reposo de pared gruesa que les permite vivir a condiciones desfavorables, las estructuras que pueden presentar son cistidios (un tipo micelio), conidios, capiliconidios, capilicios y rizomorfos (rizoides) que sirven para que los insectos queden adheridos al sustrato (Figura 2 y3) (Remaudière *et al.*, 1976; Humber 1981; Alatorre y Guzmán, 2000; Keller, 2007).

El desarrollo del hongo en el insecto puede ser influenciado por la eficacia de los hemocitos en encapsular y melanizar el patógeno. Casi siempre los hematocitos se agregan al lugar de la penetración cuticular, formando algunas veces nódulos alrededor de las esporas inyectadas. En el interior de los insectos la germinación usualmente procede de esporas que están fuera de la agregación de hematocitos, pero para que se desarrollen siempre deben de estar afuera del agregado. La segunda fase es la invasión de los tejidos por parte del micelio hasta causar la muerte del insecto, dura de 2 a 3 días. Durante el proceso de invasión se producen una gran variedad de metabolitos secundarios, tóxicos. Los síntomas de la enfermedad en el insecto son la pérdida de sensibilidad, descoordinación de movimientos y parálisis. Cuando el insecto muere queda momificado. Algunas veces se pueden presentar zonas de pigmentación localizadas que corresponden a los sitios de penetración de los conidios en el tegumento. Finalmente sigue la

tercera fase, la esporulación y el inicio de un nuevo ciclo. Eventualmente el micelio del hongo se observa primero en las articulaciones y partes blandas de los insectos, y en días posteriores se incrementa a todo el cuerpo hasta finalmente cubrirlo. Tras la muerte del insecto y bajo unas condiciones de humedad relativa alta las conidiosporas pueden extenderse a través del cuerpo cubriéndolo con un tenue material fungoso característico (Tanada y Kaya, 1993).

En el caso del género *Zoophthora* los insectos bajo condiciones de laboratorio presentan algunas veces más pseudorizomorfo ventral, por el cual son fijados a la planta hospedera; éste es subcilíndrico y desciende de la parte ventral del abdomen del insecto. El pseudorizomorfo se ensancha en el ápice formando una pequeña placa adhesiva. Es fácilmente diferenciable de los pseudorizomorfos de género *Entomophthora* ya que penetran sobre la línea media del abdomen formando una masa más espesa no cilíndrica. Algunas especies presentan esporas de reposo (Remaudière *et al.*, 1976).

El género *Neozygites* es favorecido por las lluvias, humedades relativas de 90% activan eficazmente a este hongo. Los insectos alados infectados mueren con sus alas ligeramente separadas y sujetas a su cuerpo, mientras que los sanos sujetan sus alas en su parte posterior. También se puede observar un espolvoreado de partículas translúcidas, cristalinas, que corresponden a las esporas en sus cuerpos. Los insectos infectados se ven de color gris oscuro y aspecto arrugado (Dedryver, 1978).

3.3.2. Especies importantes

Del género *Zoophthora* hay tres especies muy importantes: *Zoophthora phytonomi* Ben- Ze'ev y Kenneth, se encuentra atacando a larvas del picudo de la alfalfa *Hypera variabilis* Herbs. (= *H. postica* Gyll.) y al picudo del trébol *H. punctata* Fabricius (= *Phytonomus punctatus* Fabricius) (Ben-Ze'ev y Kenneth, 1981). *Zoophthora radicans* (Brefeld) Batko, ataca pulgones, curculiónidos y lepidópteros. *Zoophthora phalloides* Batko, se encuentra infectando a varias especies de pulgones (Remaudière *et al.*, 1976; Papierok 1984; Bonifacio *et al.* 1991; Kathie *et al.*, 1995).

3.4. *Zoophthora radicans* (Brefeld) Batko (1966)

Se encuentra reportada en Australia, Brasil, Canadá, Israel y Suiza (Papierok *et al.*, 1984); Francia y Suecia (Remaudière y Keller, 1976); Estados Unidos (Bonifacio *et al.*, 1991); Malasia (Pell y Willding, 1992a) y México (Alatorre y Hernández, 2003).

3.4.1. Biología

Z. radicans es un hongo capaz de infectar y matar un amplio rango de insectos. Produce esporas de reposo de pared gruesa en las que puede o no haber meiosis (Kathie *et al.*, 1995). Se han registrado epizootias, alrededor del 82% de mortalidad encontrándose el estado conidial durante estas. Este hongo desarrolla apresorios antes de penetrar la cutícula del hospedero (Bonifacio, 1990); además forma un conidióforo corto y proyecta una hifa secundaria semejante al conidio primario pero

más convexo, ésta a su vez puede proyectar un tercer conidio para encontrar al hospedero. Puede emitir un capilicio (parecido a un capilar largo), del cual se origina el capiliconidio, el cual es una forma pasiva de infección, ya que contiene un pegamento en el extremo que se adhiere al pasar un insecto cerca de éste. Las temperaturas a las que actúa son de 21 a 23°C; y humedad relativa del 100% (Remaudière *et al.*, 1976).

3.4.2. Descripción morfológica

Los conidióforos son generalmente ramificados digitalmente (forma de dedos). Los conidios primarios y secundarios son hialinos, uninucleados, de forma elongada con extremos redondeados, con una papila apical basal y de simetría bilateral, tamaño del conidio primario de 15-30 µm. Conidio secundario similar al conidio primario, pero más pequeño, de 11 a 19 micras. El crecimiento de la colonia del hongo en yema de huevo tiene un aspecto rugoso, se desarrolla en Agar-Glucosa-Sabouraud, donde germinan las esporas de reposo y los conidios son menos abundantes. Los capiliconidios son alargados, fusiformes, con simetría bilateral o amigdaliformes (forma de almendra), mide 17-22 x 5-6 µm. Las esporas de reposo son esféricas, café claro, de pared gruesa, aparentemente lisas, contienen gránulos finos y opacos, con un glóbulo central parecido a una gota de aceite, miden de 21 a 32 µm (Fig. 2 y 3; Cuadro 1) (Remaudière *et al.*, 1976; Humber, 1998).

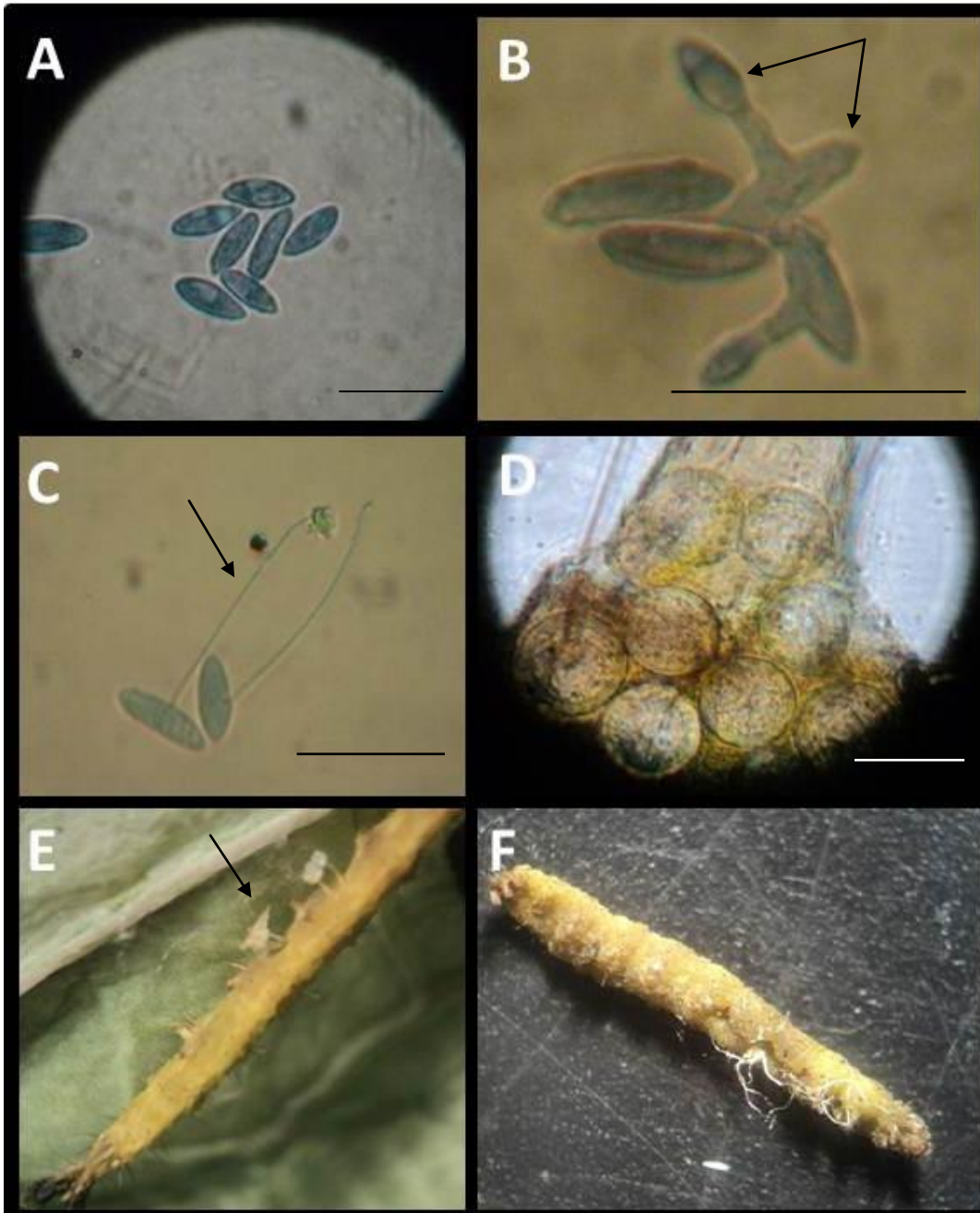


Figura 2. A, conidios primarios de *Zoophthora radicans*. B, conidio secundario emergiendo del primario a través de un tubo. C, capilicio emergiendo del conidio primario. D, espora de reposo, sólo algunos aislamientos los forman. E, larva esporulada donde se observan los rizoides con terminación en forma discoidal. F, rizoides emergiendo en la parte ventral de la larva. Barra horizontal= 30 μm , Objetivo, 40X. Créditos: Santo Morales-Vidal.

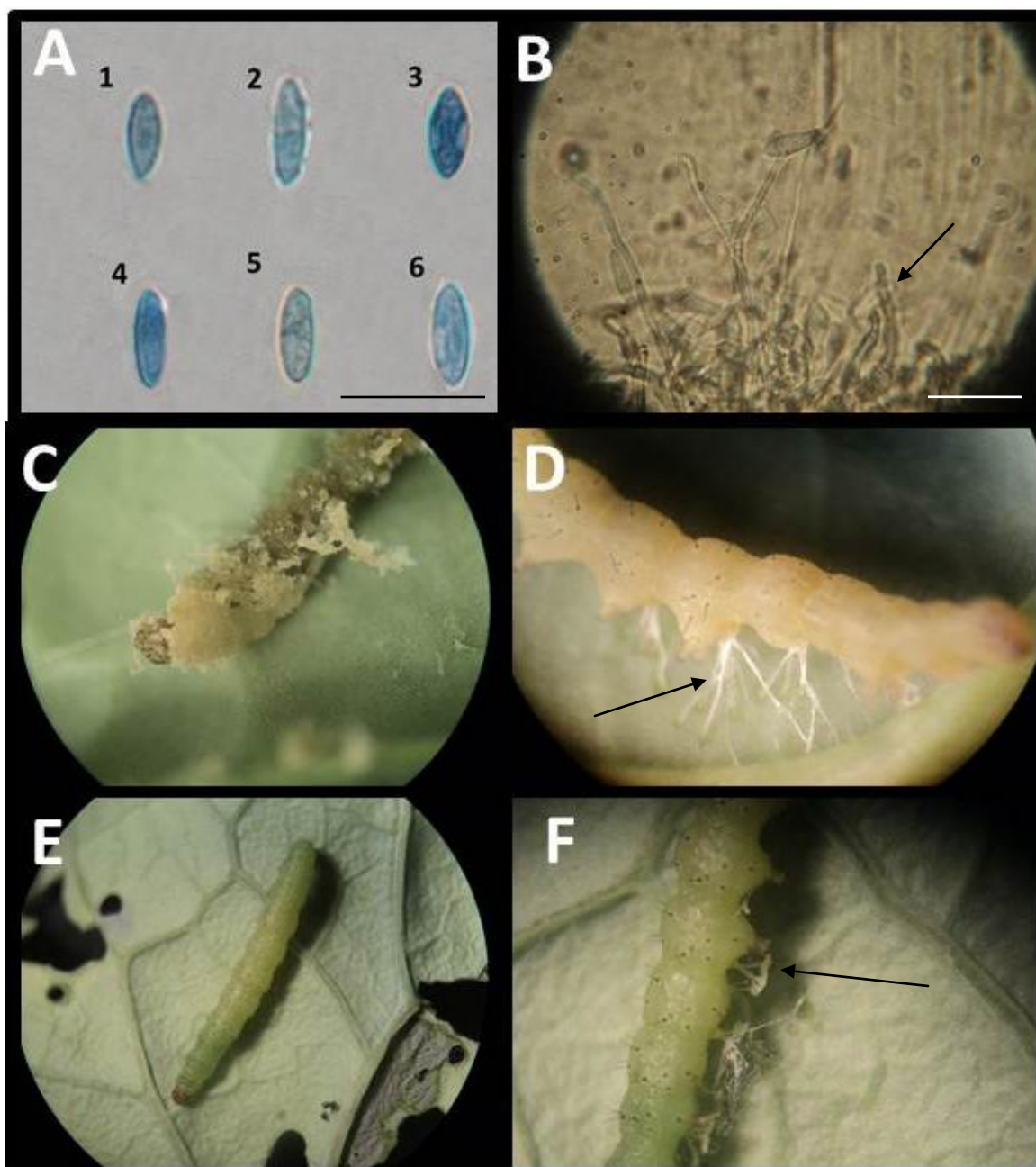


Figura 3. A, conidios primarios de los diferentes aislamientos de *Zoophthora radicans*, 1. NW386, 2. ARSEF6003, 3. NW353, 4. NW250, 5. NW379, 6. ARSEF1699. B, micelio con conidióforos. C, larva con abundante esporulación, D, larva con rizoides ramificados emergiendo de la parte ventral. E, larva aparentemente sana, pero ya estaba infectada. F, larva con rizoides ventrales con terminación en forma discoidal. Barra horizontal= 30 μ m, Objetivo, 40X. Créditos: Santo Morales-Vidal.

Cuadro 1. Tamaño de conidios primarios, capiliconidios y esporas de reposo de *Zoophthora radicans* (Brefeld) Batko, obtenidos de *Tortrix viridana* L., de cultivos y de pulgones infectados experimentalmente.

		n	Largo	Ancho o Diámetro	Factor L/A
Conidios primarios					
Larvas de <i>Tortrix</i>	n°1	50	16.4(14-19)	5.4 (5-6)	3.0 (2.5-3.5)
	n°2	50	16.0(13-21)	5.4 (5-6)	2.8 (2.4-3.5)
	n°3	50	20.1 (17-24)	7.3 (6-9)	2.8(1.9-3.2)
	n°4	50	16.5(13-22)	5.7 (4-7)	2.9 (2.2-3.5)
	n°5	20	18.4(16-22)	6.1	3.0 (2.5-3.5)
pulgón (1. Exp.)		50	16.2(13-19)	5.5 (4-6)	2.9 (2.2-3.6)
Cultivo	n°1	50	21.4(18-25)	7.0 (6-9)	3.0 (2.5-3.5)
	n°2	50	19.9(12-19)	5.9 (4-6)	2.4 (2.2-3.4)
Capiliconidios					
Larvas de <i>Tortrix</i>	n°1	50	13.3(11-16)	5.0 (4-6)	2.7 (2.2-3.3)
	n°5	50	16.9(13-19)	5.4 (5-6)	3.1 (2.6-3.6)
Cultivo	n°1	50	16.8 (14-20)	6.8 (6-8)	2.5 (2.0-3.0)
	n°2	50	16.1 (13-21)	5.6 (5-7)	2.9 (2.5-3.3)
Esporas de reposo					
Larvas de <i>Tortrix</i>	n°6	50		26.6 (22-32)	
	n°7	50		26.1 (22-30)	
	n°8	50		27.4 (24-30)	
	n°9	50		27.7 (22-30)	
	n°10	50		24.5(21-30)	
Promedio de larvas	n°6-13	360		26.1	
Sobre cultivos:					
	Sabouraud + yema de huevo	50		30.1 (22-37)	
	Yema de huevo + leche	50		28.8 (24-35)	
	Yema de huevo + leche	20		30.7 (25-36)	

n= número de esporas de reposo y de conidios medidos, L/A=relación de la longitud/ancho de conidios. Los valores entre paréntesis son

las medidas extremas de las estructuras observadas. Cuadro tomado de Remaudière *et al.* (1976).

3.4.3. Situación actual de *Zoophthora radicans*

Z. radicans es una especie que tiene un amplio potencial para ser utilizada en el control biológico; en forma natural causa epizootias en algunos insectos, pero a diferencia de los Hyphomycetes que producen masas de conidios secos, hidrofóbicos, además son estables bajo un amplio rango de condiciones ambientales y son fácilmente producidos en masa y formulados para aplicaciones inundativas; los entomoftorales, tienen conidios de pared delgada, propágulos mucilaginosos, que son dispersados activamente, son difíciles de producir, cosechar y formular a una escala industrial (Wraight *et al.*, 2003).

Son varios los investigadores que ha intentado desarrollar un método apropiado para establecer este hongo de manera exitosa en campo en contra de las plagas que ataca, entre ellas *P. xylostella* (Riethmacher *et al.*, 1992; Pell *et al.*, 1993a; Furlong, *et al.*, 1995; Furlong *et al.*, 1997; Reddy *et al.*, 1998; Furlong y Pell, 2001; y Vickers *et al.*, 2004). El mejor método hasta el momento es el de la autodiseminación del hongo en el cultivo, poniendo trampas para las palomillas adultas y que estas su vez dispersen el entomopatógeno a la población no infectada (Pell *et al.*, 1993b; Furlong, *et al.*, 1995; Vickers *et al.*, 2004).

En México se ha encontrado este hongo infectando a *P. xylostella* de forma natural en el estado de Guanajuato (Velasco-Silva *et al.*, 2000; Alatorre y Hernández, 2003).

Hasta la fecha se han hecho varios intentos a nivel de laboratorio por formular este hongo con el propósito de utilizarlo de forma masiva en campo; un proceso de formulación de entomoftorales mediante desecación y estabilización del micelio se patentó por los investigadores McCabe y Soper (1985) del USDA-ARS, EE.UU. Este proceso facilitó el desarrollo de una formulación granular de *Z. radicans* con éxito en el establecimiento del hongo, y en el inicio de epizootias en las plagas de cultivos locales (Wraight, *et al.* 1986; Wraight y Roberts, 1987). Pero a pesar de estos resultados, no se han materializado productos bioplaguicidas comerciales basados en micelio seco de *Z. radicans* (Wraight *et al.*, 2003; Grzywacz *et al.*, 2010).

Wraight *et al.* (2003) realizaron pruebas en cadáveres de *Empoasca kraemeri* Ross & Moore infectados con *Z. radicans* para la producción de conidios y también con la formulación de micelio seco del hongo, rehidratándolo, para la producción de conidio a nivel de laboratorio y de campo. En los dos casos se obtuvieron resultados similares en cuanto a la esporulación, aunque fue ligeramente mayor en los cadáveres infectados del insecto. Esto sugiere que el micelio seco y rehidratado puede ser una fuente como inóculo inicial para las epizootias.

3.4.4. *Zoophthora radicans* como agente de control microbiano

Z. radicans se ha encontrado atacando en forma natural a *Empoasca fabae* Harris (Kathie *et al.*, 1995) y *E. kraemeri* (Cicadellidae: Hemiptera) (Leite *et al.*, 1996); *P.*

xylostella (Pell y Wilding, 1992a); *Acyrtosiphon pisum* Harris (Papierok *et al.*, 1984); *T. viridana* y a *Sitobion avenae* Fabricius (Remaudière *et al.*, 1976).

Este hongo también se ha encontrado en las siguientes especies: *Choristoneura biennis* Free, *Acleris variaria* Fernald, *Choristoneura biennis* Cariboo, *Choristoneura fumiferana* Clemens, **Tortrix viridens*, **Ptycholoma aeriferana*, *Merophyas divulsana* Walker (Lepidoptera: Tortricidae) British, Newfoundland, *Lambdina fiscellaria* Guen. (Lepidoptera: Geometridae) Ming's Bigh, *Thymelicus lineola* Ochs. (Lepidoptera: Hesperiiidae), *Psylla trimaculata* Mathur (Hemiptera: Psyllidae), *Macrosiphoniella oblonga* Mordv. (Hemiptera: Aphididae), *Therioaphis maculata* Buckton (Hemiptera: Aphididae), *Therioaphis trifolii* Monell, *Neodiprion tsugae* Middleton (Hymenoptera: Diprionidae), *Typhlocybina* sp. (Hemiptera: Cicadellidae), *Empoasca vitis* Göthe (Hemiptera: Cicadellidae), *Metopolophium dirhodum* Walker (Hemiptera: Aphididae) y **Psyllida estriosa* (Hemiptera: Aphididae), *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Hemiptera: Aleyrodidae) (Humber, 1974; Kathie *et al.*, 1995; Keller, 2007).

3.4.5. *Zoophthora radicans* en el manejo de *Plutella xylostella*

Pell y Wilding (1992b) observaron la sobrevivencia de tres aislamientos de *Z. radicans* como cuerpos hifales en larvas secas de *P. xylostella*, evaluaron tres diferentes temperaturas (4, 10 y 20°C) con una humedad relativa de 20%. Ellos encontraron que había esporulación de conidios después de transcurridas 8 semanas a 20°C; hasta las 16 semanas a 10°C, y a 4°C seguía la esporulación

después de 34 semanas. Conocer esto es importante al pensar en el uso de este entomopatógeno como parte de un manejo integrado de plagas.

Pell *et al.* (1993a) probaron la virulencia con conidios de 23 aislamientos de *Z. radicans* de diferentes orígenes, y hospederos, contra larvas de *P. xylostella*. El aislamiento 250 NW, cuyo hospedero original fue *Plutella xylostella* y con origen en Malasia, fue el que mostró mayor potencial. Otros de esos aislamientos mataban parte de la población, pero producían esporas de reposo, lo cual no es deseado si se piensa en la dispersión del hongo bajo condiciones de campo, ya que esta se da principalmente por conidio. Otros aislamientos produjeron conidios pero no mataron a las larvas.

Reddy *et al.* (1998) observaron que la infección con *Z. radicans* inhibe la respuesta a la producción de la feromona sexual de *P. xylostella*. Ellos realizaron bioensayos con hembras y machos, en el caso de las hembras observaron que redujeron la exposición de la glándula sexual al tercer día después de haberse inoculado; en los machos redujeron su respuesta a la feromona sexual sintética a partir del segundo día, pero en el bioensayo de estimulación mecánica no hubo respuesta en este tiempo sino hasta el tercer día. Después del tercer día en hembras y machos no se encontró respuesta funcional a la exposición de glándulas o estimulación a la feromona sexual, respectivamente.

Furlong y Pell (2001) realizaron pruebas de la transmisión horizontal de los hongos entomopatógenos *Z. radicans* y *B. bassiana* en adultos y larvas de *P. xylostella* en

hojas de col. Estos autores encontraron que las palomillas dorso de diamante tratadas con los hongos podían infectar pasivamente a las no tratadas; también los adultos podían transmitir los entomopatógenos a larvas sanas que entraban en contacto con éstas.

Riethmacher *et al.* (1992) observaron y midieron la virulencia transmitida en forma natural de *P. blunckii* y *Z. radicans* en larvas de *P. xylostella* alimentada en plantas de col y en nabo. La virulencia de ambos hongos fue superior a 95% en larvas y del 70% en pupas en plantas de col, y de 20% en larvas y 30% en pupas sobre plantas de nabo. Con lo cual concluyen que estos entomopatógenos son capaces de producir epizootias en forma natural.

Furlong *et al.* (1997) evaluaron los efectos que produce *Z. radicans* sobre larvas de *P. xylostella*, observando que a partir del tercer día las larvas infectadas con el hongo disminuyeron la alimentación en un 44% respecto al control y murieron al cuarto día. La ovipostura de las palomillas sobrevivientes infectadas se redujo considerablemente respecto al testigo después del tercer día.

Furlong *et al.* (1995) investigaron la autodiseminación de conidios del hongo entomopatógeno *Z. radicans* en adultos machos *P. xylostella*, estos eran atraídos hacia trampas que tenían la feromona sexual sintética más el hongo esporulando. En la trampa las palomillas machos buscaban alrededor de 88 segundos con el fin de aparearse, y eran expuestos a la lluvia de conidios del hongo, y fue tiempo

suficiente para producir una inoculación con el hongo. Durante 3 a 3.5 días estos insectos fueron capaces de contaminar a palomillas hembras.

Pell *et al.* (1993a) demostraron, mediante un marcador fluorescente instalado en la trampa que tenía la feromona sexual sintética más el hongo esporulando, que las palomillas macho de *P. xylostella* si entraban y salían de la trampa, de esta forma se exponían a la lluvia de conidios y dispersaban el hongo a plantas de col alrededor de cinco metros de distancia. Ellos definen el concepto de “autodiseminación” como “que los insectos pueden ser atraídos por semioquímicos de un hospedero específico dentro de un aparato de inoculación, o trampa donde son contaminados por conidios del hongo. Los conidios pueden ser dispersos por estos insectos una vez que ellos salen de la trampa y antes que se infecten, el objetivo es establecer epizootias tempranas que podrían suceder naturalmente por inoculación regular del ambiente por palomillas contaminadas”.

Un intento reciente de formulación por emulsión inversa (suspensión de conidios de agua en aceite) de *Z. radicans* lo realizaron los autores Batta *et al.* (2011). Estos autores utilizaron un aislamiento nativo (ZRYAC) de Australia, el cual causó una mortalidad en *P. xylostella* de 57.5% cuando no estaba formulado, y ya formulado (emulsión inversa) la mortalidad fue de 85%, en ambos casos, utilizando la misma concentración de 10^7 conidios/ml. La concentración letal media (CL_{50}) que se necesitó en la formulación fue 100 veces menor que la que se ocupó cuando el aislamiento no fue formulado (3.5×10^4 vs 4.78×10^6 conidios/ml, respectivamente).

Este experimento demostró que el uso comercial de *Z. radicans* tiene potencial porque el procedimiento fue económico y fácil de realizar.

3.5. Definición de PCR convencional

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica desarrollada por Mullis (1990) y usada para amplificar un fragmento de DNA que se encuentra entre dos regiones de secuencia conocida. Dos oligonucleótidos se utilizan como primers para realizar una serie de reacciones de síntesis que son catalizadas por una DNA polimerasa. Estos oligonucleótidos tienen secuencias diferentes y son complementarios a las secuencias que se encuentran en las hebras opuestas del DNA y flanquean el segmento de DNA que va a ser amplificado (Sambrook *et al.*, 1989).

Se parte de tres segmentos de ácidos nucleicos: el segmento de DNA de doble cadena que se va amplificar, dos primers oligonucleótidos de cadena simple que flanquean a este segmento y además, la DNA polimerasa, dNTP's, buffer y sales. Los primers hibridan a las hebras opuestas del DNA y son orientados con su extremo 3' a 5', actúa la DNA polimerasa sintetizando la nueva cadena de DNA en dirección 5' a 3' (Ausubel *et al.*, 1992).

El PCR se basa en el uso de diferentes temperaturas para los tres pasos de la reacción, desnaturalización (94-95°C), alineación (55°C) y elongación o extensión de la cadena (72°C) (McPherson y Molli, 2006).

3.5.1. PCR como herramienta en la investigación ecológica

Con los avances en el uso de las técnicas moleculares se han podido estudiar las relaciones ecológicas que se dan entre los microorganismos en una comunidad (Peay *et al.*, 2008), y esto ha derivado en varios campos de investigación como son genética evolutiva y genética de poblaciones, biodiversidad, biología de la conservación, ecología conductual, e interacciones especies-hábitat (Beebe y Rowe 2008). Asimismo estas herramientas moleculares permiten métodos para analizar la dinámica de interacción patógeno-hospedero en ambientes complejos de los microorganismos (Enkerli y Widmer, 2010).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) puede utilizarse para identificar los microorganismos al menos de dos formas. El primer método depende de un conocimiento de secuencia única de ADN, para el organismo en estudio y proporciona un significado específico en la identificación de dicho organismo y se puede utilizar para identificar un organismo objetivo incluso en pequeñas cantidades en cultivos mixtos. El segundo método tiene como requisito indispensable: un cultivo puro del organismo destino, pero no requiere ningún conocimiento de la secuencia de ADN de ese organismo. Este método depende de un iniciador aleatorio de la PCR usando un iniciador oligonucleótido (o un par de iniciadores) de secuencia arbitraria (Mileham, 1995).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Cría de *Plutella xylostella*

El pie de cría de la palomilla dorso de diamante, *P. xylostella* se obtuvo del INIFAP, Celaya, Guanajuato (Bujano, 1993). En el COLPOS, campus Montecillo se acondicionó el insectario y el invernadero para su cría en condiciones en constantes condiciones asépticas; se desarrolló sobre hojas de brócoli variedad Waltham, a 22°C y un fotoperiodo 16:8 luz-obscuridad. Los insectos se mantuvieron en jaulas de poliacrílico o de madera (50 x 35 x 60 cm). En cada jaula de poliacrílico se colocó un ventilador eléctrico de 12 voltios modelo ADO812MB-A70 (ADDA CORPORATION®) para hacer circular el aire y extraer el exceso de humedad. Las jaulas de madera tenían malla en uno de sus lados por lo que no necesitaron ventiladores para controlar la humedad relativa (Fig. 4).



Figura 4. Infraestructura en el insectario para criar *Plutella xylostella*. A, insectario. B, jaulas. C, plantas en jaulas. D, clima para mantener temperatura a 22°C.

Para el mantenimiento de la cría se sembraban 8 camas con plantas de un híbrido de brócoli variedad Waltham, las camas estaban a un metro sobre nivel del suelo, dentro de un invernadero rústico. La siembra se realizó de manera escalonada (80 macetas cada 15 días) para asegurar comida suficiente para las larvas (Fig. 5).



Figura 5. A, Invernadero con plantas de brócoli. B, C, Camas con macetas con plantas de brócoli.

En el insectario se colocaban de dos a tres plantas de brócoli por cada jaula, en tres de estas jaulas se colocaban de 100 a 200 palomillas dorso de diamante para que ovipositarán sobre las plantas durante 24 h. Las plantas con huevos se colocaban en otras jaulas para que ahí emergieran las larvas de primer ínstar. Conforme se desarrollaban los insectos se les administraba plantas nuevas. Cada jaula con insectos necesitaba alrededor de cuatro plantas cada tercer día. Cuando las larvas alcanzaban el 3er ínstar se tomaban para los bioensayos y las que sobraban servían para pie de cría. Cuando llegaban a pupa se recolectaban y se ponían en las tres jaulas donde sólo había palomillas para repetir el proceso.

4.2. Manejo de los aislamientos de *Zoophthora radicans*

Se utilizaron seis aislamientos de *Z. radicans*. Los aislamientos NW379, NW386, NW353, se obtuvieron de la colección Rothamsted Research collection, UK., pero originalmente se aislaron de larvas de *P. xylostella* en brócoli en el estado de Guanajuato, México (Guzmán-Franco *et al.*, 2009) el aislamiento NW250 se aisló de larvas de *P. xylostella* en brassicaceae en Malasia (Pell *et al.*, 1993a; Furlong *et al.*, 1995); los aislamientos ARSEF1699 y ARSEF6003 se obtuvieron de la colección ARSEF (USDA-ARS, USA), pero el aislamiento ARSEF6003 se aisló de larvas de *Trichoplusia ni* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) en México y el aislamiento ARSEF1699 se aisló de larvas de *Cnaphalocrocis medinalis* Guenée (Lepidoptera: Crambidae) en Filipinas.

Algunos de estos aislamientos se secuenciaron por Guzman-Franco *et al.*, 2008a: para el aislamiento ARSEF1699 (DQ864987 y DQ864988); para NW250 (EF137937 y EF137938); para NW386 (EF151411 y EF151412); para ARSEF6003 (EF137933 y EF137934) y para NW353 (EF151415 y EF151416). El aislamiento NW379 no fue secuenciado.

Todos los aislamientos crecieron en cajas Petri de ventilación triple de 90 mm de diámetro, conteniendo 24 mL de medio SEMA (Agar Dextrosa Sabouraud complementada con yema de huevo y leche) (Wilding y Brobyn, 1980). Los cultivos se incubaron a 22°C en oscuridad por 15 días antes de su uso. Todos los

aislamientos fueron re-cultivados no más de tres veces después de la recuperación de nitrógeno líquido.

4.2.1. Propagación en medio SEMA

Los hongos se propagaron en Agar Dextrosa Sabouraud BDBioXon® enriquecido con leche y yema de huevo, Sabouraud Eggs Milk Agar, SEMA, por sus siglas en inglés (Cuadro 1) (Wilding y Brobyn, 1980). Se utilizaron 24 mL para cada caja Petri. Una vez solidificado el medio en la caja Petri se almacenó a 22°C en incubadora (Thermo Scientific, Inc.) hasta su utilización que fue al día siguiente y máximo se utilizó en 15 días (Fig. 6). Los aislamientos se inocularon en este medio colocando un círculo de 1 cm de diámetro de una colonia del hongo con 15 días de edad, e incubados a 22 °C en oscuridad total durante 15 días.

El procedimiento para preparar el medio SEMA fue el siguiente:

1.- Los huevos se colocaron en un frasco que tenía acetona al 1% y 99 mL de alcohol etílico de 96° durante dos horas. .

2.- También y de forma paralela se esterilizaron un frasco Durán vacío de 1 L en autoclave (modelo 1925X ALL AMERICAN®) a 115°C, durante 20 min, la leche en otro frasco Durán de 250 mL, y el agar con agua suficiente para preparar medio para 40 cajas. También se esterilizó un recipiente de vidrio de boca ancha de 20 cm de diámetro tapado con papel aluminio.

Cuadro 2. Cantidades que se utilizaron de ingredientes para preparar medio SEMA, para crecer los aislamientos de *Zoophthora radicans* que se emplearon en los bioensayos de virulencia.

Ingredientes	10 cajas	20 cajas	40 cajas
Huevos	1	2	4
Leche semidescremada	17 mL	34 mL	68 mL
SDA (Agar Dextrosa Sabouraud)	10.4 g	20.8 g	41.6 g
Agua destilada	160 mL	320 mL	640 mL

3.- Una vez que se esterilizaron los materiales, estos se transportaron a una campana de flujo laminar, lugar donde se destaparon los frascos y se le quitó el aluminio al recipiente de vidrio. Los huevos se sacaron del frasco de acetona al 1% y se flamearon, una vez secos se tomó uno a uno con los dedos, por los polos, y se rompió usando el borde del recipiente de vidrio. Se desechó la clara de los huevos y las yemas se colocaron en un frasco Durán de 1 L.

4.- Al frasco Durán con las yemas de huevo se le adicionó la leche, y se mezcló perfectamente.

5.- La mezcla de las yemas de huevo con leche se adicionó al frasco Durán que contenía el agar estéril, cuando este tenía una temperatura que se podía soportar con el dorso de la mano, y se mezcló fuertemente.



Figura 6. A, incubadora. B, medio SEMA almacenado en incubadora a 22°C. C, aislamientos de *Zoophthora radicans* creciendo a 22°C. D, aislamiento ARSEF6003 creciendo en medio SEMA.

4.2.2. Conservación en nitrógeno líquido

Los aislamientos de *Z. radicans* se almacenaron en nitrógeno líquido (NL) mediante el siguiente procedimiento (Fig. 7):

- 1.- En una campana de flujo laminar se etiquetaron tubos criogénicos de 1.8 mL de volumen, y se colocaron en un recipiente para tubos Eppendorf.
- 2.- A cada criovial se le adicionó 1 mL de glicerina estéril al 10% (con un dispensador y una pipeta estéril).
- 3.- Se cortaron 30 trozos pequeños de los aislamientos del hongo a criopreservar, dentro de la caja Petri, por la zona de crecimiento más joven (periferia) incluyendo el medio SEMA.

4.- Se colocaron tres pedazos de la colonia por cada tubo, y se aforaron todos los crioviales a 1.8 mL con glicerina al 10% y se taparon.

5.- Se realizó un preenfriamiento de los aislamientos en un contenedor para congelar muestras a -80°C (Heathrow Scientific® LLC), este recipiente se llenó con alcohol isopropílico hasta la marca superior, se colocaron las muestras de los aislamientos de hongos, este contenedor para congelar tiene capacidad para ocho crioviales, se taparon y se congelaron a -80°C en ultracongelador durante cuatro horas.

6.- Posteriormente, todos los crioviales se colocaron en portatubos de aluminio e inmediatamente se depositaron en contenedores de NL para su preservación.

Con esta técnica hay que asegurar que los aislamientos de los hongos siguen vivos, por esta razón se realizó una prueba de recuperación de los mismos al día siguiente de haber realizado el procedimiento.

4.2.3. Recuperación de nitrógeno líquido

1. Se preparó Baño María a una temperatura de 37°C a 40°C y se llenó un termo pequeño a un cuarto de su capacidad con NL.

2. Del tanque con NL se sacaron las muestras de los aislamientos de interés para ser recuperadas, se identificaron de acuerdo a la etiqueta que se les colocó en la

tapa a cada contenedor, se transfirieron al termo pequeño con NL mediante unas pinzas o con las manos utilizando guantes de látex.

3. Con unas pinzas largas se sacaron los tubos del termo con NL y se sumergieron durante cinco minutos en baño maría a 37⁰C.

4. Después de transcurridos los cinco minutos, se colocaron los crioviales en toallas de papel esterilizadas para secar el exceso de humedad, se transportaron a campana de flujo laminar dentro de un matraz para evitar contaminación, la muestra individual (criovial) se sumergió en etanol al 95% durante dos minutos. Se dejó secar a temperatura ambiente durante 10 minutos, una vez evaporado el alcohol se destapó el criovial y con la ayuda de un asa bacteriológica se pasaron los trozos del hongo a una caja Petri con el medio de cultivo SEMA, las cajas de SEMA con el aislamiento se incubaron a 22⁰C durante 15 días, ventilando las cajas Petri cada 5 días durante 30 segundos, para lo cual se abrían en la campana de flujo laminar para evitar contaminación.

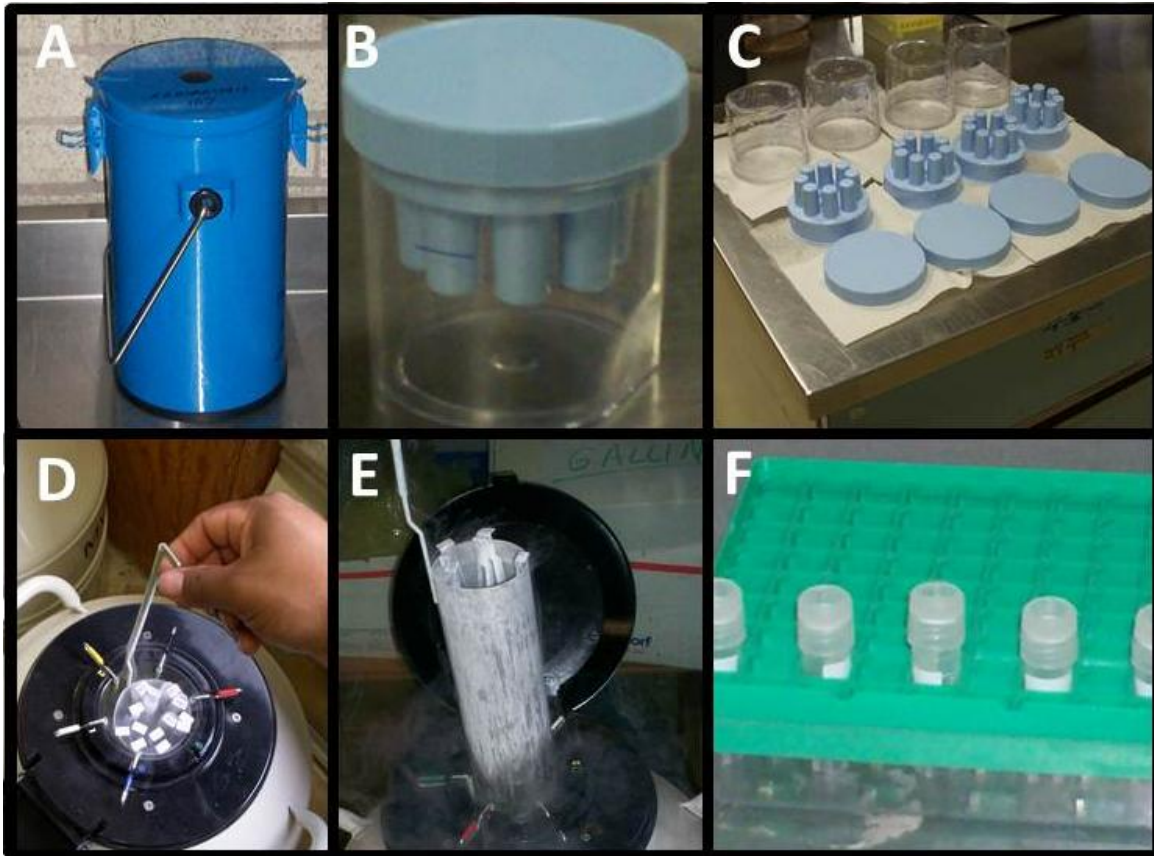


Figura 7. Materiales para criopreservar aislamientos. A, termo beacons para NL. B, C, chiling jar; D, tanque de NL y contenedores, E, contenedor grande y F, tubos crioviales.

4.3. Estimación de la virulencia relativa de aislamientos de *Zoophthora radicans* hacia larvas de *Plutella xylostella*

4.3.1. Procedimiento

Este bioensayo de virulencia con temperatura constante (a 22 °C) se realizó con los aislamientos NW379, NW386, NW250, NW353, ARSEF1699 y ARSEF6003 bajo el siguiente procedimiento: diferentes grupos de 15 larvas se expusieron a

círculos de cada aislamiento en esporulación durante diferentes tiempos (5, 10, 25, 35, 45, 60 min y 60 min sin inóculo para el control) para lograr diferentes concentraciones (Pell *et al.*, 1993b; Guzmán-Franco *et al.*, 2009). Para la obtención de círculos con esporulación activa se tomaron 5 círculos, de 9 mm de diámetro, de los aislamientos del hongo con 15 días de crecimiento. Estos fueron colocados en la tapa de una caja Petri de 50 mm de diámetro conteniendo papel filtro humedecido. Las cajas Petri, conteniendo los círculos de hongos, fueron mantenidas en una humedad relativa alta (superior a 95%) e incubadas a 22 °C en total oscuridad por 18 h antes de los bioensayos. Grupos de 15 larvas del tercer ínstar temprano sin esterilizar se depositaron en un círculo de hoja de brócoli desinfectada con alcohol al 96% de aproximadamente 40 mm de diámetro, cada disco se colocó en la base de una caja Petri de 50 mm de diámetro, que contenía 5 mL de agar-agua al 2% para mantener la turgencia del disco de brócoli. Para la inoculación, las tapas conteniendo los círculos de hongo se colocaron sobre las bases que contenían las hojas de brócoli y las larvas de *P. xylostella*. Para obtener una serie de concentraciones, diferentes grupos de larvas se expusieron por diferentes tiempos a los círculos de hongos en esporulación activa, desde 5 hasta 60 min. Las larvas testigo se mantuvieron por 60 min bajo las mismas condiciones pero sin ningún inóculo, estas permitían conocer la mortalidad por causas naturales. Para estimar la concentración de conidios lograda en cada tiempo de exposición, se colocó un cubreobjetos de 10 mm de diámetro en el centro de la hoja de brócoli, el cual también se expuso a la lluvia de conidios, y mediante un microscopio y una reglilla de 10 x10 mm colocada en uno de los oculares, se estimó el número de conidios/mm². Después de la inoculación, cada grupo de

larvas se transfirió a cajas ventiladas de poliestireno conteniendo pedazos de hoja de brócoli limpias (Fig. 8). La mortalidad de cada aislamiento se corroboró mediante microscopio óptico, con aumento de 40X en montajes temporales observando los conidios o esporas de reposo (algunas veces en el aislamiento NW386) del hongo sobre larvas muertas, descartando las muertes debidas a otras causas al comparar mortalidad de los tratamientos testigos (control) donde no se registró mortalidad (Guzmán-Franco *et al.*, 2009). Todo el experimento se incubó a 22 °C en total oscuridad. La infección se registró diariamente por cinco días.

En todos los experimentos no se realizaron los postulados de Koch porque estos ya habían sido corroborados por Guzman-Franco (2005) y los responsables de las colecciones de donde provenían los seis aislamientos. Además este hongo es parásito obligado, no crece en materia orgánica en descomposición como saprofítico, aunque se ha logrado cultivar en el medio SEMA.

4.3.2. Diseño experimental

El diseño experimental fue con unidades experimentales distribuidas completamente al azar, a una sola temperatura (22°C). Todos los tratamientos se realizaron el mismo día con sus tres repeticiones y el experimento completo se repitió en tres diferentes ocasiones.

4.3.3. Análisis estadístico

Para el procesamiento de datos se utilizó el modelo lineal generalizado (GLM) con error binomial y “Análisis Probit de Modelos Paralelos” con el paquete estadístico GenStat versión 8 (Payne *et al.*, 2005). Esto es, se asumió que el número de larvas infectadas siguieron una distribución binomial con tamaños de muestras iguales al número de larvas examinadas. Antes de la comparación entre aislamientos, se hizo un análisis de modelos paralelos para cada aislamiento individual para determinar si los datos de todas las repeticiones podrían ser combinadas en cada caso. Primero, los datos de la concentración letal 50 (CL_{50}) se ajustaron a una regresión lineal simple en todas las repeticiones, segundo, se permitió la variación de los interceptos y tercero se permitió la variación de las pendientes. Si la regresión lineal simple resultaba la mejor para cada aislamiento, entonces los datos de las diferentes repeticiones para cada aislamiento podrían ser combinados y la misma forma de análisis se realizaría para comparar entre los seis aislamientos. La concentración causando el 50% de infección de larvas (CL_{50}) se estimó de los mejores modelos compuestos con intervalo de confianza (IC) para cada CL_{50} calculada, de acuerdo al teorema de Fieller (Fieller, 1944). Este modelo permite analizar los datos que tienen una distribución normal y que generan pendientes paralelas o diferentes, indicando un comportamiento diferente o similar en la mortalidad de la población, de ahí su nombre, también generan ordenadas a los orígenes iguales o diferentes, indicando diferencias en la virulencia o lo contrario. El análisis de los tratamientos de los diferentes aislamientos se realizó en forma conjunta.

4.4. Virulencia de aislamientos seleccionados de *Z. radicans* en larvas de *P. xylostella* y su interacción con temperaturas

4.4.1. Procedimiento

Se utilizaron cuatro aislamientos NW386, NW250, ARSEF1699 y ARSEF6003. En el bioensayo de virulencia con temperatura variable se siguió el mismo procedimiento que se utilizó en el bioensayo con temperatura constante, lo único que cambió de éste fue: se colocaron 30 larvas de tercer ínstar de *P. xylostella* en cajas Petri de 90 mm de diámetro, se inocularon con 10 rodajas de cada aislamiento, de estas se tomaron 10 larvas para colocarlas en incubadoras de acuerdo a la temperatura preestablecida (15, 21 y 27°C), los tiempos de inoculación fueron de 10 a 60 min, el resto del procedimiento fue similar que para el bioensayo anterior (Fig. 8).

4.4.2. Diseño experimental

El diseño experimental fue con unidades experimentales distribuidas completamente al azar, a diferentes temperaturas (15, 21 y 27°C) y con tres repeticiones; para disminuir el efecto del error experimental todo el experimento se repitió en tres ocasiones diferentes.

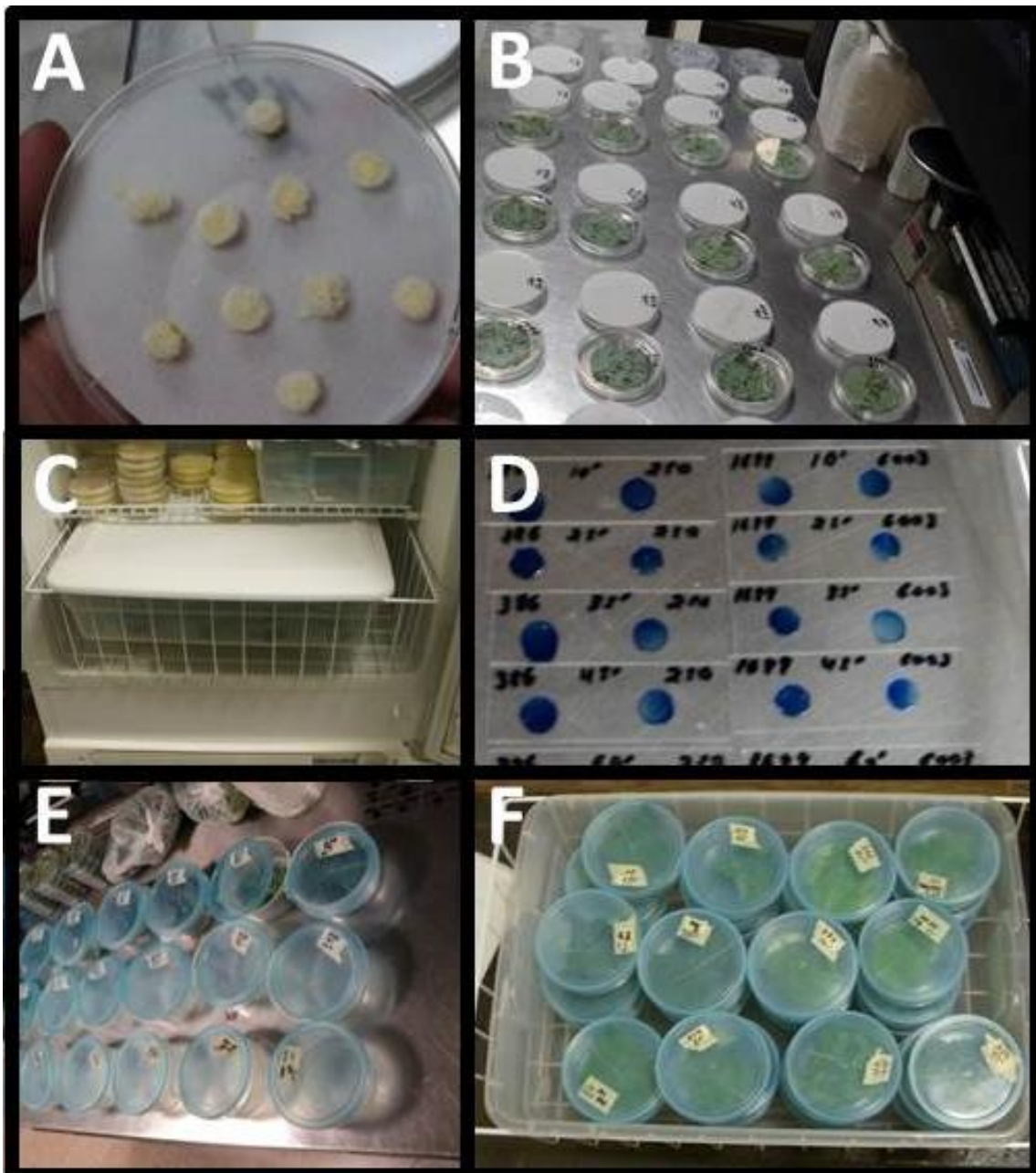


Figura 8. Experimento de virulencias de *Zoophthora radicans*. A, rodajas de medio SEMA con hongos esporulados. B, inoculación de larvas. C, recipiente con cajas que tienen las larvas en incubadora. D, preparaciones para contar conidios. E, F, cajas con hojas para alimentar larvas inoculadas.

4.4.3. Análisis estadístico

El análisis estadístico fue similar al descrito anteriormente, únicamente que se realizó un análisis independiente para los datos en cada temperatura.

4.5. Interacción intra-específica *in vitro* de cuatro aislamientos de *Z radicans*

4.5.1. Procedimiento

El objetivo de este experimento fue medir el crecimiento *in vitro* del micelio de cuatro aislamientos, utilizados en los experimentos previos, aplicados por pares en la misma caja Petri. Consistió en realizar 10 combinaciones (tratamientos) duales de los aislamientos NW386, NW250, ARSEF1699 Y ARSEF6003 (Cuadro 3). Con un sacabocado de 5 mm de diámetro se tomó una rodaja del aislamiento del hongo que tenía 15 días de crecimiento, en medio SEMA, y se colocó a tres centímetros (extremo izquierdo) en una caja Petri de 90 mm de diámetro que tenía medio SEMA, el otro aislamiento se colocó a 2.5 cm de distancia respecto al primero y al extremo derecho (Fig. 9).

Una vez establecidos los aislamientos se incubaron a 22°C en total oscuridad, y cada dos días se registró el crecimiento micelial durante 14 días. Se midió el crecimiento micelial de la colonia en base al área que alcanzó cada aislamiento, con cámara digital marca Sony® 10.1 megapíxeles, se tomaron fotos durante el experimento, y se procesaron mediante el paquete GIMP ver. 2.4. En cada imagen

mediciones anidadas sobre el tiempo tomado de una caja de Petri, la cual representó ya sea la colonia bajo estudio en presencia de otro aislamiento (tratamiento denominado “inoculación dual”), o cuando el aislamiento bajo estudio fue incubado en presencia de si mismo, es decir, se colocaron dos rodajas del mismo aislamiento en la caja Petri (tratamiento control). La variación total de la respuesta fue particionada de acuerdo a una estructura factorial con tiempo y tratamiento como factores principales. Adicionalmente, la variación total debido al efecto de los tratamientos fue particionado de acuerdo a dos contrastes jerárquicos ortogonales; primero, se realizó una comparación entre el tamaño promedio de la colonia (tratamiento) control y el promedio combinado de los tratamiento duales; segundo, se realizaron comparaciones entre tratamientos con inoculación dual. Se describen únicamente los resultados del segundo contraste por ser biológicamente más relevante para la interpretación de las interacciones.

Cuadro 3. Combinaciones duales de los aislamientos de *Z. radicans* NW386, NW250, ARSEF1699 y ARSEF6003.

Tratamiento	Combinación	
1	NW386	NW386
2	NW386	NW250
3	NW386	ARSEF1699
4	NW386	ARSEF6003
5	NW250	NW250
6	NW250	ARSEF1699
7	NW250	ARSEF6003
8	ARSEF1699	ARSEF1699
9	ARSEF1699	ARSEF6003
10	ARSEF6003	ARSEF6003

4.6 Interacción intra-específica *in vivo* de dos aislamientos seleccionados de *Z. radicans*

4.6.1. Procedimiento

Para realizar este bioensayo se utilizaron los aislamientos NW386 y NW250, basados en sus características que con anterioridad se habían determinado. No se incluyó un aislamiento ARSEF debido a su baja virulencia y falta de larvas para

completar otro estudio con estos aislamientos avirulentos. Debido a la dificultad para inocular una concentración predeterminada de conidios de cada aislamiento, se utilizaron diferentes tiempos de exposición para obtener diferentes concentraciones de cada aislamiento en los nueve tratamientos (Cuadro 4). Con estos se formaron nueve combinaciones (tratamientos), para estudiar las interacciones intra-específicas, en la repetición uno y dos se inocularon 9 grupos de 72 larvas cada uno que correspondían a las combinaciones, en la repetición tres por falta de larvas sólo se utilizaron 24 larvas por cada combinación. Se utilizaron dos temperaturas diferentes 22 y 27°C.

Se tomaron diez rodajas con el hongo esporulando y se colocaron en papel filtro húmedo en la tapa de cajas petri de 90 mm de diámetro y se incubaron en alta humedad, a 22°C y en total oscuridad, durante 18 horas antes del experimento, tiempo suficiente para que cada aislamiento esporulara.

Grupos de 72 larvas de tercer instar temprano de *P. xylostella* se inocularon con los nueve diferentes tratamientos (un grupo por tratamiento) (Cuadro 4). Para realizar esto, las larvas se colocaron en la base de cajas Petri conteniendo discos de hojas de brócoli embebidas en agar-agua al 1.5%, se cubrieron con las tapas de las cajas Petri que contenían la fuente de inóculo (rodajas de hongos) y exponiéndolas a la lluvia de conidios para ser inoculadas. Las larvas se alimentaron de los discos de hojas, pero no entraron en contacto directo con las rodajas que contenían al hongo. Un cubreobjetos de 10 mm de diámetro se colocó en el centro de cada disco de hoja durante la inoculación para capturar los conidios. Después de la inoculación,

los cubres objetos se removieron y se estimó la concentración de conidios como se describió anteriormente. El tratamiento control (tratamiento 9, Cuadro 4) fue mantenido bajo las mismas condiciones que los otros tratamientos por 50 minutos pero sin inóculo. Después de la inoculación, cada grupo de larvas se separó en seis grupos de 12 larvas, tres grupos fueron incubados a 22°C y tres a 27°C.

La mortalidad se registró diario durante 6 días. El éxito de la infección se corroboró favoreciendo la esporulación de los conidios a partir de las larvas muertas, exponiéndolas a ambientes con humedad relativa alta. En este caso, como se inocularon dos aislamientos de la misma especie, la diferenciación entre aislamientos basada en la morfología de conidios no fue posible. Por esta razón, la diferenciación de ambos aislamientos se realizó mediante PCR convencional de la siguiente manera. Los cadáveres resultantes en cada tratamiento se depositaron de manera individual en el fondo de un tubo Eppendorf de 0.5 mL. Los tubos se incubaron a la temperatura correspondiente de cada tratamiento (22 °C o 27°C) hasta que esporularon. Una vez que esporularon se almacenaron a -20°C para evitar degradación de los conidios, y de la larva, hasta la extracción del ADN; posteriormente, las larvas muertas se removieron de cada tubo Eppendorf evitando, en lo posible, tocar los conidios producidos por los aislamientos que lograron completar su ciclo y que se encontraban adheridos en las paredes (Fig. 10).

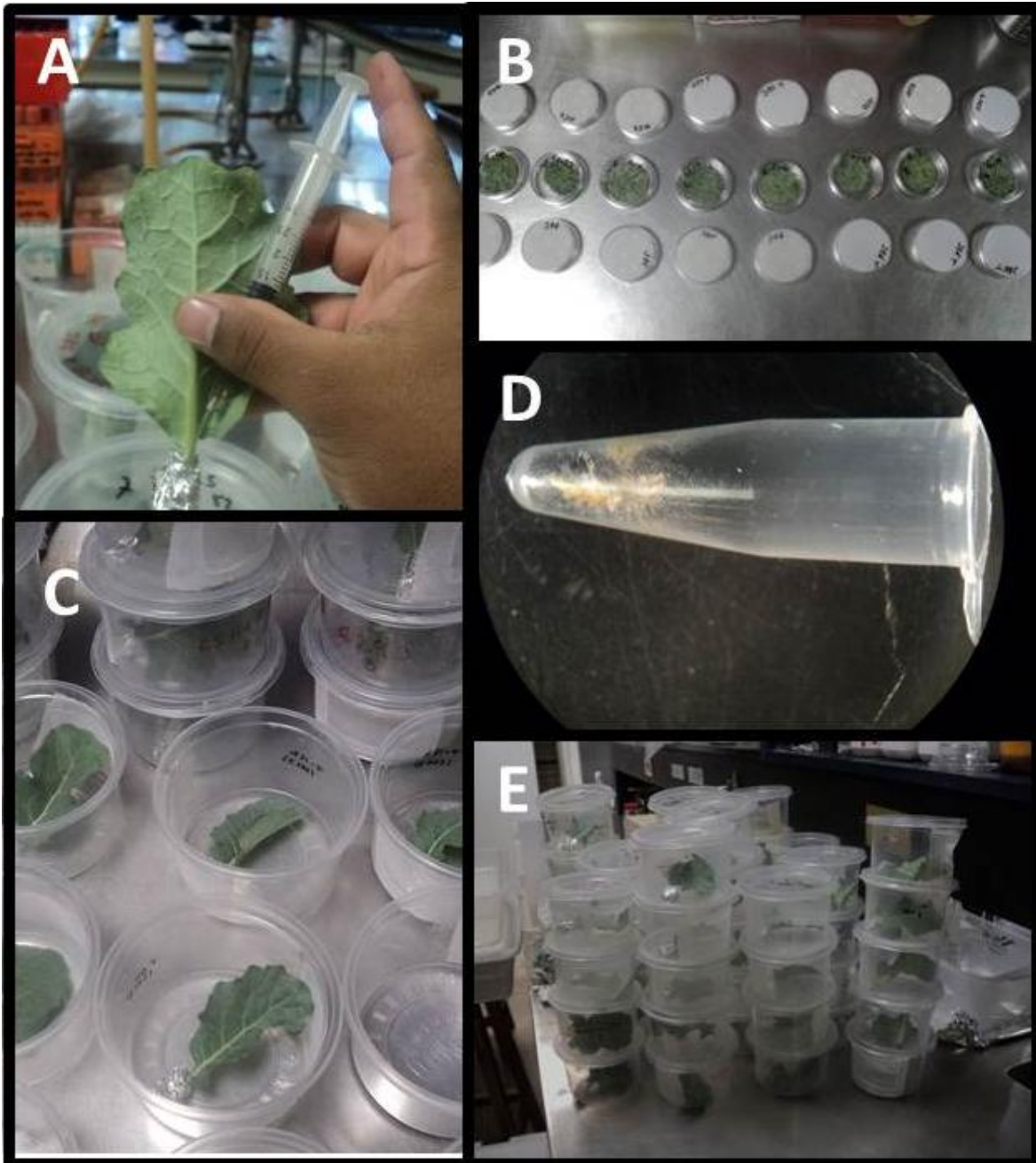


Figura 10. Inoculación en larvas de *P. xylostella* de los aislamientos NW386 y NW250. A, hoja de brócoli adicionándose humus líquido de vermicomposta esterilizado. B, inoculación de larvas. C, hojas en cajas chicas. D, larva que esporuló en tubo Eppendorf. E, cajas con hojas.

4.6.1.1. Extracción de ADN

La extracción del ADN se realizó utilizando los conidios que produjo cada larva infectada por esporulación; en el aislamiento NW386, cuando la larva no presentó evidencia de esporulación, la mitad de la larva se examinó en el microscopio para confirmar la presencia de esporas de reposo, la otra mitad se utilizó para la extracción del ADN. Los cadáveres que no presentaron esporulación o esporas de reposo se descartaron del análisis molecular. Sólo se consideró como infecciones exitosas a los cadáveres en los cuales el hongo completó su ciclo de vida.

La extracción del ADN de los conidios primarios obtenidos en cada tubo se realizó mediante la resina Chelex al 10% (Chelex® 100 BIO-RAD Laboratories, Inc.), el cual degrada cualquier tejido vegetal, excepto el ADN; el procedimiento que se utilizó fue el siguiente:

1. Se utilizaron los conidios de las larvas esporuladas con el hongo en los tubos Eppendorf de 0.5 mL, el cadáver se retiró del tubo.
2. Se adicionaron 30 µL de Buffer Chelex 100 al 10% a cada tubo con los conidios, se agitó ligeramente para suspender los conidios.
3. Los tubos se colocaron en termo block (Digital Dry Bath® marca Labnet®, Labnet International, Inc.) a una temperatura de 95°C durante 10 min para generar lisis de la célula y sus compuestos.

5. Los tubos se centrifugaron a 10000 rpm durante 2 min.
6. El sobrenadante de los tubos, que contenía el ADN, se colocó en un tubo nuevo estéril y etiquetado.
7. La concentración se determinó mediante un equipo Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, USA), para lo cual se tomó 1 μL de cada tubo con ADN.

La calidad del ADN en el sobrenadante se examinó por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% en buffer TBE 1X (0.089 M Tris 0.089 M d ácido bórico, 0.002 M EDTA; pH 8) teñido con bromuro de etidio ($0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$) y fotografiado.

4.6.1.2. Amplificación mediante PCR

El ADN de todas las muestras se homogeneizó a una concentración de 20 ng/ μL (utilizando 1xTE (10mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH 8) y se almacenó a 4°C hasta su utilización. El ADN se amplificó mediante PCR con el uso de un par de iniciadores específicos (Guzmán-Franco *et al.*, 2008a) a *Zoophthora radicans* (ZrF GTATGCTCTCGGG y ZrR TAGACTAATCYAW). Las reacciones de PCR se realizaron de acuerdo a las descritas por Guzmán-Franco *et al.* (2008a) y 40 ng de ADN se utilizaron en todas las reacciones de PCR, con los siguientes tiempos de reacción en el termociclador (MyCycler™, BIO-RAD®): un ciclo a 95°C durante 3 min; 35 ciclos de 95°C durante 30 s, 60°C durante 1 min y 72°C durante 1.30 min,

seguidos por un ciclo a 72°C durante 5 min. La mezcla para una reacción de 20 µL de PCR fue H₂O destilada estéril 14.7 µL, 2 µL de Buffer 10X (QIAGEN®), 0.4 µL de dNTPs (10 mM), 0.4 µL del primer forward (10 µM), 0.4 µL del primer reverse (10 µM), 0.1 µL de Taq Polimerasa (5U/ µL). La existencia de productos de PCR se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % y buffer TAE 1X, teñido con bromuro de etidio y fotografiado.

4.6.1.3. Análisis PCR-RFLP

La mezcla para una reacción de 15 µL fue la siguiente: 8 µL de agua destilada estéril, 1.5 µL de buffer, 0.5 µL enzima DdeI (marca BioLabs, Inc, England) con sitio de reconocimiento 5'...C▼T N A G...3' y 3'...G A N T▲C...5' y 5 µL de producto de PCR. En este caso la visualización se realizó igual que el producto de PCR, excepto que el gel de agarosa se preparó a una concentración de 3%. Todo el análisis de PCR-RFLP se realizó en dos ocasiones separadas para asegurar consistencia. Después de los análisis de restricción, las larvas esporuladas o con esporas de reposo fueron colocadas en las siguientes categorías: muertes debidas al aislamiento NW386, muertes debidas al NW250 y muertes debidas a la combinación de los dos aislamientos (infección dual). En cada corrida de PCR del DNA producido *in vitro* de cada aislamiento fue incluido, agua estéril como control negativo.

4.6.2. Diseño experimental

El diseño fue completamente al azar con 9 tratamientos realizados el mismo día (por pares), y el experimento completo se repitió en tres ocasiones en diferente tiempo.

4.6.3. Análisis estadístico

Todos los datos cuantificables se analizaron mediante el programa estadístico GenStat versión 8 (Payne *et al.*, 2005). La última repetición fue hecha utilizando 24 larvas en lugar de 72. Los datos se analizaron separadamente para cada tratamiento, infectado por NW386, NW250 o ambos aislamientos, utilizando modelos lineales mixtos con efectos de tratamientos (y temperatura) y componentes de varianzas (interacciones) estimadas utilizando el método de máxima verosimilitud restringida (REML, en inglés).

Debido a la dificultad en la separación de conidios pertenecientes a los dos diferentes aislamientos de la misma especie, especialmente en la inoculación dual, los conidios depositados en el tiempo de inoculación larval fueron contados (Cuadro 4), pero no utilizados en el análisis.

En las inoculaciones con los aislamientos NW250 o NW386 solos, se originaron seis comparaciones de tratamientos en el análisis de datos, pero como en la

inoculación dual sólo se tuvo un caso exitoso de las cuatro combinaciones solo se realizó la comparación entre temperaturas (tratamiento 3, Cuadro 4).

Cuadro 4. Tratamientos representando diferentes proporciones relativas de conidios de cada aislamiento de *Z. radicans*. En los tratamientos duales (1-4) sólo se representa la concentración de conidios (promedio de las tres repeticiones), debido a que no fue posible la separación entre aislamientos por la morfología de los conidios. La dosis alta corresponde a una exposición de 25 min (H), y la baja a una exposición de 5 min (L).

Tratamiento	Combinación	NW386 (min)	NW250 (min)	Conidios/mm ²
1	NW386H:NW250L	25	5	313.71
2	NW386L:NW250H	5	25	359.00
3	NW386H:NW250H	25	25	520.71
4	NW386L:NW250L	5	5	197.43
5	NW386H	25	0	243.57
6	NW386L	5	0	144.71
7	NW250H	0	25	296.43
8	NW250L	0	5	155.00
9	Control	0	0	0

5. RESULTADOS

En todos los experimentos las hojas permanecieron verdes y turgentes debido a que en el pedúnculo se agregaba algodón que permanecía humedecido con humus (Fig. 10A, C) que se adicionaba diariamente. En todos los testigos las larvas permanecieron sanas y continuando su ciclo biológico.

5.1. Virulencia relativa de aislamientos de *Zoophthora radicans* en larvas de *Plutella xylostella* con temperatura constante

En el bioensayo de virulencia con temperatura constante (22°C) para todos los aislamientos no hubo diferencias significativas entre las repeticiones en el tiempo ($P > 0.5$), esto justificó la agrupación de datos para su análisis posterior. Al comparar entre aislamientos, se observaron diferencias significativas entre los valores para los interceptos (representan virulencia) ($\chi^2_5 = 25.46$, $P < 0.001$), pero no entre las pendientes estimadas (representa que los datos si se ajustaron a este análisis) ($\chi^2_5 = 8.92$, $P = 0.112$), sugiriendo diferencias en los valores de CL_{50} . El valor de la CL_{50} más bajo se obtuvo para el aislamiento NW379, seguido por el aislamiento NW386; el valor de la CL_{50} más alta fue obtenido para el aislamiento ARSEF1699 (Cuadro 5). Los tres aislamientos que resultaron más virulentos fueron aislados de larvas infectadas de *Plutella xylostella*, dos de estos aislamientos se recolectaron en la región productora de brócoli en el estado de Guanajuato (NW379 Y NW386), el aislamiento NW250 también se aisló en *P. xylostella*, pero este procede de

Malasia; por otro lado, los aislamientos menos virulentos se obtuvieron de otras especies de insectos infectados, por ejemplo, el aislamiento ARSEF6003 se aisló de *Trichoplusia ni* y es de origen mexicano, y el aislamiento ARSEF1699 se aisló de *Cnaphalocrocis medinalis* y procede de Filipinas (Lepidoptera: Pyralidae).

Cuadro 5. Virulencia (CL₅₀s en escala log con intervalos de confianza de 95%) de seis aislamientos de *Zoophthora radicans* contra *Plutella xylostella* a 22°C. CR=coeficiente de regresión (pendiente). Error estándar (ES). Intervalo de confianza (IC).

Aislamientos	CL ₅₀ (IC=95%)	Intercepto (ES)	CR (ES)
NW379	2.76 (2.583-3.012)	-3.00 (0.297)	1.09 (0.131)
NW386	2.92 (2.688-3.264)	-3.18 (0.285)	1.09 (0.131)
NW250	3.03 (2.787-3.376)	-3.29 (0.292)	1.09 (0.131)
NW353	3.09 (2.792-3.549)	-3.36 (0.268)	1.09 (0.131)
ARSEF6003	3.27 (2.938-3.749)	-3.55 (0.287)	1.09 (0.131)
ARSEF1699	3.28 (3.046-3.612)	-3.56 (0.327)	1.09 (0.131)

5.2. Virulencia con aislamientos seleccionados de *Zoophthora radicans* en larvas de *P. xylostella* y su interacción con temperatura

En el experimento de estimación de la virulencia a diferentes temperaturas, para cada temperatura y combinación de aislamientos, no hubo ninguna evidencia de diferencia significativa en los interceptos entre las repeticiones (todos $p > 0.5$), justificando la agrupación de datos de las repeticiones para cada aislamiento para

su análisis posterior. Para el aislamiento ARSEF1699, no hubo diferencia significativa entre los interceptos ($\chi^2 = 1.14$, $P=0.566$) ni entre las pendientes ($\chi^2 = 0.50$, $P=0.778$); lo mismo ocurrió con el aislamiento ARSEF6003, donde tampoco se encontró diferencias significativas entre los interceptos ($\chi^2 = 0.17$, $P=0.918$) ni entre las pendientes ($\chi^2 = 0.16$, $P=0.923$) (Cuadro 6). Para el aislamiento NW250, sí se encontraron diferencias significativas entre los interceptos ($\chi^2 = 6.53$, $P=0.038$), pero no entre las pendientes ($\chi^2 = 2.21$, $P=0.331$) (Cuadro 6), la mayor virulencia para este aislamiento se encontró a 27 °C (Cuadro 7). En el aislamiento NW386 se encontró diferencias significativas entre los interceptos ($\chi^2 = 13.09$, $P=0.001$), pero no entre las pendientes ($\chi^2 = 1.79$, $P=0.408$) (Cuadro 6). La mayor virulencia se encontró a 22 °C (Cuadro 7).

Cuadro 6. Resultados del análisis probit de modelos paralelos realizado con cuatro aislamientos a 15, 21 y 27°C. Intercepto=a, Pendiente=b, P=Probabilidad del modelo.

Aislamientos de <i>Zoophthora radicans</i>				
Model	NW386	NW250	ARSEF6003	ARSEF1699
Intercepto (a), P	$\chi^2_3=6.54$, $P=0.001$	$\chi^2_3=3.26$, $P=0.038$	$\chi^2_3=0.09$, $P=0.918$	$\chi^2_3=0.57$, $P=0.566$
Pendiente (b), P	$\chi^2_3=0.90$, $P=0.408$	$\chi^2_3=1.10$, $P=0.331$	$\chi^2_3=0.08$, $P=0.923$	$\chi^2_3=0.25$, $P=0.778$

Cuadro 7. Virulencia (CL₅₀s en escala log con intervalos de confianza de 95%) de cuatro aislamientos de *Zoophthora radicans* contra *Plutella xylostella* en tres temperaturas diferentes. CR=coeficiente de regresión (pendiente). Error estándar (ES). Intervalo de confianza (IC). ES= error estándar, Intercepto (a), Pendiente (b)= Coeficiente de Regresión (CR).

Temperatura (°C)	CL ₅₀ (95% IC)	Intercepto (ES)	CR (ES)
NW386			
15	3.08 (2.867-3.415)	-4.40 (0.557)	1.43 (0.220)
22	2.69 (2.527-2.897)	-3.83 (0.541)	1.43 (0.220)
27	2.73 (2.569-2.956)	-3.90 (0.543)	1.43 (0.220)
NW250			
15	3.72 (3.109-5.469)	-3.21 (0.504)	0.86 (0.226)
22	3.22 (2.767-4.468)	-2.77 (0.489)	0.86 (0.226)
27	3.20 (2.756-4.437)	-2.76 (0.488)	0.86 (0.226)
ASREF6003			
15, 22, 27	3.20 (2.830-4.666)	-4.05 (0.881)	1.27 (0.390)
ARSEF1699			
15, 22, 27	3.60 (3.093-5.586)	-3.39 (0.672)	0.94 (0.290)

5.3. Interacción intraespecífica *in vitro* de los aislamientos NW386, NW250, ARSEF1699 y ARSEF6003

5.3.1. Comparación entre los tamaños de un aislamiento específico en presencia de los otros aislamientos

En el tamaño promedio de las colonias de los aislamientos NW250, ARSEF1699 y ARSEF6003 se encontraron diferencias significativas ($F_{2,15}=4.19$, $P=0.036$; $F_{2,15}=4.93$, $P=0.023$; $F_{2,15}=4.77$, $P=0.025$ respectivamente) (Cuadro 8), el tamaño promedio de la colonia varió dependiendo de la presencia de los otros aislamientos. Para el aislamiento NW250, el menor tamaño promedio de colonia alcanzado fue ante la presencia del aislamiento NW386 y el tamaño promedio más grande en presencia del aislamiento ARSEF6003 (Fig. 11). El aislamiento ARSEF1699 alcanzó el tamaño promedio de colonia más grande ante la presencia del aislamiento NW386 y el más pequeño en presencia del aislamiento ARSEF6003 (Fig. 12). El aislamiento ARSEF6003 alcanzó el tamaño de colonia más pequeño en presencia del aislamiento ARSEF1699 y el más grande en presencia del aislamiento NW250 (Fig. 13). En el tamaño promedio de la colonia del aislamiento NW386 no se encontró diferencia significativa ($F_{2,15}=0.17$, $P=0.845$) (Fig. 14), es decir, el tamaño promedio fue similar cuando creció en presencia de los otros aislamientos (Cuadro 8).

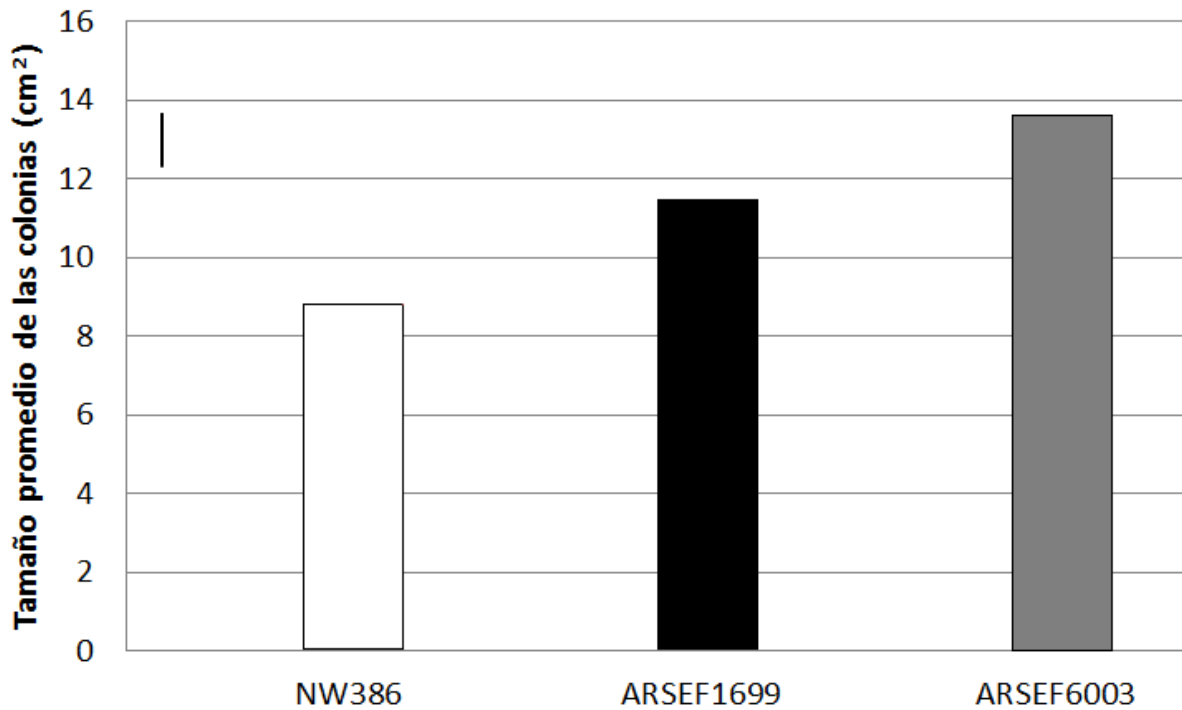


Figura 11. Tamaño promedio de la colonia (cm²) del aislamiento NW250 creciendo en presencia de aislamientos con-específicos (indicados en el eje de las x) (n=6). La línea vertical sólida representa el error estándar (1.663) de las diferencias de las medias entre los tratamientos (15 g.l.).

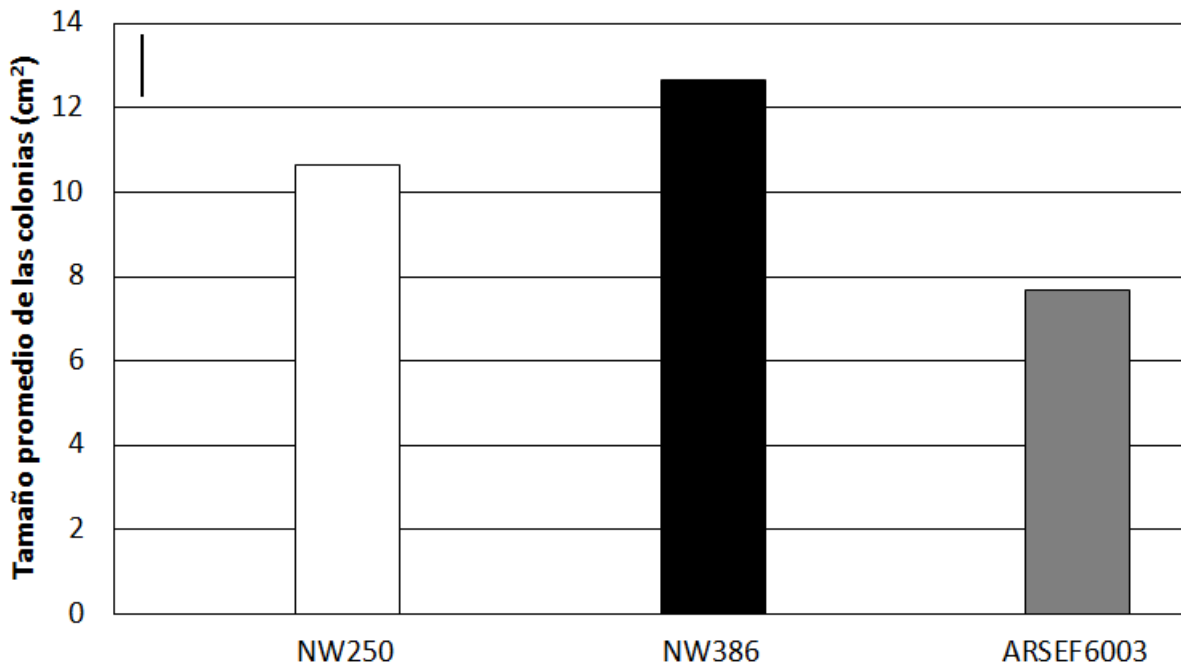


Figura 12. Tamaño promedio de la colonia (cm²) del aislamiento ARSEF1699 creciendo en presencia de aislamientos con-específicos (indicados en el eje de las x) (n=6). La línea vertical sólida representa el error estándar (1.596) de las diferencias de las medias entre los tratamientos (15 g.l.).

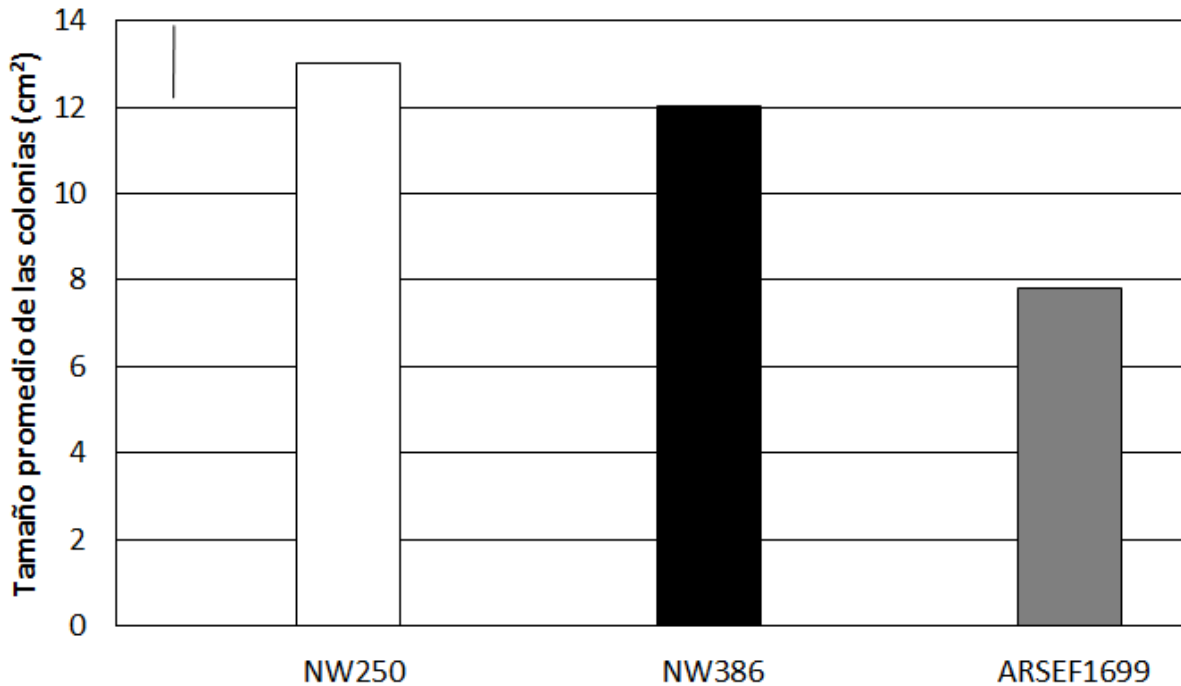


Figura 13. Tamaño promedio de la colonia (cm²) del aislamiento ARSEF6003 creciendo en presencia de aislamientos con-específicos (indicados en el eje de las x) (n=6). La línea vertical sólida representa el error estándar (1.791) de las diferencias de las medias entre los tratamientos (15 g.l.).

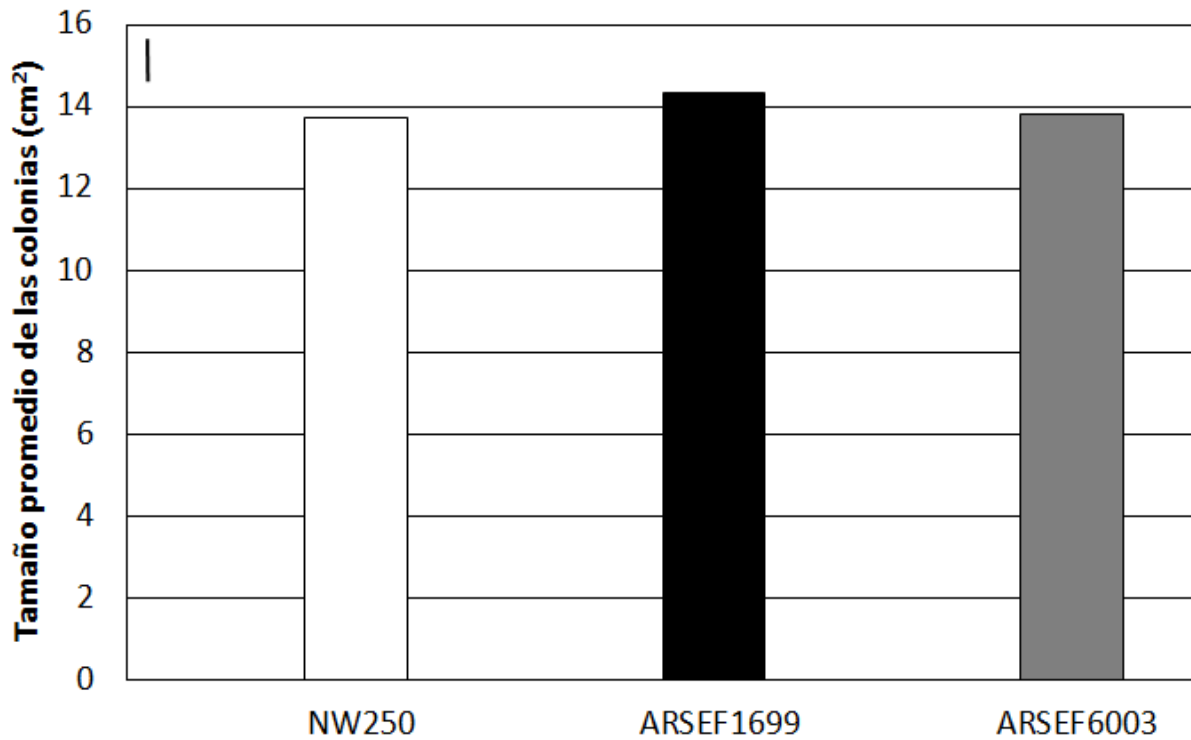


Figura 14. Tamaño promedio de la colonia (cm²) del aislamiento NW386 creciendo en presencia de aislamientos con-específicos (indicados en el eje de las x) (n=6). La línea vertical sólida representa el error estándar (1.177) de las diferencias de las medias entre los tratamientos (15 g.l.).

Cuadro 8. Tamaño promedio de la colonia (cm²) de los aislamientos creciendo en presencia de cada tratamiento, a 22°C. GLT=Grados de libertad de los tratamientos, GLE=Grados de libertad del error, F=radio de la varianza de los tratamientos sobre la varianza residual, P=probabilidad de los valores F tomados de una distribución F con GLT, GLE. EE=error estándar de las diferencias de las medias.

<i>Zoophthora radicans</i>							
Aislamientos	Tratamientos	Medias	EE	GLT	GLE	F	P
NW250	NW386	8.84	1.663	2	15	4.19	0.036
	ARSEF1699	11.5					
	ARSEF6003	13.65					
NW386	NW250	13.72	1.177	2	15	0.17	0.845
	ARSEF1699	14.35					
	ARSEF6003	13.8					
ARSEF1699	NW250	10.63	1.596	2	15	4.93	0.023
	NW386	12.65					
	ARSEF6003	7.67					
ARSEF6003	NW250	13	1.791	2	15	4.77	0.025
	NW386	12.04					
	ARSEF1699	7.8					

5.3.2. Comparación entre los tamaños de un aislamiento determinado obtenidos en presencia de los otros aislamientos a través del tiempo

Se encontraron diferencias significativas en el tamaño obtenido por los aislamientos NW250 ($F_{3,8,38,4}=4.60$, $P=0.004$) (Fig. 15), ARSEF1699 ($F_{3,5,35,3}=2.93$, $P=0.040$) (Fig. 16) y ARSEF6003 ($F_{3,4,34,2}=3.60$, $P=0.019$) (Fig. 17, Cuadro 9) en presencia de los otros aislamientos en su interacción con el tiempo. Gráficamente se aprecia que el aislamiento NW250 fue más afectado cuando estuvo creciendo en presencia del aislamiento NW386, seguido del aislamiento ARSEF1699, fue menos afectado en el tamaño promedio de colonia cuando estuvo creciendo bajo la presencia del

aislamiento ARSEF6003 (Fig. 15), la diferencia significativa del tamaño promedio de colonia de éste aislamiento se dio a partir del tiempo cuatro con respecto a los otros aislamientos. El aislamiento ARSEF1699 fue más afectado cuando estuvo creciendo en presencia del aislamiento ARSEF6003 y fue menos afectado cuando estuvo creciendo en presencia del aislamiento NW386, la diferencia del tamaño promedio de colonia se presentó a partir del tiempo cuatro (Fig. 16). El aislamiento ARSEF6003 fue más afectado cuando estuvo creciendo en presencia del aislamiento ARSEF1699 y fue menos afectado cuando estuvo creciendo en presencia del aislamiento NW250, la diferencia del tamaño de colonia se presentó a partir del tiempo tres (Fig. 17). En el aislamiento NW386 no se encontró diferencia significativa ($F_{5,6,56,2}=1.15$, $P=0.334$) en el tamaño promedio de colonia alcanzado a través del tiempo (Cuadro 9), creciendo en presencia de los otros aislamientos, es decir, fue el único aislamiento que no fue afectado por los otros (Fig. 18).

Las diferencias morfológicas del micelio como son el color ayudaron en la medición del área de crecimiento micelial de los aislamientos de *Z. radicans* (Fig. 19).

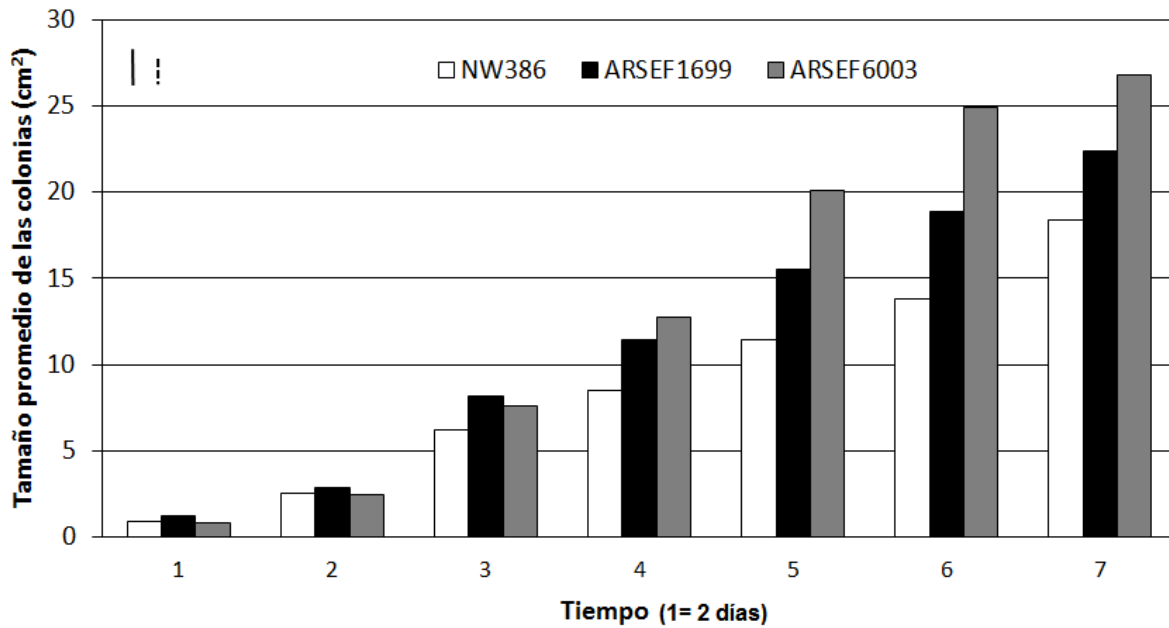


Figura 15. Tamaño promedio de la colonia (cm^2) del aislamiento NW250 creciendo en presencia de aislamientos con-específicos, cada intervalo de tiempo abarcó dos días. La línea vertical punteada representa el error estándar (1.551, 38.4 g.l.) para las comparaciones entre tiempos (cada intervalo=2 días) para cualquier aislamiento con-específico dado; la línea vertical sólida representa el error estándar (2.197, 37.6 g.l.) para todas las comparaciones entre tratamientos.

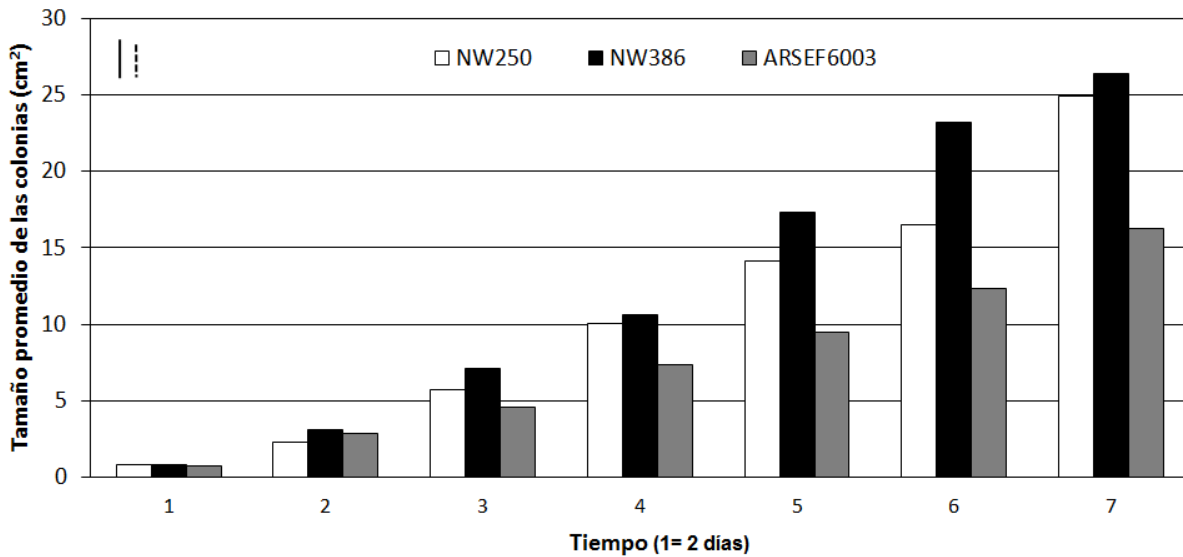


Figura 16. Tamaño promedio de la colonia (cm^2) del aislamiento ARSEF1699 creciendo en presencia de aislamientos con-específicos, cada intervalo de tiempo = 2 días. La línea vertical punteada representa el error estándar (2.029, 35.3 g.l.) para las comparaciones entre tiempos (cada intervalo=2 días) para cualquier aislamiento con-específico dado; la línea vertical sólida representa el error estándar (2.465, 47.0 g.l.) para todas las comparaciones entre tratamientos.

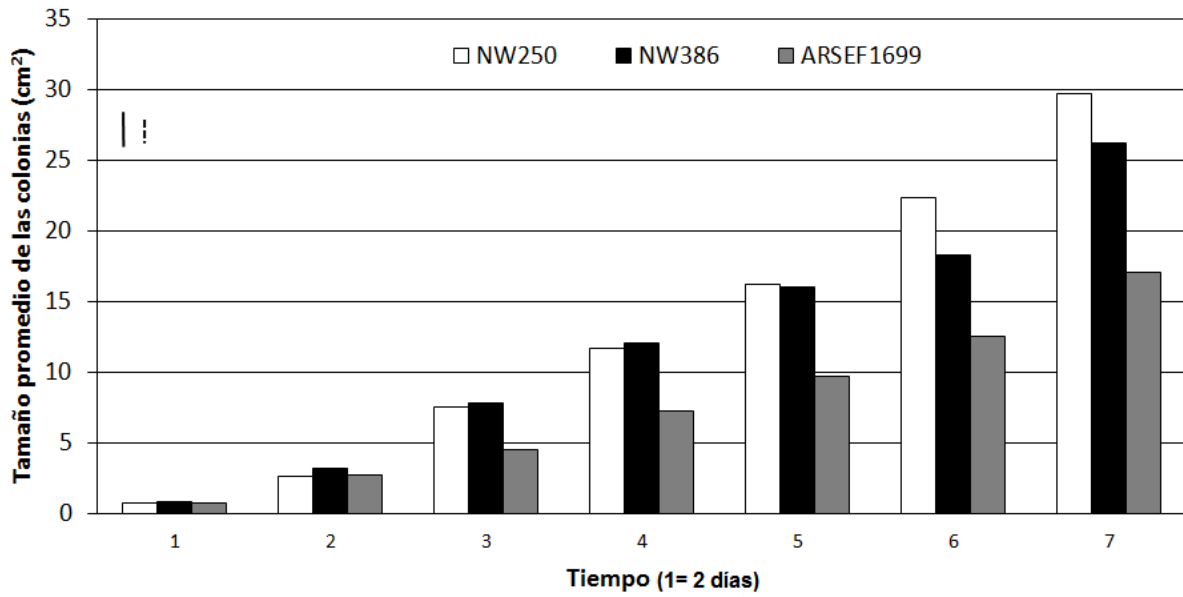


Figura 17. Tamaño promedio de la colonia (cm²) del aislamiento ARSEF6003 creciendo en presencia de aislamientos con-específicos, cada intervalo de tiempo = 2 días. La línea vertical punteada representa el error estándar (1.869, 34.2 g.l.) para las comparaciones entre tiempos (cada intervalo=2 días) para cualquier aislamiento con-específico dado; la línea vertical sólida representa el error estándar (2.491, 40.6 g.l.) para todas las comparaciones entre tratamientos.

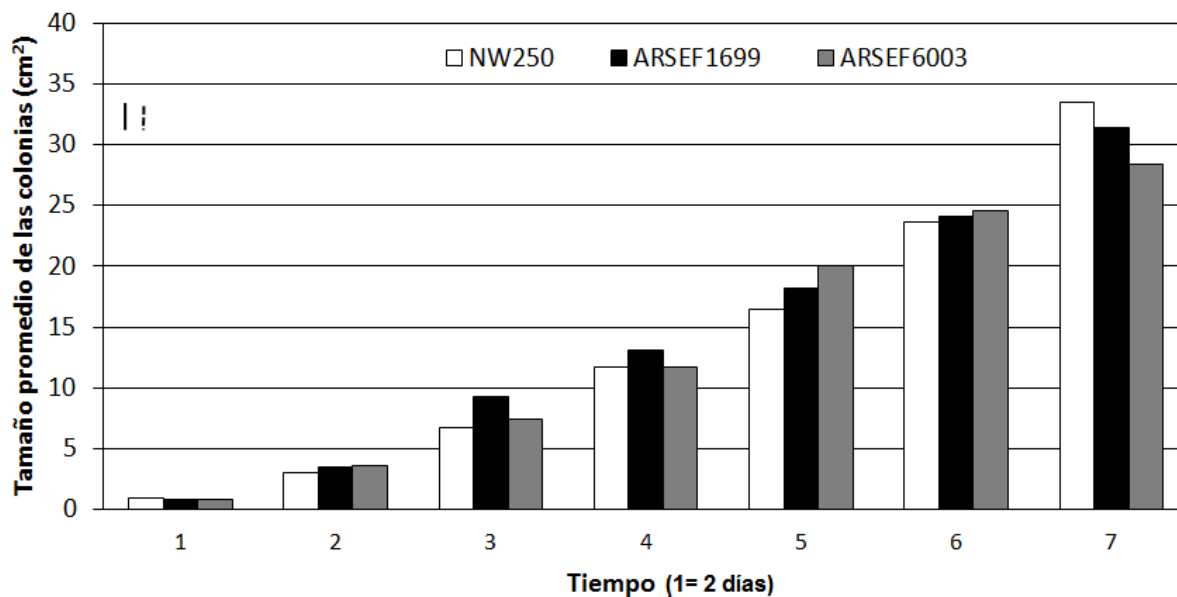


Figura 18. Tamaño promedio de la colonia (cm^2) del aislamiento NW386 creciendo en presencia de aislamientos con-específicos, cada intervalo de tiempo = 2 días. La línea vertical punteada representa el error estándar (1.860, 56.2 g.l.) para las comparaciones entre tiempos (cada intervalo=2 días) para cualquier aislamiento con-específico dado; la línea vertical sólida representa el error estándar (2.086, 66.5 g.l.) para todas las comparaciones entre tratamientos.

Cuadro 9. Tamaño promedio de la colonia (cm²) alcanzado de cada aislamiento creciendo en presencia de otro, en el tiempo. GLT=Grados de libertad de los tratamientos. GLE=Grados de libertad del error. EE₁=error estándar de las diferencias de las medias entre tratamientos. EE₂=error estándar de las diferencias de las medias del mismo tratamiento en el tiempo. P= Probabilidad del modelo.

NW250								
Tiempo	NW386	ARSEF1699	ARSEF6003	EE ₁ EE ₂	GLT	GLE	F	P
1	0.95	1.21	0.84	2.197	3.8	38.4	4.6	0.004
2	2.57	2.87	2.43	1.551				
3	6.25	8.22	7.6					
4	8.52	11.41	12.78					
5	11.41	15.52	20.13					
6	13.78	18.88	24.93					
7	18.41	22.36	26.82					
NW386								
	NW250	ARSEF1699	ARSEF6003					
1	0.95	0.89	0.85	2.086	5.6	56.2	1.15	0.344
2	2.99	3.48	3.61	1.86				
3	6.79	9.23	7.41					
4	11.73	13.16	11.67					
5	16.44	18.24	20.11					
6	23.63	24.09	24.62					
7	33.52	31.38	28.35					
ARSEF1699								
	NW250	NW386	ARSEF6003					
1	0.83	0.81	0.73	2.465	3.5	35.3	2.93	0.04
2	2.33	3.1	2.89	2.029				
3	5.74	7.09	4.6					
4	10.03	10.64	7.34					
5	14.12	17.32	9.51					
6	16.5	23.2	12.38					
7	24.90	26.39	16.23					
ARSEF6003								
	NW250	NW386	ARSEF1699					
1	0.79	0.82	0.78	2.491	3.4	34.2	3.60	0.019
2	2.66	3.19	2.75	1.869				
3	7.57	7.78	4.55					
4	11.7	12.05	7.26					
5	16.21	16	9.69					
6	22.35	18.27	12.51					
7	29.73	26.17	17.06					

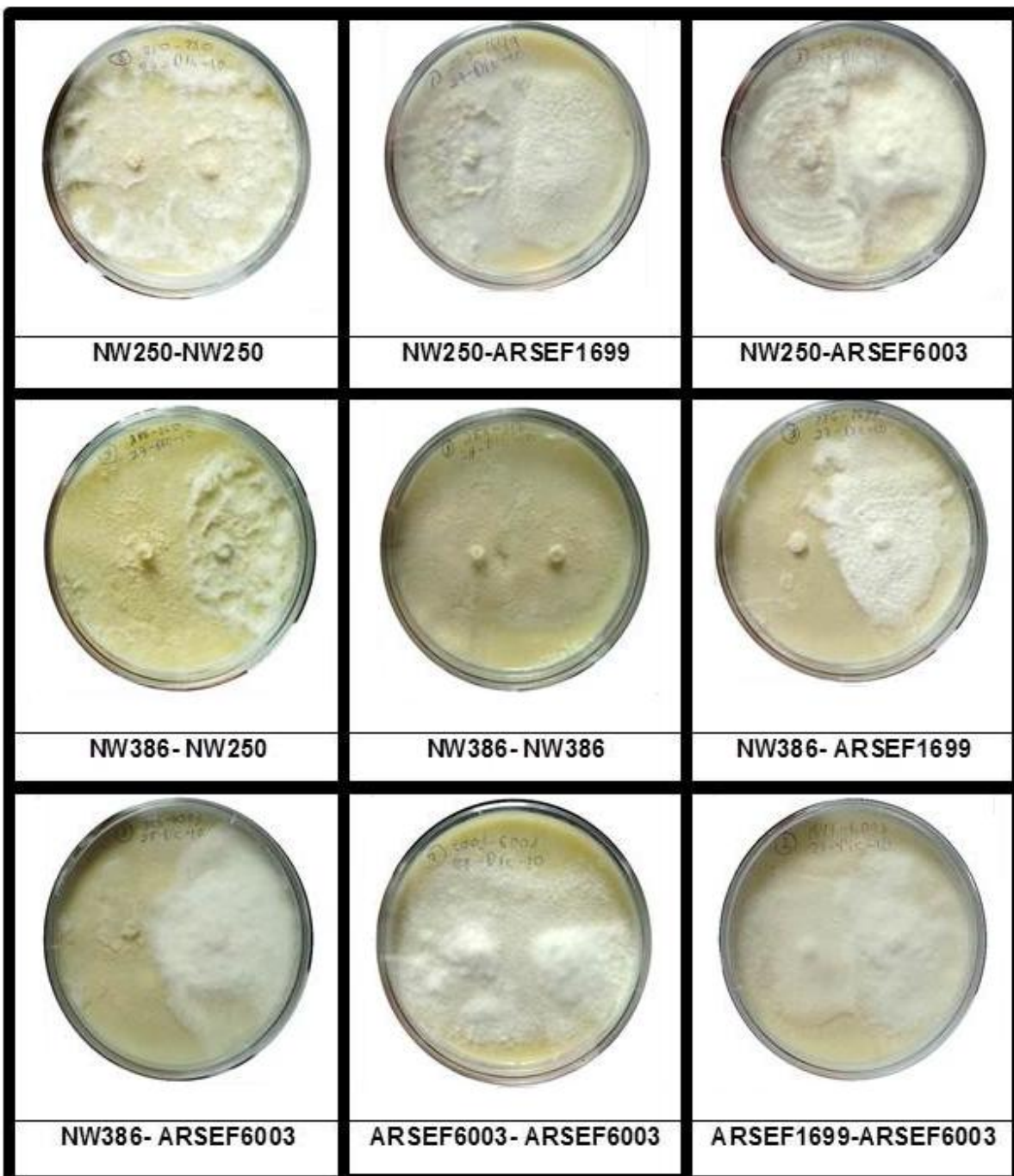


Figura 19. Crecimiento dual del área micelial *in vitro* de algunos aislamientos de *Zoophthora radicans*, a los 14 días después de sembrados en medio SEMA, tiempo en el cual, por lo general, la colonia alcanza la periferia de la caja Petri. Los testigos correspondieron a los platos donde hubo confrontación dual entre el mismo aislamiento.

5.4. Interacción intraespecífica *in vivo* de dos aislamientos de *Z. radicans* a dos temperaturas en una población de larvas de *P. xylostella*

5.4.1. Proporción de larvas de *P. xylostella* infectadas con NW250

La proporción de larvas infectadas con el aislamiento NW250 difirió entre los seis tratamientos determinados estadísticamente donde este aislamiento fue inoculado solo o en combinación con el aislamiento NW386 ($F_{5,69.9}=176.64$, $P<0.001$). No hubo mortalidad en el testigo (no se graficó) y las larvas muertas sin esporular o sin presencia de esporas de reposo dentro del cuerpo se descartaron del análisis, ya que fueron muy pocas. La proporción más grande de larvas infectadas con el aislamiento NW250 se obtuvo cuando este aislamiento se inoculó solo y por 25 minutos, seguido por los tratamientos donde el aislamiento NW250 se inoculó con el aislamiento NW386 y a su vez seguido por el tratamiento donde el aislamiento NW250 fue inoculado solo y por cinco minutos (Fig. 20). La proporción total de larvas infectadas difirieron entre temperaturas ($F_{1,69.9}=22.73$, $P<0.001$), la mortalidad más grande ocurrió cuando las larvas inoculadas se incubaron a 22°C (Fig. 20). Sin embargo, este efecto no fue consistente a través de todos los tratamientos ($F_{5,69.9}=11.51$, $P<0.001$); la mortalidad más grande ocurrió a 22°C sólo cuando NW250 fue co-inoculado con NW386, mientras la mortalidad fue similar a ambas temperaturas cuando NW250 fue inoculado sólo (Fig. 20).

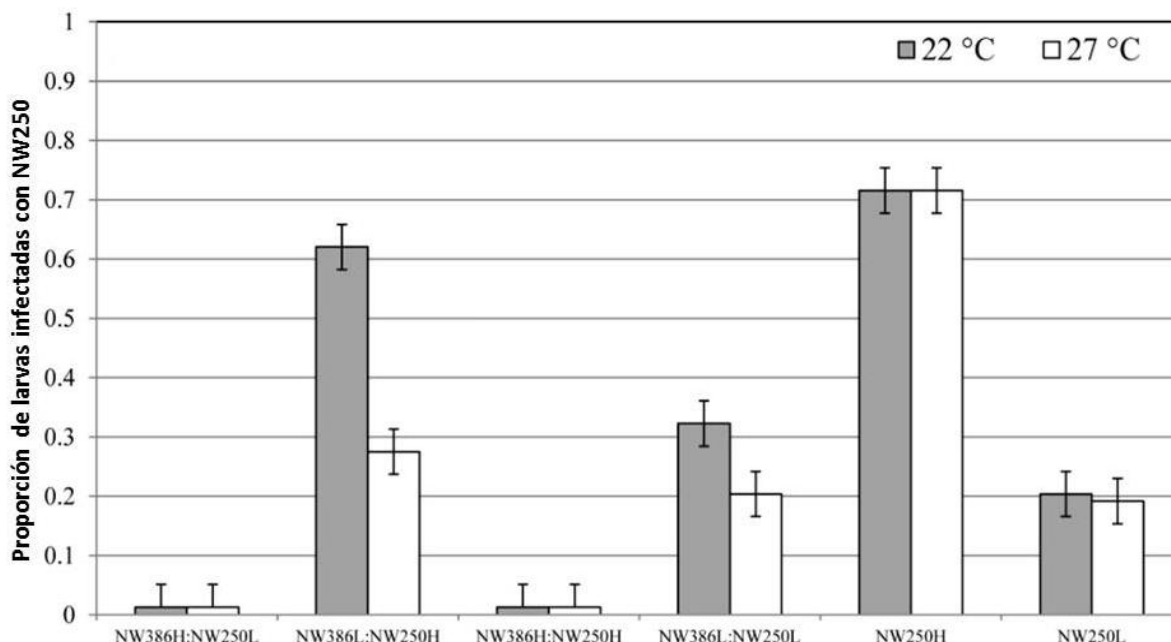


Figura 20. Proporción de larvas de *Plutella xylostella* infectadas con el aislamiento NW250 (n=3), a dos temperaturas de incubación (22 y 27°C), cuando se inoculó por 25 (dosis altas= H) o 5 (dosis bajas=L) minutos, solo y en combinación con los diferentes tratamientos de NW386. Las barras representan el error estándar (EE).

5.4.2. Proporción de larvas de *P. xylostella* infectadas con NW386

La proporción de larvas infectadas con el aislamiento NW386 difirió entre los seis tratamientos donde este aislamiento se inoculó solo o en combinación con NW250 ($F_{5,67.8}=147.79$, $P<0.001$). No hubo mortalidad en el testigo (no se graficó) y las larvas muertas sin esporular o sin presencia de esporas de reposo dentro del cuerpo se descartaron del análisis, ya que fueron muy pocas. La proporción más grande de larvas infectadas con este aislamiento ocurrió cuando se inocularon sólo conidios de NW386 (25 y 5 minutos), se observaron diferencias tan marcadas en la proporción de larvas infectadas entre los aislamientos NW250 (Fig. 20) y NW386

(Fig. 21) debido a que el aislamiento NW386 cuando fue puesto a dosis bajas de exposición, junto con el aislamiento NW250 a dosis bajas o altas de exposición, este último siempre tuvo mayor proporción de larvas infectadas, es decir, inhibió el crecimiento del aislamiento NW386; para el aislamiento NW386 también hubo mayor proporción de larvas infectadas en el tratamiento donde ambos aislamientos NW386 y NW250 se inocularon (por 25 y 5 minutos respectivamente, Fig. 21). Aunque el efecto total de temperatura no fue estadísticamente significativo ($F_{1,1.8}=9.92$, $P=0.099$), este efecto no fue consistente a través de todos los tratamientos ($F_{5,67.8}=26.54$, $P<0.001$). Las diferencias en los porcentajes de infección fueron más grandes en los tratamientos donde NW386 se inoculó solo, este aislamiento causó más infección a 22°C que a 27°C (Fig. 21).

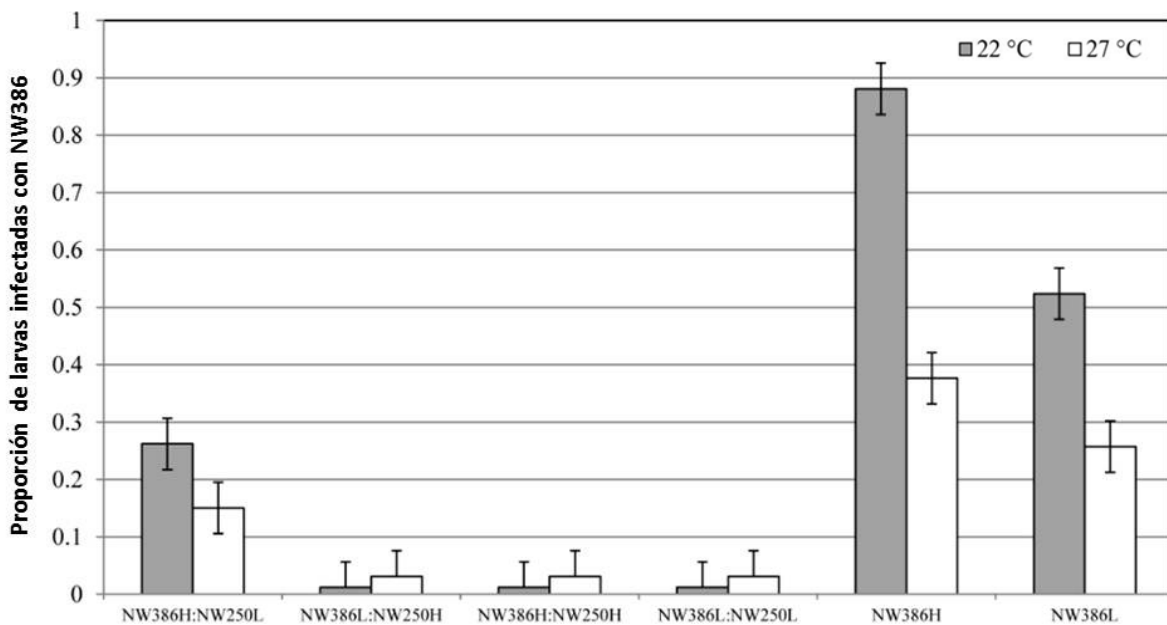


Figura 21. Proporción de larvas de *Plutella xylostella* infectadas con el aislamiento NW386 (n=3), a dos temperaturas de incubación (22 y 27°C), cuando se inoculó por 25 (H) o 5 (L) minutos, solo y en combinación con los diferentes tratamientos de NW250. Las barras representan el error estándar (EE).

5.4.3. Proporción de larvas de *P. xylostella* infectadas con los aislamientos NW386 y NW250

Larvas infectadas de manera dual se encontraron solamente en el tratamiento tres (Cuadro 4) donde ambos aislamientos se inocularon por 25 minutos cada uno (Fig. 22). En este caso la temperatura tuvo un efecto significativo en la proporción de larvas infectadas de forma dual ($F_{1,9,9}=26.03$, $P<0.001$), la proporción más grande se obtuvo cuando las larvas se incubaron a 22°C comparada con 27°C (Fig. 22).

En todos los otros tratamientos no se encontraron los dos aislamientos esporulados al mismo tiempo sobre la misma larva, sino que uno de los dos ganó la proporción de larvas infectadas dependiendo de la dosis y la temperatura utilizadas.

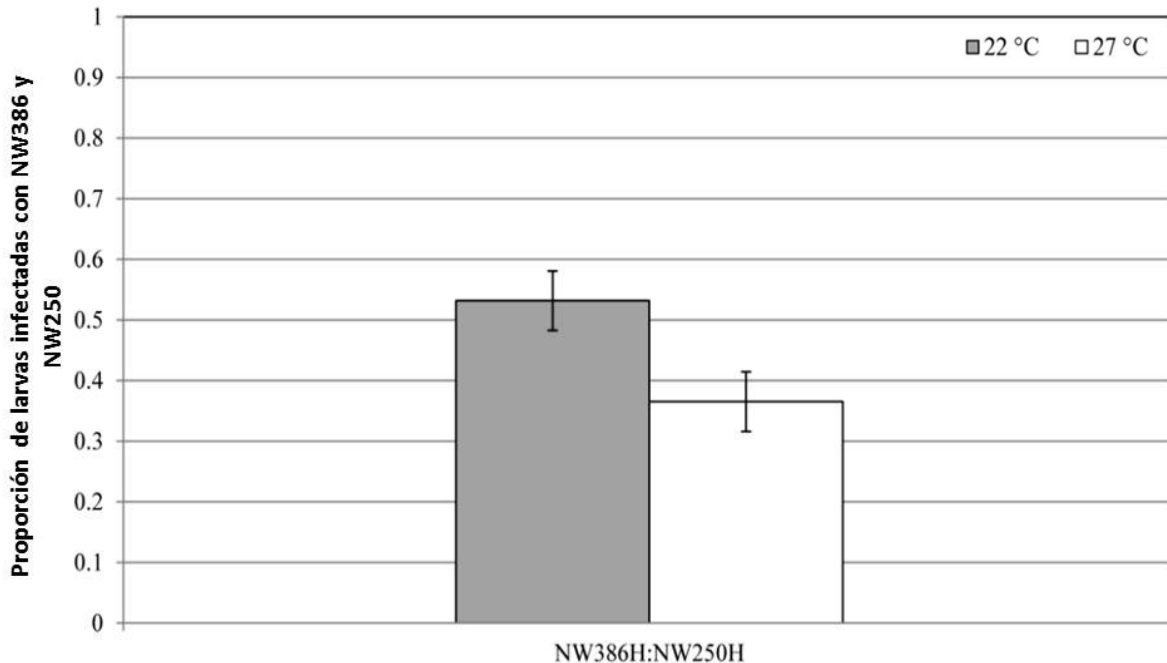


Figura 22. Proporción de larvas de *Plutella xylostella* infectadas con los aislamientos NW386 y NW250 (infección dual), (n=3), a dos temperaturas de incubación (22 y 27°C), cuando se inocularon ambos aislamientos a 25 (dosis alta) o 5 (dosis baja) minutos simultáneamente por combinación de los mismos periodos de tiempos. Las barras representan el error estándar de la medias.

El único tratamiento donde se encontraron los productos de PCR-RFLP de los dos aislamientos, NW386 y NW250, en la interacción intraespecífica al mismo tiempo y en las mismas larvas inoculadas fue en el número tres (NW386H: NW250H) a 22 y 27°C (Fig. 23 y 24); también se observó que a 22°C las bandas de este tratamiento se visualizaron más fuertes para el aislamiento NW386, y más tenues para el aislamiento NW250 (Fig. 23). A la temperatura de 27°C se observó que las bandas de PCR-RFLP se visualizaron más débiles para el aislamiento NW368 y más

fuertes para el aislamiento NW250 (Fig. 24), ambos casos en gel de agarosa a una concentración de 3%.

En las temperaturas de 22 y 27°C en el tratamiento cuatro, que corresponde a dosis bajas de exposición de las larvas a la lluvia de conidios para los dos aislamientos (durante 5 minutos), se logró amplificar el ADN sólo del aislamiento NW250, aún cuando el aislamiento NW386 debería estar presente, pero no hubo amplificación de este último (Fig. 23 y 24). Al realizar la amplificación de bandas de ADN, aquéllas que se obtuvieron corresponden a las cepas que persistieron o que se encontraron en mayor concentración, y por tanto, se infiere que son las que prevalecen en estos eventos de interacción y quizá de competencia.

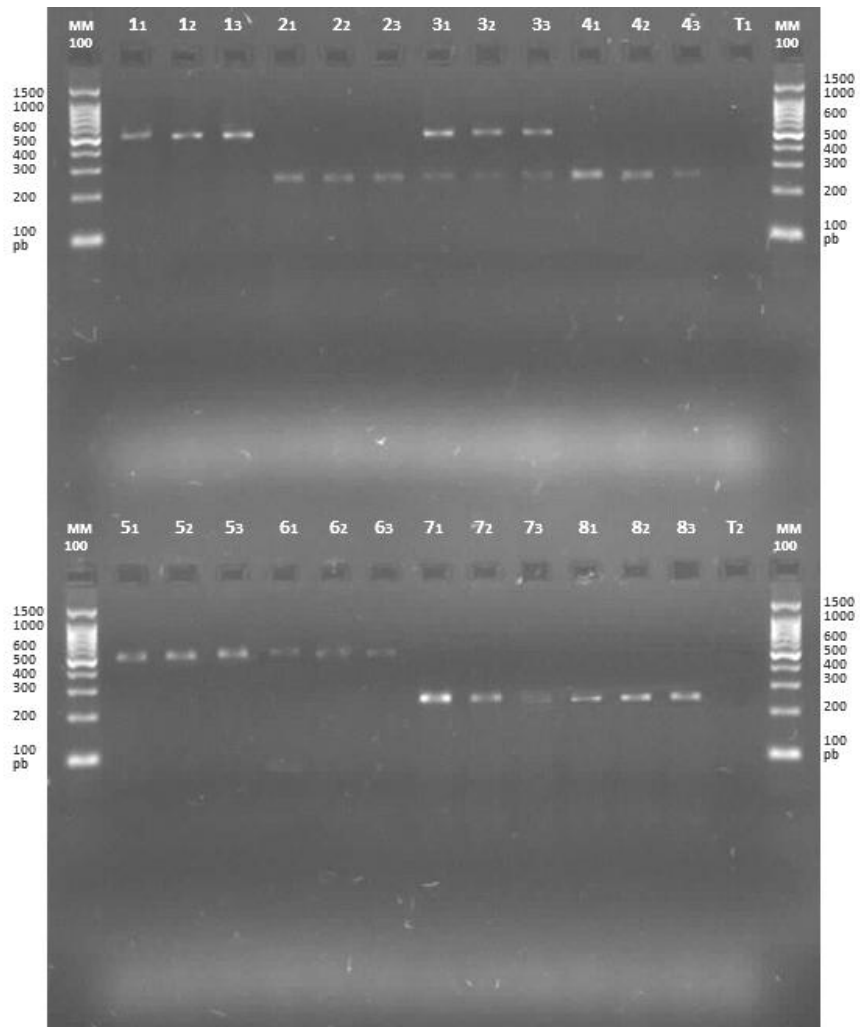


Figura 23. Ejemplo del perfil de RFLP de los aislamientos NW386 y NW250 de *Z. radicans* generados por la enzima de restricción Ddel utilizando producto de PCR amplificado de la región ITS, utilizando DNA genómico extraído de larvas infectadas e incubadas a 22°C. Los números superiores en cada línea representan los tratamientos inoculados sobre las larvas (Cuadro 4). T1 y T2 son los controles negativos utilizando agua destilada estéril. Tamaño del marcador 100 pb.

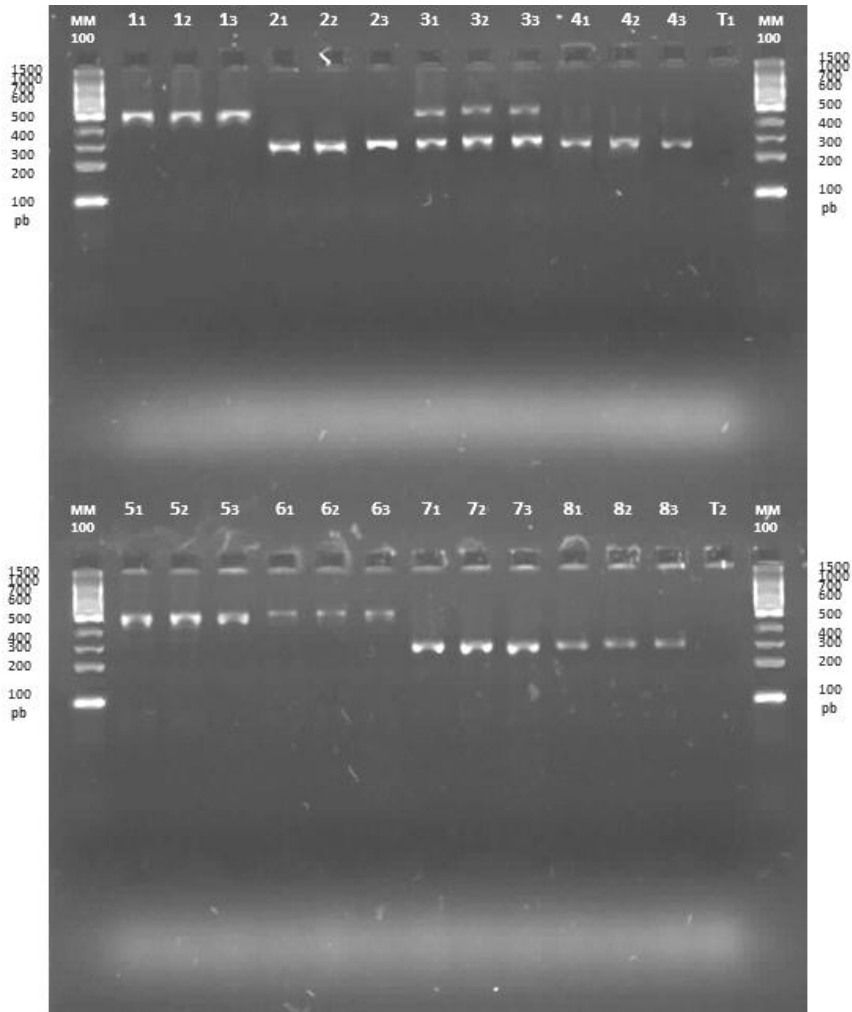


Figura 24. Ejemplo del perfil de RFLP de los aislamientos NW386 y NW250 de *Z. radicans* generados por la enzima de restricción DdeI utilizando producto de PCR amplificado de la región ITS, utilizando DNA genómico extraído de larvas infectadas e incubadas a 27°C. Los números superiores en cada línea representan los tratamientos inoculados sobre las larvas (Cuadro 4). T1 y T2 son los controles negativos utilizando agua destilada estéril. Tamaño del marcador 100 pb.

6. DISCUSIÓN GENERAL

La producción de conidios (esporulación) como un indicador de reproducción, y el potencial para subsecuentes transmisiones, es la última medida de una respuesta exitosa para cualquier hongo seguido de infecciones duales y competencia con otros hongos (Ebert y Weisser, 1997; Solter *et al.*, 2002). En algunos experimentos es esencial que aquellos conidios puedan ser identificados y atribuidos a aislamientos particulares o específicos. Esto es posible cuando la competencia interespecífica se mide, ya que el conidio de cada especie puede ser distinguido morfológicamente (Guzmán-Franco *et al.*, 2009). Cuando se estudian las interacciones entre aislamientos de la misma especie, la separación morfológica del conidio puede ser imposible y se requiere de diferentes herramientas. Nuestros resultados representan el primer reporte de respuesta de interacciones intraespecíficas, entre aislamientos de un hongo entomoforal (*Z. radicans*), infectando larvas de *P. xylostella*, a diferentes temperaturas y se logró utilizando PCR-RFLP para distinguir entre los diferentes aislamientos producidos a partir de inoculaciones duales.

Primero se estudió la virulencia de los aislamientos a diferentes temperaturas y las interacciones entre los aislamientos *in vitro*. Después se utilizaron estos datos para inferir en las características deseadas y se seleccionó aislamientos para los estudios de inoculación dual. Los datos de virulencia para todos los aislamientos sugirieron una relación entre virulencia y las especies hospedantes de los cuales fueron originalmente obtenidos.

La mayoría de los aislamientos virulentos contra *P. xylostella* fueron aquellos obtenidos del mismo hospedante (Cuadro 5). Resultados similares han sido reportados previamente por otros investigadores (Milner y Mahon, 1985; Walter *et al.*, 2003). Cuando se estudió la temperatura sobre la virulencia en un subgrupo del mismo aislamiento (cuatro aislamientos), la virulencia de dos de ellos (NW250 y NW386, originalmente aislados de larvas de *P. xylostella*) se redujo significativamente (valor más grande de la CL_{50} registrado) a 15°C que correspondió a la temperatura más baja evaluada (Cuadro 7). La variación en la virulencia para los mismos aislamientos a 22 y 27°C fue pequeña (Cuadro 7) de acuerdo con la temperatura óptima para el crecimiento reportado para las especies de 25°C (Milner y Lutton, 1983; Milner y Mahon 1985; Glare *et al.*, 1987; Guzmán-Franco *et al.*, 2008b). No se encontró ningún efecto por temperatura para los aislamientos ARSEF6003 y ARSEF1699. Es posible que la baja virulencia de estos aislamientos (ARSEF6003 y ARSEF1699) hacia larvas de *P. xylostella* enmascaró la detección de cualquier efecto de temperatura; también es posible que si otro insecto hospedante se hubiera utilizado, la virulencia quizá pudo haber sido modificada (Milner and Lutton, 1983; McGuire *et al.*, 1987b; Walter *et al.*, 2003).

Cuando se estudiaron las interacciones *in vitro* entre los mismos cuatro aislamientos de *Z. radicans*, solamente el crecimiento del aislamiento NW386 no fue afectado por la presencia de los otros aislamientos (Fig. 14 y 18). Para los otros aislamientos el efecto varió, dependiendo sobre el aislamiento presente en la misma caja Petri. El crecimiento del aislamiento NW250 se redujo significativamente por la presencia del aislamiento NW386 (Fig. 11), estos dos

aislamientos fueron aislados de larvas de *P. xylostella* originalmente. El efecto sobre el crecimiento *in vitro* del aislamiento NW250 causado por aislamientos con-específicos se ha observado previamente (Guzmán-Franco, 2005). Esto sugiere que el aislamiento NW250 puede no ser muy eficiente cuando compite por el mismo recurso con otro aislamiento, pudiendo ser excluido durante la competencia. No es claro qué mecanismos utilizados por NW386 afectan negativamente el crecimiento de NW250 en un medio artificial, pero probablemente NW386 puede ser más eficiente utilizando los nutrientes y recursos en el medio, y que los recursos limitados remanentes para NW250 fueron insuficientes para alcanzar el nivel de crecimiento logrado cuando no estaba compitiendo. Esto ha sido descrito por otros autores como agotamiento de nutrientes o envejecimiento mutuo (Rayner y Weber, 1984). No se encontró incompatibilidad entre el micelio de los aislamientos interactuando, tampoco alguna barrera estacionaria o pigmentación oscura (Fig. 19), como otro autor las observó (Boddy, 2000), estas características fueron observadas solamente en la interacción entre aislamientos de *Z. radicans* contra *P. blunckii* (Guzmán-Franco, 2005). También es interesante que los aislamientos que no se obtuvieron de larvas de *P. xylostella* (ARSEF1699 y ARSEF6003) no fueron afectados por NW386 o NW250, pero ellos si se afectaron entre sí (Fig. 12, 13, 16 y 17). La diferencia en la virulencia entre aislamientos originalmente obtenidos de *P. xylostella*, comparados a los aislamientos de otros hospederos (Cuadro 5), sugieren cierta especificidad hacia el hospedero, tal especificidad puede guiar a la conducta competitiva entre aislamientos de *P. xylostella* cuando compiten por la misma fuente.

Basados en estos resultados, se investigó las interacciones *in vivo* entre NW250 y NW386. Las interacciones dentro del hospedero pueden ser modificadas por factores que no están presentes *in vitro*, como se ha demostrado previamente por las interacciones entre el aislamiento NW250 de *Z. radicans* y aislamientos de *P. blunckii* cuando co-infectaron larvas de *P. xylostella* (Guzmán-Franco *et al.*, 2011). La temperatura puede influir en los resultados; en el estudio de inoculación dual la mayor infección se obtuvo siempre a 22°C, comparado con 27 °C en todos los tratamientos (Fig. 20, 21 y 22). La dosis en las inoculaciones jugaron un papel importante, ambos aislamientos infectaron larvas en la presencia del otro aislamiento, pero solo cuando la concentración de conidios en la inoculación fue más grande que la de su competidor (p.e. cuando se utilizó una inoculación más grande de tiempo como 25 minutos vs 5 minutos) (Cuadro 4) (Fig. 20, 21 y 22). En los tratamientos donde la concentración de conidios en la inoculación fue alta para ambos aislamientos (p.e. cuando los dos fueron inoculados por 25 minutos) (Fig. 22) se registró la infección dual. Este fue el único tratamiento donde se encontró la larva por la infección dual, sugiriendo que ambos aislamientos fueron competitivos en la más alta concentración de conidios. Sin embargo, cuando ambos fueron inoculados por 5 minutos, solo el aislamiento NW250 infectó larvas a las dos temperaturas utilizadas (Fig. 20).

Existen dos factores adicionales que probablemente contribuyeron a las diferencias en los resultados de los experimentos *in vivo*, y que se han reportado como “el papel del sistema inmune del insecto (Hughes *et al.*, 2004) y “el orden de inoculación” (Zamora-Macorra *et al.*, en prensa). Los dos aislamientos se

obtuvieron del mismo hospedero, lo cual pudo haber influido en los resultados, ya que estos aislamientos podrían haber desarrollado estrategias específicas para infectar *P. xylostella*.

En resumen, los resultados descritos aquí, especialmente en las relaciones de interacción *in vivo*, señalaron que dos aislamientos de virulencia similar pueden coexistir en poblaciones de larvas de *P. xylostella* como lo harían entomopatógenos en cualquier metacomunidad (Abrams y Wilson, 2004), incluso en cualquier larva individual, un aislamiento puede ser excluido dependiendo de su concentración inicial de inóculo en la larva. La temperatura tuvo también efecto en los resultados, la mortalidad total fue más grande a 22°C especialmente para el aislamiento NW250.

7. CONCLUSIONES

Los resultados indican que cuando se piense en el manejo de *P. xylostella* mediante el uso *Z. radicans*, se debe tener en cuenta el origen de los aislamientos capacidad de esporulación, compatibilidad de cepas, la virulencia (que varía entre todos los aislamientos) y las condiciones climáticas bajo las cuales se piensa utilizar.

Los resultados corroboran que los aislamientos más virulentos de *Z. radicans*, son aquellos que fueron aislados del mismo huésped (NW379, NW386 y NW250). La selección de aislamientos se debe hacer de acuerdo a las condiciones climáticas óptimas de desarrollo de cada uno). En este caso NW386 fue mejor a 22°C y NW250 a 27°C.

Los resultados *in vitro* sugieren que algunos aislamientos de *Z. radicans* (NW386) tienen mayor capacidad de aprovechamiento de los nutrientes provenientes de una misma fuente cuando se encuentran ante la presencia de otros (NW250), sin ser afectados de manera significativa en su desarrollo, incluso, en un medio artificial limitado, algunos aislamientos pueden coexistir y mueren juntos sin que hayan desarrollado de metabolitos secundarios que afecten la presencia del otro, dominando la superficie de crecimiento el que mejor aprovechó los recursos disponibles.

Los resultados *in vivo* indican que algunos aislamientos de *Z. radicans* (NW386 y NW250) son capaces de coexistir (en concentraciones altas de inóculo), incluso a nivel de un mismo individuo bajo condiciones de laboratorio, por lo que es muy probable que bajo condiciones de campo también suceda. Esto aseguraría la supervivencia de los mismos (mediante la esporulación, formación de esporas de reposo), pero también sugiere que puede haber exclusión competitiva por orden de llegada, diferencias en la cantidad de inóculo inicial, sistema inmune del insecto y la temperatura óptima de desarrollo de cada aislamiento.

El aislamiento NW386 resultó más competitivo que el aislamiento NW250 a pesar que los dos fueron obtenidos de *P. xylostella*.

Este es el primer reporte de investigación de competencia intraespecífica dual a nivel de aislamientos de una misma especie de hongos entomopatógenos del grupo de los entomoftorales y puede usarse como modelo para otras interacciones entre entomopatógenos.

9. LITERATURA CONSULTADA

Abrams, P. A. y Wilson, W. G. 2004. Coexistence of competitors in metacommunities due to spatial variation in resource growth rates; does R predict the outcome of competition?. *Ecology Letters*, 7: 929–940.

Alatorre, R. R. y Guzmán F. A. W. 2000. Uso de entomopatógenos para el control de insectos, caso *Brevicoryne brassicae*. Temas selectos en Fitosanidad y producción de Hortalizas (Editores Bautista N.M.; Suárez V. A.D. y Morales G.O). Colegio de Postgraduados, Montecillo México. 173 p.

Alatorre, R. R.; Guzmán F. A. W.; Pell J. K. y Shah, P. A. 2000. Development and use of mycoinsecticides for pest control. The British Council. DFID Hel Evaluation Mission.

Alatorre, R. R. y Hernández, F. R. 2003. Microbial control group Mexico. Microbial Pest Control for Sustainable Periurban / Urban Agriculture in Latin America. Annual Report. La Habana, Cuba.

Arnold, A. E.; Mejía, L. C.; Kyllö, D.; Rojas, E.; Maynard, Z.; Robbins, N. y Herre, E. A. 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 649–654.

Arthropod Pesticide Resistance Database, (n.d.). Consultada el 8/07/2010 de Michigan State University Board of Trustees de: <http://www.pesticideresistance.org/>).

Ausubel, F. M.; Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore, D. D.; Seidman, J. G.; Smith, J. A. y Struhi, K.. 1992. Current protocols in molecular biology. Vol. 1 y 2. John Wiley and Sons. New York, USA.

Batta, Y. A.; Rahman, M.; Powis K.; Baker G. y Schmidt, O. 2011. Formulation and application of the entomopathogenic fungus: *Zoophthora radicans* (Brefeld) Batko (Zygomycetes: Entomophthorales). Journal of Applied Microbiology 110: 831–839.

Bauer, L. S.; Miller, D. L.; Maddox, J. V. y McManus, M. L. 1998. Interactions between a *Nosema* sp. (Microspora: Nosematidae) and nuclear polyhedrosis virus infecting the gypsy moth, *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae). J. Invertebr. Pathol. 72: 147–153.

Baur, M. E.; Kaya, H. K. y Tabashnik, B. E. 1997. Efficacy of a dehydrated steinernematid nematode against black cutworm (Lepidoptera: Noctuidae) and diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). J. Econ. Entomol. 90: 1200–1206.

- Beebe, T. y Rowe, G. 2008. An introduction to molecular ecology. Oxford University Press, Oxford.
- Begon, M.; Harper, J. L. y Townsend, C. R., 1996. Ecology: Individuals, populations and communities. 3rd edition. London: Blackwell Science Ltd.
- Ben-Ze'ev, I. y Kenneth, R. G. 1981. *Zoophthora radicans* and *Zoophthora petchi* sp. nov. (Zygomycetes: Entomophthorales), two species of Sphaerosperma group attacking leaf-hoppers and frog-hoppers (Homoptera). Entomophaga 26: 131-142.
- Bleiker, K. P. y Six, D. L. 2009. Competition and Coexistence In a Multi-partner Mutualism: Interactions Between two Fungal Symbionts of the Mountain Pine Beetle In Beetle-attacked Trees. Microb. Ecol. 57: 191–202.
- Boddy, L. 2000. Interspecific combative interactions between wood- decaying basidiomycetes. FEMS Microbiology Ecology 31: 185–194.
- Bonifacio, P. M. 1990. Formation of appressoria in vitro by the entomopathogenic fungus *Zoophthora radicans* (Zygomycetes: Entomophthorales). J. of Invert. Pathol. 55: 284-288.
- Bonifacio, P. M.; Leger, J. R; Humber, A. R; Allee, L. L; Shields, J. E y Roberts, W. D. 1991. Nuclear events during germination and appressorial formation of

the entomopathogenic fungus *Zoophthora radicans* (Zygomycetes: Entomophthorales. J. of Invert. Pathol. 57: 43-49.

Bujanos, M.R. 2000. Manejo Integrado de Plagas en Crucíferas. En: Bautista M.N. (Edit.) Temas selectos en fitosanidad y producción de hortalizas. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. 47-61 p.

Bujanos, M., R.; Marín, A. J.; Galván, F. C.; y Byerly, K. F. M. 1993. Manejo integrado de la palomilla dorso de diamante; *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae) en el Bajío, México. SARH-INIFAP-PIAFEG-APFVG. Publicación Especial Núm. 4. PM Intergraphic. San Miguel de Allende, Guanajuato, México. 36 p.

Bujanos R. M. y Marín J. A 2005. Manejo Integrado de Palomilla dorso de diamante *Plutella xylostella* (L.) en el Bajío, México. Memoria Tecnología de Producción de las crucíferas VI Seminario Técnico Expo-Tecnología Dia de campo. Celaya, Gto, México. 9 p.

Choo, H. Y.; Kaya, H. K.; Burlando, T. M. y Gaugler, R. 1989. Entomopathogenic nematodes: host-finding ability in the presence of plant roots. Environ. Entomol. 18; 1136–1140.

Cox, F. E. G. 2001. Concomitant infections, parasites and immune responses. Parasitology, 122: 23-38.

de Roode, J. C.; Pansini, R.; Cheesman, S. J.; Helinski, E. H.; Huijben, S.; Wargo, A. R.; Bell, A. S.; Chan, B. H. K.; Walliker, D. y Read, A. F. 2005. Virulence and competitive ability in genetically diverse malaria infections. *Proc Natl Acad Sci* 102: 7624-7628.

Dedryver, C. A. 1978. Facteurs de limitation des populations d'Aphis fabae dans l'ouest de la France III. Répartition et incidence des différentes espèces d'Entomophthora dans les populations. *Entomophaga* 23: 137-151.

Díaz, G. O.; Rodríguez, J. C. M.; Shelon, A. M. y Lagunes, A. T. 2000. Susceptibilidad de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) a dos formulaciones comerciales de *Bacillus thuringiensis* Berliner en México. In: Memoria Congreso Nacional de Entomología, Aguascalientes, Ags.:320-323.

DOF, 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-081-FITO-2001, Manejo y eliminación de focos de infestación de plagas, mediante el establecimiento o reordenamiento de fechas de siembra, cosecha y destrucción de residuos. 18 de septiembre 2002.

Dos Santos, H. J. G.; Marques E. J.; Barros, R. y Gondim, M. G. C. 2006. Interação de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e o Parasitoide *Oomyzus sokolowskii* (Kurdjumov) (Hymenoptera:

Eulophidae) sobre Larvas da Traçadas-Crucíferas, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). *Neotropical Entomology* 35:241-245.

Douglas, A. E., 2010. *The Symbiotic Habit*. Princeton University Press. 23 p.

Ebert, D. y Weisser, W. W. 1997. Optimal killing for obligate killers: the evolution of life histories and virulence of semelparous parasites. *Proc. Roy. Soc. Lond. B. Bio.* 264: 985-991.

Eigenbrode, S. D.; Moodie, S., y Castagnola, T.. 1995. Predators mediate host plant resistance to a phytophagous pest in cabbage with glossy leaf wax. *Entomol. Exp. Appl.* 77: 335-342.

Enkerli, J. y Widmer, F. 2010. Molecular ecology of fungal entomopathogens: the molecular genetic tools and their application. *BioControl.* 55: 17-37.

Fargues, J. y Bon, M. C. 2004. Influence of temperature preferences of two *Paecilomyces fumosoroseus* lineages on their co-infection pattern. *Journal of Invertebrate Pathology*, 87: 94-104.

Ferré, J. y Van Rie, J. 2002. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 47: 501–533.

Furlong, M. J.; Pell, J. K.; Ong, P. C. y Syed, A. R. 1995. Field and laboratory evaluation of a sex pheromone trap for the autodissemination of the fungal entomopathogen *Zoophthora radicans* (Entomophthorales) by the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae). Bull. Entomol. Res. 85: 331–337.

Furlong, M. J.; Pell, J. K. y Reddy, G. V. P. 1997. Premortality Effects of *Zoophthora radicans* Infection in *Plutella xylostella*. *Journal of Invertebrate Pathology* 70: 214–220.

Furlong, M. J. y Pell, J. K.. 2000. Conflicts between a fungal entomopathogen, *Zoophthora radicans*, and two larval parasitoids of the diamondback moth. *J. Invertebr. Pathol.* 76: 85-94.

Furlong, M. J. y Pell, J. K. 2001. Horizontal Transmission of Entomopathogenic Fungi by the Diamondback Moth. *Biological Control* 22: 288–299.

Furlong, M. J. y Pell, J. K. 2005. Interactions between entomopathogenic fungi and other arthropods natural enemies. In *Ecology and Evolution*. UK: Oxford University Press, 51-73.

Galaini-Wraight, S.; Wraight, S. P.; Carruthers, R. I.; Magalhaes, B. P. y Roberts, D. W. 1991. Description of a *Zoophthora radicans* (Zygomycetes: Entomophthoraceae) Epizootic in a Population of *Empoasca kraemeri*

(Homoptera: Cicadellidae) on Beans in Central Brazil. *Journal of Invertebrate Pathology* 58: 31 I-326.

Glare, T. R.; Milner, R. J.; Chilvers, G. A.; Mahon, R. J. y Brown, W. V, 1987. Taxonomic implications of intraspecific variation amongst isolates of the aphid-pathogenic fungi *Zoophthora radicans* Brefeld and *Z. phalloides* Batko (Zygomycetes: Entomophthoraceae). *Australian Journal of Botany* 35: 49–67.

Godonou, L.; James, B.; Atcha-Ahowé, C; Vodouhé, S.; Kooyman, C.; Ahanché dé, A. y Korie, S. 2009. Potential of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates from Benin to control *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae). *Crop Protection* 28: 220–224.

Greenhouse, S. W. y Geisser, S. 1959 On methods in the analysis of profile data. *Psychometrika* 24: 95-112.

Gujar, G. T. y Mohan, M. 2002. Diamondback moth resistance to *Bacillus thuringiensis* and its toxins: an Indian experience. In: Koul, O. Dhaliwa I, G. S., Marwaha, S.S., Arora, J. K. (Eds.), *Biopesticides and Pest Management: Progress and Potential*. Campus Books International, New Delhi, India. 96–112.

Grzywacz, D.; Rossbach, A.; Rauf, A.; Russell, D. A.; Srinivasan, R. y Shelton, A. M. 2010. Current control methods for diamondback moth and other brassica insect pests and the prospects for improved management with lepidopteran-resistant Bt vegetable brassicas in Asia and Africa. *Crop Protection* 29: 68–79.

Guzmán-Franco, A. W. 2005. Interactions between *Zoophthora radicans* and *Pandora blunckii* isolates in *Plutella xylostella* populations. Ph.D. thesis, The University of Nottingham, UK.

Guzman-Franco, A. W.; Atkins, S. D.; Alderson, P. G. y Pell, J. K. 2008a. Development of species-specific diagnostic primers for *Zoophthora radicans* and *Pandora blunckii*; two co-occurring fungal pathogens of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Mycological research* 112: 1227 - 1240.

Guzmán-Franco, A. W.; Clark, S. J.; Alderson, P. G. y Pell, J. K. 2008b. Effect of temperature on the in vitro radial growth of *Zoophthora radicans* and *Pandora blunckii*, two co-occurring fungal pathogens of the diamondback moth *Plutella xylostella*. *BioControl* 53: 501-516.

Guzmán-Franco, A. W.; Clark, S. J.; Alderson, P. G. y Pell, J. K. 2009. Competition and co-existence of *Zoophthora radicans* and *Pandora blunckii*,

two co-occurring fungal pathogens of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. Mycological Research 113: 1312-1321.

Guzmán-Franco, A. W.; Clark, S. J.; Alderson, P. G. y Pell, J. K. 2011. Use of quantitative PCR to understand within-host competition between two entomopathogenic fungi. Journal of Invertebrate Pathology 107: 155–158.

Ho, T. H. 1965. The life history and control of diamondback moth in Malaysia. Bull. Div. Agric. Malays. 118:1-26.

Hughes, W. O.; Petersen, K. S.; Ugelvig, L. V.; Pedersen, D.; Thomsen, L.; Poulsen, M. y Boomsma, J. 2004. Density-dependence and within host Competition in a Semelparous Parasite of Leaf-cutting Ants. BMC Evolutionary Biology 4:45.

Humber, R. A. 1974. Phylogenesis and Taxonomic Structure of the Entomophthoraceae. De Batko Andrzej. Editado por Humber, R. A. USDA, Technical Translation TT-77-54076. Translated from Polish by I. Jampoler. 57 p.

Humber, R. A. 1981. An alternative view of certain taxonomic criteria used in the Entomophthorales (Zygomycotina). Mycotaxon. 13: 191-240.

- Humber, R. A. 1998. Entomopathogenic fungal identification. USDA-ARS Plant Protection Research Unit US Plant, Soil & Nutrition Laboratory Tower Road Ithaca, NY 14853-2901. APS/ESA Joint Annual Meeting 8-12. Las Vegas, NV.
- Inglis, G. D.; Johnson, D. L.; Cheng, K. J. y Goettel, M. S. 1997. Use of pathogen combinations to overcome the constraint of temperature on entomopathogenic hyphomycetes against grasshoppers. *Biological Control* 8: 143-152.
- Jensen, A. B.; Gargas, A.; Eilenberg, J. y Rosendahl, S. 1998. Relationships of the insect-pathogenic order Entomophthorales (Zygomycota, Fungi) based on phylogenetic analysis of nuclear small subunit ribosomal DNA sequences (SSU rDNA). *Fungal Genetics and Biology* 24: 325-334.
- Kathie, T. H; Sauyer, J. A. y Humber, A. R. 1995. RAPD-PCR for identification of *Zoophthora radicans* isolates in biological control of the potato leafhopper. *J. Invert. Pathol.* 65: 1-9.
- Keller, S. 2007. Arthropod-pathogenic Entomophthorales: Biology, Ecology, Identification. *Printed in Luxembourg*. COST Domain: Food and Agriculture (F&A). 155 p.

- Kennedy, P. G.; Bergemann, S. E.; Hortal, S. y Bruns, T. D. 2007. Competitive interactions among three ectomycorrhizal fungi and their relation to host plant performance. *Journal of Ecology* 95: 1338–1345.
- Kennedy, P. G. y Bruns, T. D. 2005. Priority effects determine the outcome of ectomycorrhizal competition between two *Rhizopogon* species colonizing *Pinus muricata* seedlings. *New Phytologist* 166: 631–638.
- Kennedy, P. 2010. Ectomycorrhizal fungi and interspecific competition: species interactions, community structure, coexistence mechanisms, and future research directions. *New Phytologist* 187: 895–910.
- Koppenhöfer, A. M. y Kaya, H. K. 1996. Coexistence of two steinernematid nematode species (Rhabditida: Steinernematidae) in the presence of two host species. *Applied Soil Ecology* 4: 221-230.
- Leite, L. G.; Alves, S. B.; Wraight, S. P.; Galaini-Wraight, S. y Roberts, D. W. 1996. Habilidade de infecciao de isolados de *Zoophthora radicans* sobre *Empoasca kraemeri*. *Sci. Agric.* 53: 152–158.
- Lim, G. S. 1986. Biological control of diamondback moth. In: *Diamondback Moth Management. Proceedings of the First International Workshop, Tainan, Taiwan, 11-15 March, 1985.* Shanhua, Taiwan; Asian Vegetable Research and Development Center. 159-171.

- Liu, S. S.; Chen, F. Z. y Zalucki, M. P. 2002. Development and survival of the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) at constant and alternating temperatures. *Environmental Entomology*, 31: 221-231.
- McCabe, D. y Soper, R. S., 1985. Preparation of an entomopathogenic fungal insect control agent.
- Machain, L. M.; Martínez, J. L. C.; Sifuentes, J. A. A. y Carrillo, J. L. S. 1975. Principales plagas de los cultivos del Valle de Mexicali y sus enemigos naturales. INIA-SAG. Folleto Técnico 57. 49 p.
- Mann, H.; Bateman, L.; Burger, A. E., y Iams, M. H. 1992. A field study of interspecific relationships. Tested studies for laboratory teaching, Volume 6 (C.A. Goldman, S.E., Andrews, P.L. Hauta, and R. Ketchum, Editors). Proceedings of the 6th Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE), 161 p.
- Martínez, C. M.; Leyva, J. L.; Cibrián-Tovar J. y Bujanos, M. R. 2002. Parasitoid diversity and impact on populations of the diamondback moth *Plutella xylostella* (L.) on Brassica crops in central México. *BioControl* 47: 23-31.
- McGuire, M. R.; Maddox, J. V., y Armbrust, E. J. 1987a. Effect of temperature on distribution and success of introduction of an *Empoasca fabae* (Homoptera:

Cicadellidae) isolate of *Erynia radicans* (Zygomycetes: Entomophthoraceae). J. Invertebr. Pathol. 50: 291-301.

McGuire, M. R.; Maddox, J. V. y Armbrust, E. J. 1987b. Host range studies of an *Erynia radicans* strain (Zygomycetes: Entomophthoraceae) isolated from *Empoasca fabae* (Homoptera: Cicadellidae). J. Invertebr. Pathol. 50: 75-77.

McPherson, M. y Molli, S. 2006. PCR. The basics. Second edition. 292 p.

Mesquita, A, L. M.; Lacey, L. A.; Ceianu, C. S. y Dabire, R. 1999. Predatory and Parasitic Activity of *Aphelinus asychis* (Hymenoptera: Aphelinidae) Following Exposure to the Entomopathogenic Fungus *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) Under Different Humidity Regimes. An. Soc. Entomol. Brasil, 28: 661-673.

Meyling, N. V. y Hajek, A. E. 2010. Principles from community and metapopulation ecology: application to fungal entomopathogens. BioControl 55: 39–54.

Mileham, A. J. 1995. Identification of Microorganisms Using Random Primed PCR. Dalgety Food Technology Centre, Cambridge, UK. Methods in Molecular Biology, 46: 257-267.

Milner, R. J. y Lutton, G. G. 1983. Effect of temperature on *Zoophthora radicans* (Brefeld) Batko: An introduced microbial control agent of the spotted alfalfa

- aphid, *Therioaphis trifolii* (Monell) f. *maculata*. J. Austral. Entomol. Soc. 22: 167-173.
- Milner, R. J. y Mahon, R. J. 1985. Strain variation in *Zoophthora radicans*. A pathogen on a variety of insect host in Australia. J. Aust. Entomol. Soc. 24: 195-198.
- Miner, F. D. 1970. Life history of the diamondback moth. J. Econ. Entomol. 40: 581-583.
- Mota-Sanchez, D.; Bills, P. S. y Whalon, M. E. 2002. Arthropod resistance to pesticides: status and overview. *In*: W.B. Wheeler ed. *Pesticides in agriculture and the environment*. New York: Marcel Dekker, Inc. 241-272.
- Mullis, K. B. 1990. The unusual origin of the Polymerase Chain Reaction. Scientific American April, 56–65.
- Mycobank, 2012. Fungal Databases, Nomenclature and Species Banks. International Mycological Association (IMA). <http://www.mycobank.org/> (consultado 9/10/2012).
- Nielsen, C; Milgroom, M. G. y Hajek, A. 2005. Genetic diversity in the gypsy moth fungal pathogen *Entomophaga maimaiga* from founder populations in North America and source populations in Asia. Mycol. Res. 109: 941–950.

- Ownley, B. H.; Gwinn, K. D. y Vega, F. E. 2010. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. *BioControl* 55: 113–128.
- Pacheco, M. F. 1985. Plagas de los cultivos agrícolas en Sonora y Baja California. INIA-SARH. Centro de Investigaciones Agrícolas del Noroeste. Campo Agrícola Experimental Valle del Yaqui, Sonora, México. 414 p.
- Padmavathamma, K. y Veeresh, G. K. 1995. Effect of sunlight protectants and time of application on the virulence of nuclear polyhedrosis virus of *Plutella xylostella* (Linnaeus). *Current Research*, 24: 92-94.
- Papierok, B. y Hajek, A. E. 1997. Manual of Techniques in Insect Pathology. USA, Academic Press. Chapter V-2, Fungi: Entomophthorales. 187-211.
- Papierok, B.; Torres, L. B. y Arnault, M. 1984. Contribution a l'etude de la spécificité parasitaire du champignon entomopathogène *Zoophthora radicans* (Zygomycetes, Entomophthorales). *Entomophaga* 29: 109-119.
- Payne, R. W.; Murray, D. M.; Harding, S. A.; Baird, D. B. y Soutar, D. M. 2005. GenStat for Windows (8th Edition) Introduction. Hemel Hempstead, UK; VSN International.

- Peay, K. G.; Kennedy, P. G. y Bruns T. S. D. 2008. Fungal Community Ecology: A Hybrid Beast with a Molecular Master. *BioScience*, 58: 799-810.
- Pell, J. K.; Eilenberg, J.; Hajek, A. E. y Steinkraus, D. C. 2001. Biology, ecology and pest management potential of Entomophthorales. *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential* (Butt TM, Jackson CW& Magan N eds.), pp. 71-153.
- Pell, J. K.; Pluke, R.; Kenward, M. G.; Alderson, P.G. y Clark, S. J. 1997. Interactions between two aphid natural enemies, the entomopathogenic fungus *Erynia neoaphidis* Remaudière & Hennebert (Zygomycetes: Entomophthorales) and the predatory beetle *Coccinella septempunctata* L. (Coleoptera: Coccinellidae) *Journal of invertebrate* 69: 261-268.
- Pell, J. K. y Vandenberg, J. D. 2002. Interactions Among the Aphid *Diuraphis noxia*, the Entomopathogenic Fungus *Paecilomyces fumosoroseus* and the Coccinellid *Hippodamia convergens*. *Biocontrol Science and Technology*, 12: 217 – 224.
- Pell, J. K. y Wilding, N. 1992a. Temperature and humidity optimal for survival of entomophthorales. *Entomophaga* 37: 650-654.

- Pell, J. K. y Wilding N. 1992b. The survival of *Zoophthora radicans* (Zygomycetes: Entomophthorales) isolates as hyphal bodies in mummified larvae of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae) *Entomophaga* 37:649-654.
- Pell, J. K.; Wilding, N.; Player, A. L. y Clark, S. J. 1993a. Selection of an isolate of *Zoophthora radicans* (Zygomycetes: Entomophthorales) for Biocontrol of the Diamondback Moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 61: 75-80.
- Pell, J. K.; Macaulay, E. D. M. y Wilding, N. 1993b. A pheromone trap for dispersal of the pathogen, *Zoophthora radicans* Brefeld (Zygomycetes: Entomophthorales) amongst populations of the diamondback moth, *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Biocontrol Sci. Technol.* 3: 315–320.
- Perlman, S. y Jaenike, J. 2001. Competitive interactions and persistence of two nematode species that parasitize *Drosophila recens*. *Ecology Letters* 4: 577–584.
- Posada, F. y Vega, F. 2005. A new method to evaluate the biocontrol potential of single spore isolates of fungal entomopathogens. *J. Insect Sci.* 5: 37.
- Price, P. W. 1997. *Insect ecology*. 3rd ed., 874pp. John Wiley & Sons. New York.

- Quesada, M. E. y Vey, A. 2003. Intra-specific variation in virulence and in vitro production of macromolecular toxins active against locust among *Beauveria bassiana* strains and effects of in vivo and in vitro passage on these factors. *Biocontrol Sci. Technol.* 13: 323–340.
- Rayner, A. D. y Weber, J. F. 1984. Interspecific mycelial interactions – an overview. In: Jennings DH, Rayner ADM (eds), *The Ecology and Physiology of the Fungal Mycelium. British Mycological Society, Cambridge UK*, 383–417.
- Read, A. F. y Taylor, L. H. 2001. The ecology of genetically diverse infections. *Science*, 292: 1099-1102.
- Reddy, G. V. P.; Furlong, M. J.; Pell J. K. y Poppy, G. M. 1998. *Zoophthora radicans* Infection Inhibits the Response to and Production of Sex Pheromone in the Diamondback Moth. *Nota. Journal of Invertebrate Pathology* 72: 167–169.
- Remaudière, G.; Keller, S.; Papierok, B. y Latgé, J. P. 1976. Considérations systématiques et biologiques sur quelques espèces d'entomophthora du groupe sphaerosperma pathogènes d'insectes (Phycomycetes: Entomophthoraceae). *Entomophaga* 21: 163-177.
- Riethmacher, G. W.; Rombach M. C. y Kranz, J. 1992. Epizootics of *Pandora blunckii* and *Zoophthora radicans* (Entomophthoraceae: Zygomycotina) in

Diamondback Moth Populations in the Philippines. *In* “Diamondback Moth and Other Crucifer Pests, Proceedings of the Second International Workshop, Tainan, Taiwan” (N. S. Talekar, Ed.), 193–199.

Root, R. B. 1972. Organization of plant-arthropod association in simple and diverse habitats: the fauna of collards (*Brassica oleracea*). *Ecologicals Monographs* 43:96-104.

Roy, H. E.; Steinkraus, D. C.; Eilenberg, J.; Hajek, A. E.; y Pell J. K. 2006. Bizarre Interactions and Endgames: Entomopathogenic Fungi and Their Arthropod Hosts. *Annu. Rev. Entomol.* 2006. 51: 331–357.

Sambrook, J.; Fritsch, E. F. y Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA.

Sánchez, M. R. 2000. Respuesta de la palomilla dorso de diamante *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae) a la exposición del pigmento fototóxico floxina B. Tesis Doctoral. IFIT-C.P., Montecillo, Texcoco, Edo. de México. 87 p.

Santamarina, S. M. P.; Roselló, C. J.; Barcelo, C. S. y Marín, S. S. 2003. Efecto de la actividad de agua y de la temperatura sobre el comportamiento de *Penicillium oxalicum* frente a *Fusarium oxysporum*. *Rev. Iberoam. Micol.* 20: 154-159.

Shelton, A. M.; Perez, C. J.; Tang, J. D. y Vandenberg, J. D. 1997. Prospects for novel approaches towards management of the diamondback moth. Proceedings of the Third International Workshop on the Management of Diamondback Moth and Other Crucifer Pests, Kuala Lumpur (ed. by Sivapragasm, A.; Loke, W. H.; Hussan, A. K. y Lim, G. S.), 7–20.

Shelton, A. M. 2004. Management of the diamondback moth: De´ ja` vu all over again? In: Endersby, N., Ridland, P.M. (Eds.), The Management of Diamondback Moth and Other Crucifer Pests, pp. 3–8. Proceedings of the Fourth International Workshop on Diamond Back Moth, 26–29 November 2001, Melbourne, Australia.

Solter, L. F.; Siegel, J. P.; Pilarska, D. K. y Higgs, M. C. 2002. The impact of mixed infection of three species of microsporidia isolated from the gypsy moth, *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera: Lymantriidae). J. Invertebr. Pathol. 81: 103–113.

Smith, M. E.; Douhan, G. W. y Rizzo, D. M. 2007. Intra-specific and intra-sporocarp ITS variation of ectomycorrhizal fungi as assessed by rDNA sequencing of sporocarps and pooled ectomycorrhizal roots from a *Quercus* woodland. Mycorrhiza 18: 15–22.

Sutton, D. B. 2007. Fundamentos de ecología. Editorial LIMUSA. 296 p.

Tabashnik, B. E. 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. Annu. Rev. Entomol. 39: 47–79.

Talekar, N. S. 1992. Management of diamondback moth and other crucifer pests. Proceedings of the Second International Workshop on AVRDC, Taiwan 603 p.

Talekar, N. S. y Shelton, A. M. 1993. Biology, ecology, and management of the diamondback moth. Annu. Rev. Entomol. 38: 275-301.

Tanada, Y., y Kaya, H. K. 1993. Insect pathology: Chapter 10, Fungal Infections. Academic Press, San Diego.

Thomas, M. B.; Cory, J.; Myers, J. y Lynch, L. D. 2000. Indirect and non-target effects of biological control. Biocontrol News and Information 21: 14-16.

Tillman, P. G.; Styer, E. L. y Hamm, J. J. 2004. Transmission of an Ascovirus from *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) by three parasitoids and effects of the virus on survival of the parasitoid, *Cardiochiles nigriceps* (Hymenoptera: Braconidae). Environmental Entomology. 33(3):633-643.

Tymon, A. M.; Shah, P. A. y Pell, J. K. 2004. PCR-based molecular discrimination of *Pandora neoaphidis* isolates from related entomopathogenic fungi and

development of species-specific diagnostic primers. *Mycol. Res.* 108: 419–433.

Tymon, A. M. y Pell J. K. 2005. ISSR, ERIC and RAPD techniques to detect genetic diversity in the aphid pathogen *Pandora neoaphidis*. *Mycol. Res.* 109: 285–293.

Velasco-Silva, J.; Alatorre, R. R.; Pell J. K. y Guzmán, F. A. 2000. Characterization of native entomophthoralean fungi associated with *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) in the Bajío region, Guanajuato, México. In: Abstracts of the 33rd annual meeting of the society for invertebrate pathology. 97 p.

Vickers, R. A.; Furlong, M. J.; White, A. y Pell, J. K. 2004. Initiation of fungal epizootics in diamondback moth populations within a large field cage: proof of concept for auto-dissemination. *The Netherlands Entomological Society Entomologia Experimentalis et Applicata* 111: 7–17.

Walter, M.; Stavely, F. J. L.; Chapman, R. B.; Pell, J. K.; Glare, T. R.; Alspach, P. A. y Zydenbos, S. M. 2003. Mortality of various lepidopteran larvae infected by New Zealand *Zoophthora radicans* isolates from different hosts. *N. Z. Plant Prot.* 56: 174-179.

Wicklow, D. T.; Bobell, J. R. y Palmquist, D. E. 2003. Effect of intraspecific competition by *Aspergillus flavus* on aflatoxin formation in suspended disc culture. *Mycol. Res.* 107: 617–623.

Wilding, N.; Brobyn, P. J. 1980. Effects of fungicides on the development of *Entomophthora aphidis*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 75: 279-302.

Wraight, S. P.; Galaini-Wraight, S.; Carruthers, R. I. y Roberts, D. W. 1986. Field transmission of *Erynia radicans* to *Empoasca* leafhoppers in alfalfa following application of a dry mycelial preparation. In: Samson, R.A., Vlak, J.M., Peters, D. (Eds.), *Fundamental and Applied Aspects of Invertebrate Pathology. Foundation of the Fourth International Colloquium of Invertebrate Pathology*, Wageningen, The Netherlands, 233 p.

Wraight, S. P. y Roberts, D. W. 1987. Insect control efforts with fungi. *Dev. Ind. Microbiol.* 28: 77–87.

Wraight, S. P.; Galaini-Wraight, S; Carruthers R. y Roberts D. W. 2003. *Zoophthora radicans* (Zygomycetes: Entomophthorales) conidia production from naturally infected *Empoasca kraemeri* and dry-formulated mycelium under laboratory and field conditions. *Biological Control* 28:60–77.

Yeo, H.; Pell, J. K; Walter, M.; Boyd-Wilson, K. S. H.; Snelling, C. y Suckling, D. M.
2001. Susceptibility of Diamondback Moth (*Plutella xylostella* (L.)) Larvae to
the entomopathogenic fungus, *Zoophthora radicans* (Brefeld) Batko. New
Zealand Plant Protection 54: 47-50.