



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS
CAMPUS MONTECILLO
POSTGRADO DE FITOSANIDAD
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

**"EFECTO DEL ORDEN DE INOCULACIÓN EN LA
INTERACCIÓN DE LOS HONGOS *Pandora blunckii* Y
Zoophthora radicans AL INFECTAR LARVAS DE *Plutella
xylostella*"**

ERIKA JANET ZAMORA MACORRA

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

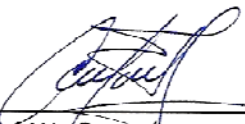
2012

La presente tesis titulada: **EFFECTO DEL ORDEN DE INOCULACIÓN EN LA INTERACCIÓN DE LOS HONGOS *Pandora blunckii* Y *Zoophthora radicans* AL INFECTAR LARVAS DE *Plutella xylostella***, realizada por el alumno: **Erika Janet Zamora Macorra** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA**

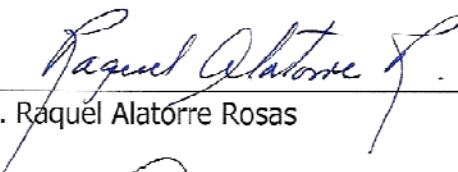
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO




Dr. Ariel W. Guzmán Franco

ASESOR



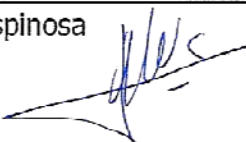
Dra. Raquel Alatorre Rosas

ASESOR



Dr. Javier Suárez Espinosa

ASESOR



M.C. Jorge Manuel Valdéz Carrasco

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Enero de 2012.

**EFFECTO DEL ORDEN DE INOCULACIÓN EN LA INTERACCIÓN DE LOS
HONGOS *Pandora blunckii* Y *Zoophthora radicans* AL INFECTAR LARVAS DE
*Plutella xylostella***

Erika Janet Zamora Macorra, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2012.

La palomilla dorso de diamante (*P. xylostella*) es considerada la principal plaga insectil en cultivos de crucíferas a nivel mundial. Los hongos entomopatógenos *P. blunckii* y *Z. radicans* han sido encontrados infectando larvas de este insecto en condiciones naturales y provocando epizootias. La interacción y posible competencia entre estas dos especies al compartir un mismo recurso (*P. xylostella*) es muy probable, y el resultado de tales interacciones puede ser modificado por diversos factores entre los que se encuentra el orden de inoculación. Para estudiar esto se realizaron experimentos para determinar el efecto del orden de inoculación de estos dos patógenos en la infección de larvas de *P. xylostella*. Primero, se estimó la virulencia de 5 aislamientos de *P. blunckii*, posteriormente se hizo un experimento de inoculación dual utilizando el aislamiento NW449 (originario de México) de *P. blunckii*, y los aislamientos NW386 y NW250 (originarios de México y Malasia, respectivamente) de *Z. radicans*, donde el orden de inoculación entre aislamientos de las dos especies fue alternado. El primer experimento demostró que todos los aislamientos tienen una virulencia similar hacia larvas de *P. xylostella*. El experimento de inoculación dual demostró que estos hongos tienen la capacidad de co-existir; sin embargo, el orden de inoculación afectó significativamente el resultado de estas interacciones, donde el mayor efecto se observó entre los aislamientos NW250 y NW449, ya que en esta combinación la mayor proporción de infección la logró el aislamiento inoculado al final. Nuestros resultados muestran un efecto significativo del orden de inoculación, y sugieren un papel importante del sistema inmune de la larva y el origen geográfico de los aislamientos, en el resultado final de una interacción. Las implicaciones de estos resultados en el uso práctico de estos aislamientos para el control biológico de *P. xylostella* es discutido.

**INOCULATION ORDER AFFECTS THE OUTCOME OF INTERACTIONS
BETWEEN *Pandora blunckii* AND *Zoophthora radicans* IN *Plutella xylostella*
LARVAE**

Erika Janet Zamora Macorra, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2012.

The Diamondback moth (*P. xylostella*) is considered the most important pest of crucifers worldwide. *P. blunckii* and *Z. radicans* has been found infecting *P. xylostella* larvae populations in the field. Within-host interactions between the two species are very likely to occur and the outcome of such interactions may be modified by many factors, including the order of inoculation. Experiments were carried out to determine the effect of the order of inoculation between isolates of these two fungal species when infecting *P. xylostella* larvae. Firstly, the virulence of five *P. blunckii* isolates was tested against *P. xylostella*. Secondly, we did dual inoculation experiments using the *P. blunckii* isolate NW449 (Mexico) and the *Z. radicans* isolates NW386 and NW250 (from Mexico and Malaysia respectively) evaluating two possible isolate combinations and alternating the order of inoculation between both fungal species when inoculated in *P. xylostella*. The virulence of the five *P. blunckii* isolates against *P. xylostella* larvae was similar. The dual-inoculation experiment showed that both fungal species can co-exist in *P. xylostella* populations, however, the most interesting results were achieved when isolates NW250 and NW449 were used, obtaining the highest proportion of infection with the isolate inoculated last. Our results showed a significant effect of the order of inoculation, and suggest an important effect of the insect's immune system and geographical origin of isolates, in the outcomes of an interaction between both fungal species. The implications for using these fungal species for the biological control of *P. xylostella* is discussed

DEDICATORIA

A **DIOS**, que sin su Luz, no sería quien ahora soy.

A mis padres "**Rosa y Rafael**", por su apoyo y amor, con los cuales he podido salir adelante.

A mi hermana "**Mireya**", por sus consejos y apoyo.

A mis abuelos "**Catalina, Odilón, Eulalia y Enrique †**" que han sido los pilares de mi familia.

A mi novio "**Edwin**", por su apoyo y ánimo en todo este tiempo.

A mis amigos "**Beto, Ana, Esmeralda, las chavas y el profe de la rondalla**" que, aunque no estuvieron siempre cerca, me motivaron y me distrajeron de la rutina diaria.

A mis compañeros y amigos de laboratorio "**Santo, Lupita, Yorch, Jhony, Beto**", por sus consejos, enseñanzas y ayuda".

Finalmente, a todas aquellas personas que hicieron posible el término de esta etapa.

GRACIAS A TOD@S...

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo nacional de ciencia y tecnología (CONACYT) que me apoyo económicamente para la realización de todo este trabajo.

Al Colegio de Postgraduados (CP) que me permitió continuar creciendo profesionalmente.

Al Dr. Ariel W. Franco, por haberme apoyado y dirigido para la culminación de este trabajo.

A la Dra. Raquel Alatorre, por haberme transmitido un poco de su conocimiento y apoyo.

Al M.C. Jorge Valdéz, por su apoyo en la toma de fotografías y enseñanza académica.

Al Dr. Javier Suarez, por sus valiosos comentarios y sugerencias para la realización de esta investigación.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE CUADROS	x
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivo.....	4
II. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1. Hongos entomopatógenos.....	5
2.1.1. <i>Zoophthora radicans</i> y <i>Pandora blunckii</i> (Zygomycetes: Entomophthorales).....	6
2.1.2. Ciclo de infección.....	7
2.2. Interacciones entre patógenos.....	8
2.2.1. Competencia por Explotación.....	10
2.2.2. Competencia aparente mediada por el sistema inmune.....	10
2.2.3. Competencia por interferencia.....	11
2.3. Virulencia.....	12
2.4. Sistema inmune.....	14
III. MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1. Cría de <i>Plutella xylostella</i>	18
3.2. Aislamientos de hongos.....	18
3.3. Recuperación de los aislamientos del nitrógeno líquido (NL).....	19
3.4. Estimación de la virulencia relativa de aislamientos de <i>P. blunckii</i> hacia larvas de <i>P. xylostella</i>	19

3.5. Efecto del orden de inoculación en la interacción de <i>P. blunckii</i> y <i>Z. radicans</i> en larvas de <i>P. xylostella</i>	20
3.5.1. Análisis estadístico.....	22
IV. RESULTADOS	23
4.1. Virulencia de aislamientos de <i>P. blunckii</i> hacia larvas de <i>P. xylostella</i>	23
4.2. Interacción entre los aislamientos NW386 de <i>Z. radicans</i> y NW449 de <i>P. blunckii</i>	23
4.2.1. Mortalidad ocasionada por <i>P. blunckii</i> (NW449).....	24
4.2.2. Mortalidad ocasionada por <i>Z. radicans</i> (NW386).....	25
4.2.3. Larvas muertas por causas no identificadas.....	26
4.3. Interacción entre los aislamientos NW250 de <i>Z. radicans</i> y NW449 de <i>P. blunckii</i>	27
4.3.1. Mortalidad ocasionada por el aislamiento NW449 de <i>P. blunckii</i>	28
4.3.2. Mortalidad ocasionada por <i>Z. radicans</i> (NW250).....	29
4.3.3. Mortalidad ocasionada por los aislamientos NW250 y NW449.....	30
4.3.4. Larvas muertas por causas no identificadas.....	31
V. DISCUSIÓN	32
VI. CONCLUSIÓN	38
VII. LITERATURA CITADA	39

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Proporción de larvas de <i>P. xylostella</i> infectadas con el aislamiento NW449 (<i>P. blunckii</i>) en la interacción con NW386 (<i>Z. radicans</i>).....	25
Figura 2. Proporción de larvas de <i>P. xylostella</i> infectadas con el aislamiento NW386 (<i>Z. radicans</i>) en la interacción con NW449 (<i>P. blunckii</i>).....	26
Figura 3. Proporción de larvas de <i>P. xylostella</i> muertas por causas no identificadas en la interacción entre NW449 (<i>P. blunckii</i>) y NW386 (<i>Z. radicans</i>).....	27
Figura 4. Proporción de larvas de <i>P. xylostella</i> infectadas con el aislamiento NW449 (<i>P. blunckii</i>) en la interacción con NW50 (<i>Z. radicans</i>).....	28
Figura 5. Proporción de larvas de <i>P. xylostella</i> infectadas con el aislamiento NW250 (<i>Z. radicans</i>) en la interacción con NW449 (<i>P. blunckii</i>).....	29
Figura 6. Proporción de larvas de <i>P. xylostella</i> infectadas con ambos aislamientos (NW250 de <i>Z. radicans</i> y NW449 de <i>P. blunckii</i>) en la co-inoculación.....	30
Figura 7. Proporción de larvas de <i>P. xylostella</i> muertas por causas no identificadas en la interacción de NW449 (<i>P. blunckii</i>) y NW250 (<i>Z. radicans</i>).....	31

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Aislamientos de <i>Z. radicans</i> y <i>P. blunckii</i> empleados en esta investigación.....	18
Cuadro 2. Valores de CL ₅₀ estimadas para cada aislamiento.....	23
Cuadro 3. Número de conidios obtenidos por aislamiento en la interacción NW449-NW386.....	24
Cuadro 4. Número de conidios obtenidos por aislamiento en la interacción NW449-NW250.....	28

I. INTRODUCCIÓN

En México el cultivo de brasicáceas es importante ya que se siembran alrededor de 22,698 ha de brócoli y 816 ha de coliflor (SIAP, 2010). Estas especies tienen importancia nacional porque son productos de exportación, generan divisas y son una excelente y constante fuente de empleo (Altamirano *et al.*, 1997; Suárez-Vargas *et al.*, 2006).

A pesar de que las brasicáceas se cultivan en al menos 10 estados en el país, el estado de Guanajuato genera el 70% de la producción nacional (SIAP, 2010). Debido a la importancia del brócoli en este estado, se ha establecido un agrupamiento de industrialización y comercialización de este cultivo y se destina alrededor del 95% a la exportación. Los principales mercados de destino son Estados Unidos de América y otros clientes menores como Japón y algunos países de Europa (Pozo *et al.*, 2003).

La producción y calidad del brócoli es afectada por factores bióticos y abióticos. Entre los primeros se encuentran la incidencia de plagas insectiles, de las cuales las más importantes son la palomilla dorso de diamante, *Plutella xylostella* (Linnaeus), el pulgón de la col *Brevicoryne brassicae* (Linnaeus), el pulgón verde del durazno *Myzus persicae* (Suizer), el pulgón verde opaco de la col *Liphaphis erysimi* Kalténbach, las mosquitas blancas *Bemisia tabaci* (Gennadius) y *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood), el gusano falso medidor de la col *Trichoplusia ni* (Hübner), la mariposita blanca de la col *Leptophobia aripa* (Boisduval), la mosca de la raíz de la col *Hylemia* sp. (Meigen) y la chinche arlequín *Murgantia histrionica* (Hahn) (Ramos, 2000; Rojas, 2006; Bautista, 2006; Anaya y Romero, 1999).

La palomilla dorso de diamante *P. xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) se considera uno de los insectos plaga más importantes para las brasicáceas, ya que las larvas consumen el área fotosintética; sin embargo, el daño más importante es provocado por la presencia de larvas y pupas en las plantas pues reduce la calidad del producto para el mercado de exportación. Su manejo ha ocasionado un incremento en los costos de producción de estos cultivos (Bujanos y Marín, 2005)

debido a que el umbral de acción es de tan solo 0.5 larvas por planta (Maltais *et al.*, 1994). En México esta plaga está catalogada como cuarentenaria, establecido en la NOM-081-FITO-2002, y en el estado de Guanajuato es la plaga más importante en crucíferas (Urzúa *et al.*, 2006).

Para el combate de *P. xylostella* el método más utilizado es el uso de insecticidas organosintéticos, entre los que se encuentran Pirimor (pirimicarb), Folidol (paratión metílico), Confidor 350 (imidacloprid), Sevidan 70 (endosulfán), Ambush 34 (permetrina), Naled 90 (naled), Tracer (spinosad) y Tamarón 600 (metamidofós) (Ramos, 2000). El uso intensivo de estos productos ha ocasionado que el insecto sea resistente y que sus enemigos naturales sean eliminados, además, de que la posibilidad de encontrar residuos químicos en el producto comestible se incrementa (Bujanos y Mejía, 2008).

Como alternativa de manejo se ha utilizado el insecticida microbiano proveniente de la bacteria *Bacillus thuringiensis*, aunque, también se han reportado casos de resistencia a éste (Pérez y Shelton, 1997). Ante tal situación, el control biológico sigue siendo una de las opciones más viables, especialmente cuando una sola especie de insecto es la plaga principal o dominante (Sarraz *et al.*, 2005).

Existen otros enemigos naturales de *P. xylostella* que aún no tienen la difusión y aplicación comercial; por ejemplo, en México (Velasco-Silva *et al.*, 2000) y otras regiones del mundo donde se producen crucíferas (Riethmacher y Kranz, 1994) se han encontrado en condiciones naturales a los hongos entomopatógenos *Pandora blunckii* (Bose&Mehta) y *Zoophthora radicans* (Brefeld) Batko como responsables de epizootias en poblaciones de *P. xylostella*. Estas dos especies pertenecen al orden de los Entomophthorales, el cual incluye cerca de 200 especies patógenas de insectos y presentan un elevado grado de adaptabilidad (Pell *et al.*, 2001).

La presencia de dos especies de hongos entomopatógenos presentes en el mismo sistema, genera la pregunta obligada del tipo de interacción que se podría dar entre dos especies compitiendo por el mismo recurso. En general, las interacciones de patógenos dentro del mismo hospedante son pobremente

entendidas pero es muy probable que tengan efectos importantes sobre la dinámica de población del mismo (Mideo *et al.*, 2008), la estructura de la comunidad (Pedersen y Fenton, 2006), la ecología y las dinámicas de evolución tanto del hospedante como del parásito (Moore, 2002; Thomas *et al.*, 2005). A su vez, el resultado de tales interacciones puede estar influenciado por diversos factores, entre los que destacan la virulencia (Gower and Webster, 2005), la dosis (Staves and Knell, 2010), la relación genética que exista entre los patógenos (Alizon and van Baalen, 2008; Brown *et al.*, 2001) e inclusive el orden de inoculación (Thomas *et al.*, 2003). El estudio de estas interacciones podrá ayudar a comprender estrategias de sobrevivencia, las cuales proporcionarán bases para entender qué pasaría al liberar un aislamiento en un lugar determinado con fines de control biológico, al interactuar con otras especies de hongos ya presentes en el mismo sistema, información que incrementará el conocimiento y entendimiento de la ecología de estos microorganismos.

Las interacciones entre *Z. radicans* y *P. blunckii* representan un sistema importante de estudio tanto económico como ecológico, ya que ambas especies de hongos entomopatógenos coexisten en poblaciones de campo de *P. xylostella*, y es probable que interactúen durante el proceso de infección (Guzmán-Franco *et al.*, 2009).

La información acerca de la interacción entre estas dos especies de hongos es limitada, y sólo se ha reportado a la dosis de inoculación como un factor importante que puede modificar el resultado de esta interacción (Guzmán-Franco *et al.*, 2009). Así mismo, la interacción *in vivo* durante el proceso de infección de ambos patógenos también ha sido estudiada, donde el comportamiento de *Z. radicans* durante el proceso de infección puede ser diferente al resultado final de dicha interacción (Guzmán-Franco *et al.*, 2011), lo cual sugiere que el sistema inmune del insecto también podría tener un papel importante en el resultado de la interacción entre ambas especies de hongos entomopatógenos.

A pesar de existir cierta información acerca de la interacción entre ambas especies de hongos entomopatógenos, el estudio de factores adicionales que podría modificar el resultado de dicha interacción es importante, ya que mientras más

información se obtenga de la interacción de estas dos especies, más elementos se dispondrán para diseñar un programa de manejo microbiano de esta plaga mediante estas dos especies de hongos entomopatógenos. A la fecha, no existe información sobre el efecto del orden de inoculación de dichos patógenos sobre larvas de *P. xylostella*. Con base en esta información, se realizó esta investigación donde se estudió el efecto del orden de inoculación en el resultados de la interacción de aislamientos de *P. blunckii* y *Z. radicans*, seleccionados con base en virulencia y otras cualidades como esporulación en el cadáver y hospedante hacia larvas de *P. xylostella*.

1.1. Objetivo

Estudiar el efecto del orden de inoculación de conidios de *Z. radicans* y *P. blunckii* en la interacción de estos patógenos al infectar larvas de *P. xylostella*.

Dicho objetivo se pretende cumplir mediante los siguientes objetivos específicos:

- Estimar la virulencia relativa de aislamientos de *P. blunckii* hacia larvas de *P. xylostella*.
- Determinar el efecto que podría tener el orden de inoculación de *P. blunckii* y *Z. radicans* al infectar larvas de *P. xylostella*.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos se ubican virtualmente infectando a todos los grupos taxonómicos de insectos y se han desarrollado como una importante estrategia dentro del contexto de manejo integrado de insectos plaga (Roy *et al.*, 2006). Existen más de 700 especies de hongos patógenos de insectos incluidos en aproximadamente 90 géneros, representados en el Reino Mycota (Hajek and Leger, 1994); sin embargo, solamente un pequeño porcentaje de estos son considerados, por su potencial, como agentes de control microbial. Estos se encuentran dentro de los Phyla Zygomycota, Ascomycota y Basidiomycota (Alexopoulos *et al.*, 1999; López y Scorsetti, 2007; Blackwell, 2010).

Dentro de los Zygomycota se encuentra el orden Entomophthorales, donde las especies reportadas son consideradas biotróficas, producen hifas cenocíticas y esporas de resistencia denominadas zygosporas (esporas sexuales) y azygosporas (esporas asexuales), por lo que son capaces de sobrevivir en condiciones desfavorables. Además, durante la invasión producen cuerpos hifales y protoplastos que carecen de pared celular, con lo que evitan ser detectados por el sistema inmune del insecto (Pell *et al.*, 2001); se dispersan en el cuerpo del insecto, obtienen sus nutrientes y ocasionan su muerte del hospedero (Charnley, 2003). Posteriormente, al germinar, producen conidios mucilaginosos que pueden ser primarios, secundarios o terciarios, los cuales son disparados mediante presión hidrostática; algunos géneros como *Zoophthora* y *Neozygites* producen además una estructura llamada capiloconidio.

Existen más de 200 especies de Entomophthorales (clase Zygomycetes) que infectan una amplia variedad de artrópodos, y cada especie puede ser altamente específica para su hospedante (Papierok y Hajek, 1997). Las especies dentro de este orden son mejor conocidas por su habilidad para causar epizootias espectaculares en poblaciones de áfidos, chicharritas, chapulines, moscas, cícadas, larvas de coleópteros y lepidópteros. Sin embargo, estas epizootias causadas

naturalmente, a menudo ocurren de forma tardía para tener valor económico por lo que se ha propuesto la aplicación de inóculo para acelerar el proceso de la enfermedad (Tanada y Kaya, 1993).

Con frecuencia se han estudiado a los Entomophthorales para evaluar el potencial que tienen para controlar insectos plaga, pero la producción a gran escala de la mayoría de estas especies entomopatógenas para su uso como micoinsecticidas no ha sido posible aun, debido principalmente a las dificultades con el crecimiento *in vitro* del hongo y a su estabilidad en campo. A pesar de esto, se están explorando algunos usos alternativos como la manipulación de especies para el control biológico clásico, la inducción de epizootias y control biológico por conservación. Al respecto, se han documentado dos ejemplos de control biológico clásico que involucran asociaciones con hongos entomophthorales. El primer caso lo constituye *Entomophaga maimaiga* (Humber, Shimazu, and Soper) y la palomilla gitana, *Lymantria dispar* (Linnaeus), en EUA (Elkinton *et al.*, 1991; Hajek *et al.*, 1995) y el segundo, el hongo *Z. radicans* y el pulgón *Therioaphis trifolii* (Monell) *f. maculata*, en donde un aislamiento del hongo encontrado en Israel fue liberado en Australia (Pell *et al.* 2001).

2.1.1. *Zoophthora radicans* y *Pandora blunckii* (Zygomycetes: Entomophthorales)

Sólo dos especies de entomophthorales, *Z. radicans* y *P. blunckii*, han sido encontradas infectando a *P. xylostella* (Velasco-Silva *et al.*, 2000; Tomiyama y Aoki, 1982). Sin embargo, existe más información sobre la capacidad infectiva de *Z. radicans* ya que esta especie se ha encontrado naturalmente infectando a otras especies de insectos (Mcguire *et al.*, 1987). Estas especies han demostrado ser agentes potenciales de control microbial para *P. xylostella* (Furlong *et al.*, 1995) ya que, por ejemplo, *Z. radicans* puede infectar larvas y adultos en los 3 a 4 días posteriores a la inoculación (Pell *et al.*, 1993b; Furlong *et al.*, 1995), y *P. blunckii* puede infectar larvas de *P. xylostella* 5 o 6 días posteriores a la inoculación. En ambos casos se ha documentado que no hay efectos visibles de la infección de estas especies entomopatógenas en las larvas hasta pocas horas antes de su muerte, que es cuando el cuerpo cambia de color verde a amarillento (Tomiyama y

Aoki, 1982; Furlong *et al.*, 2000). En infección de adultos, para el caso de *Z. radicans*, no se observan efectos obvios, únicamente que el movimiento de estos es severamente restringido 24 horas previas a la muerte (Furlong *et al.*, 1997).

Una característica importante de estos hongos es la producción de esporas de resistencia debido a que, a pesar de que dichas estructuras pueden sobrevivir por más tiempo, actuarán más lentamente como micoinsecticidas, pues las esporas no estarán disponibles para infectar a nuevos individuos de inmediato (Pell *et al.*, 2001). Algunos aislamientos de *Z. radicans* pueden producir dichas estructuras; éstas tienen una pared gruesa y permanecen dentro del cuerpo del hospedante muerto (Pell *et al.*, 2001). Este atributo es ampliamente variable aún entre aislamientos de la misma especie (Pell *et al.*, 2001; Guzmán-Franco *et al.*, 2009).

En *P. blunckii* no se han encontrado la formación de esporas de resistencia dentro de cadáveres de *P. xylostella* (Tomiyama y Aoki, 1982; Guzmán-Franco, 2005).

2.1.2. Ciclo de infección

Los hongos entomopatógenos producen esporas infectivas (conidios) que se adhieren, germinan bajo condiciones ambientales adecuadas, y penetran la cutícula de su hospedero sin tener que ser ingeridas. No se ha reportado la presencia de toxinas de importancia para la progresión de la infección (Pell *et al.*, 2001); sin embargo, los conidios son metabólicamente muy activos justo antes de germinar, lo cual ocurre inmediatamente después de hacer contacto con su hospedante (Steinhaus, 1949). Una vez dentro del huésped, proliferan mediante estructuras multicelulares (protoplastos, blastosporas, hifas) y se alimentan de sus hospedantes. Finalmente, matan a su hospedero y producen más conidios para su transmisión, o estructuras de reposo para su persistencia en condiciones ambientales desfavorables (Roy *et al.*, 2006). El proceso de infección está fuertemente influenciado por factores bióticos y abióticos; es necesaria una humedad superior al 95% para la germinación y esporulación de conidios, y la velocidad con la que matan puede ser modulada por la temperatura. Su ecología,

fisiología y el ciclo de vida son muy variables, lo que refleja la adaptación para superar las limitaciones ambientales y las defensas del hospedante (Inglis *et al.*, 2001; Pell *et al.*, 2001).

Las especies de Entomophthorales exhiben un proceso continuo de adaptaciones, desde dispersión activa de conidios mediante la descarga producida post-mortem del hospedante, hasta la ausencia de esta dispersión activa en especies de hongos en las que la actividad del hospedante asegura la dispersión de conidios antes de su muerte. Al ser biotróficos, mantienen vivo al hospedante hasta que todos los recursos se agotan, y normalmente su actividad se restringe a hospedantes foliares (Evans, 1989; Pell *et al.*, 2001).

2. 2. Interacciones entre patógenos

Una comunidad es un conjunto de poblaciones de diferentes especies que co-existen e interactúan dentro de una misma área. Las interacciones tradicionalmente son consideradas como directas; es decir, que dos especies participan en una confrontación, como por ejemplo una interacción trófica (uno consume al otro) o competitiva (competencia por interferencia) (Meyling and Hajek, 2010).

Las especies también pueden interactuar entre sí indirectamente cuando dicha interacción está mediada por un tercero; por ejemplo, si dos especies consumen un recurso común pero nunca se encuentran, tendrán una interacción indirecta debido a que una especie reduce la cantidad del recurso disponible para las otras especies (competencia por explotación), en este caso la interacción está mediada por el recurso compartido (Meyling and Hajek, 2010).

Es común encontrar dos o más especies de parásitos o genotipos infectando a su hospedante (Cox, 2001; Read and Taylor, 2001; Moore, 2002; Thomas *et al.*, 2005). En infecciones ocasionadas por más de un patógeno, las interacciones entre patógenos y hospedantes puede finalizar de tal manera que la población de uno o ambos patógenos aumente, uno o ambos sean eliminados, o uno se incremente y el

otro sea eliminado (Cox, 2001). Las interacciones dentro del mismo hospedante son poco entendidas pero es probable que tengan efectos importantes sobre su dinámica poblacional (Mideo *et al.*, 2008), la estructura de su comunidad (Pedersen and Fenton, 2006), la ecología y las dinámicas de evolución tanto del hospedante como del parásito (Moore, 2002; Thomas *et al.*, 2005).

La ocurrencia de múltiples parásitos dentro de un solo hospedante hace que su competencia sea inevitable ya que este representa un recurso limitado (May y Nowak, 1995) y existe una capacidad de carga para la biomasa total de los parásitos que los recursos del hospedero soportarán. Normalmente el crecimiento de los parásitos dentro del huésped será, por lo tanto, denso dependiente y disminuirá a medida que se aproxima a la capacidad de carga (Anderson, 1982; Ebert, 2000). En la comparación de infecciones inter e intraespecíficas, el resultado de la competencia depende de un número de factores, incluyendo el tiempo de inoculación, la temperatura, la dosis y, con mucha importancia, la relación genética e interacción que hay entre los parásitos dentro del hospedero (Staves and Knell, 2010).

La naturaleza de la competencia dentro de un hospedero ha sido descrita como un continuo entre dos extremos: super-infecciones, donde el parásito o patógeno más virulento elimina a aquellos menos virulentos, y las co-infecciones, donde los parásitos difieren un poco en su virulencia y los recursos finales terminan siendo compartidos entre los patógenos (o en su forma más simple, por parásitos explotando diferentes nichos dentro del hospedante por lo que no compiten) (Nowak y May 1994; May y Nowak, 1995).

La competencia entre parásitos dentro del hospedante puede ocurrir mediante tres mecanismos: competencia por explotación, competencia aparente mediada por el sistema inmune y la competencia por interferencia (Read and Taylor, 2001).

2.2.1. Competencia por Explotación

En este tipo de competencia, patógenos de la misma o diferente especie poseen nichos ecológicos superpuestos, y por lo tanto competirán mediante infecciones múltiples para acceder al recurso del hospedero. La competencia por explotación provoca la selección, ya sea para la divergencia de los recursos usados entre organismos (Dayan and Simberloff, 2005) cuando hay alternativas de recursos disponibles, o para generar adaptaciones que mejoren la capacidad de un organismo para adquirir los recursos compartidos cuando no hay alternativas (Abrams, 1987; Mideo, 2009).

2.2.2. Competencia aparente mediada por el sistema inmune

Las respuestas del sistema inmune del hospedero representan un gran desafío para la supervivencia del parásito. Las adaptaciones que hacen los parásitos para tener éxito en la competencia por explotación, podría ser de igual manera ventajosa en aparente competencia; por ejemplo, las estrategias que provocan mayores densidades del parásito podrían asegurar que dicho parásito tenga una mayor capacidad para compartir los recursos del hospedero, y así tener una mayor probabilidad de superar el sistema inmune del mismo (Mideo, 2009). En sistemas de vertebrados, la posibilidad de aumentar el desempeño de una sola especie de parásito puede ocurrir mediante efectos supresivos de la respuesta del sistema inmune del hospedante.

La respuesta inmune provocada por un parásito modifica las condiciones dentro del hospedero, y estos cambios tienen un impacto en la habilidad del hospedero para resistir infecciones subsecuentes provocadas por diferentes especies de parásitos, ya sea por la supresión o la facilitación de infección y crecimiento (Cox, 2001). La respuesta inmune generada por la infección de un parásito también disminuye la probabilidad de que haya una infección subsecuente por otro parásito conespecífico, como se ha visto en experimentos de infecciones secuenciales de esquistosomas en ratones y de malaria en lagartijas (Dumont *et al.*, 2007). Este efecto que limita al competidor para utilizar los recursos del

hospedero podría deberse solamente a una desventaja por la respuesta inmune natural del hospedero; sin embargo, teóricamente es posible que los parásitos evolucionen para manipular esta respuesta inmune en su beneficio (Brown and Grenfell, 2001).

Un ejemplo claro ha sido encontrado en estudios de infecciones subsecuentes de larvas de filarias, donde las larvas inoculadas al inicio, y al convertirse en adultos, fueron capaces de inducir la respuesta inmune del huésped que ataca a estados larvarios a los cuales los adultos son inmunes. De esta manera, la respuesta inmune benefició a los adultos al evitar competencia, y al hospedante de futuras infecciones (Rajakumar *et al.*, 2006).

En las interacciones competitivas entre parásitos (incluyendo explotación, interferencia y aparente competencia), puede ocurrir también ambas cosas, que afecte la dinámica del otro parásito dentro del hospedero y que afecte el sistema inmune del hospedero (Cox, 2001).

2.2.3. Competencia por interferencia

En este tipo de competencia, los parásitos evolucionan estratégicamente para inhibir directamente el crecimiento, reproducción o transmisión de sus competidores, ya sea químicamente, por ejemplo la interacción entre bacterias entomopatógenas que producen bacteriocinas (Massey *et al.*, 2004), o mecánicamente (Mideo, 2009).

Algunas bacteriocinas tienen un rango amplio para matar diferentes especies, sugiriendo que la producción de ésta es una adaptación para la competencia intra e inter específica. Además, experimentos *in vivo* han demostrado que las bacteriocinas determinan el resultado de ambas competencias intra e inter específicas (Kirkup and Riley, 2004; Massey *et al.*, 2004). La producción de las bacteriocinas beneficia a todas las cepas genéticamente relacionadas que comparten el mismo gen inmune dentro de una infección (Mideo, 2009).

2.3. Virulencia

La virulencia es la capacidad para invadir y dañar los tejidos del huésped, y a menudo se mide por una respuesta del huésped a una dosis de inóculo, conocida comúnmente como una concentración letal media CL_{50} (Papierok, 1982). Durante las co-infecciones, la virulencia puede ser afectada por estrategias específicas de los parásitos involucrados (Mideo, 2009), las cuales están determinadas por las propiedades del hospedante incluyendo la respuesta inmune (Graham *et al.* 2005; Margolis y Levin, 2008). A su vez, debido a que la inmunidad puede ser una interacción genotípica específica huésped-parásito, es probable que la virulencia esté determinada por interacciones genéticas específicas entre ambos (Salvaudon *et al.*, 2005; Grech *et al.*, 2006; Lambrechts *et al.*, 2006; Lefèvre *et al.*, 2007).

La virulencia también puede estar influenciada por el área geográfica de los huéspedes y parásitos, ya que las dinámicas co-evolutivas pueden generar que los parásitos sean más virulentos hacia hospedantes que se encuentran en la misma área (Parker, 1985; Manning *et al.*, 1995; McCoy *et al.*, 2002; Thrall *et al.*, 2002; Greischar y Koskella, 2007) o que los hospedantes estén mejor adaptados a los parásitos locales y estos sean menos virulentos (Kaltz *et al.*, 1999). Por otra parte, se cree que la relación genética que existe entre los patógenos que están en competencia, regula el tipo de interacción dentro del hospedero, por lo que habrá un mayor índice de explotación del hospedante, y por tanto un incremento de virulencia (Alizon and van Baalen, 2008); sin embargo, otros autores argumentan que podrían también llevar al decremento de la misma, (May y Nowak, 1995; Cox, 2001). El aumento o disminución de la virulencia depende críticamente de aspectos específicos de comportamiento o actividad del parásito y de la respuesta del hospedante a la infección (super-infección) (Thomas *et al.*, 2003).

La mayoría de los estudios han encontrado que las mezclas de infecciones son más virulentas que las infecciones ocasionadas por un solo parásito (Inglis *et al.*, 1997; Ferguson y Read, 2002; Davies *et al.*, 2002), o que la virulencia obtenida equivale a la del aislamiento más virulento (Hughes y Boomsma, 2004; Inglis *et al.*, 1997; Thomas *et al.*, 2003). Generalmente las infecciones en insectos por más de un patógeno llevan a un incremento en el número de hospedantes muertos

(Jacques and Morris, 1981; Abdel *et al.*, 2010); sin embargo, las interacciones pueden ser más complejas, ya que la virulencia por sí misma no provee una imagen completa de la complejidad de una interacción (Inglis *et al.*, 1997; Thomas *et al.*, 2003; de Roode, 2004). Durante estas mezclas, otras características pueden variar, como por ejemplo la producción de los estados de transmisión puede ser incrementada (Taylor *et al.*, 1998; Davies *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2002) o disminuida (de Roode *et al.*, 2003) e inclusive esta relación también puede depender del orden de inoculación de los patógenos (Thomas *et al.*, 2003). Además, la disminución dentro del hospedero de patógenos que no están relacionados genéticamente (diferentes especies) puede llevar, potencialmente, a una reducción en la cooperación entre patógenos, y por tanto, provocar que haya una disminución en los índices de virulencia ya que habrá una mayor competencia entre los patógenos (Alizon and van Baalen, 2008).

En infecciones múltiples, a pesar de que se encuentre que la virulencia final igualara a la del aislamiento más virulento, esto no implicaría que la virulencia final correspondiera a dicho aislamiento. En algunos estudios de etapas de transmisión se encontró que la infección fue producida por ambos aislamientos (Hodgson *et al.*, 2004; de Roode *et al.*, 2003; Inglis *et al.*, 1999), o inclusive, que la produjo totalmente el aislamiento menos virulento (Hughes y Boomsma, 2004). La mayoría de modelos teóricos asumen que los parásitos virulentos son mejores competidores durante una co-infección, de manera que la competencia entre parásitos seleccionará al que posea un mayor nivel de virulencia (Schorin and Koella, 2003), ya que los parásitos que matan a su hospedero y explotan al huésped rápidamente después de muertos, deberían tener una mayor capacidad de desarrollo cuando están en competencia con otros (Staves and Knell, 2010); además, las características que le ayudarán en la rápida explotación del huésped serán preferidas y seleccionadas con el paso del tiempo (van Baalen and Sabelis, 1995; Gandon *et al.*, 2001). Sin embargo, hay otros aspectos que podrían estar influenciando el efecto de las interacciones *in vivo* de patógenos sobre la selección de la virulencia, tales como las dinámicas dentro del huésped (la acción del sistema inmune y el incremento de la heterogeneidad y la población de los patógenos debido a la co-infección) (Gandon *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 2008) y las características del

patógeno como el tipo de transmisión, el número de etapas de vida y el ciclo de vida (Alizon and van Baalen, 2008). Además, se ha demostrado que la dirección de la selección de la virulencia puede depender también del nivel del comportamiento colectivo expuesto por los competidores, sugiriendo que en ciertas instancias, se podría dar una reducción en la virulencia (Brown *et al.*, 2001).

2.4. Sistema inmune

A menudo, una infección se extiende dentro del cuerpo del hospedante sin reacción obvia por el sistema inmune, incluso cuando la infección podría eventualmente conducir a graves daños (Schmid-Hempel, 2008). A pesar de la ventaja obvia de defenderse de la enfermedad y de la penetración de los parásitos, los hospedantes siguen siendo susceptibles y las respuestas inmunes varían ampliamente entre las especies y las diferentes situaciones. La defensa contra el parasitismo puede basarse en una variedad de mecanismos, incluyendo las defensas por comportamiento (Moore, 2002), la inmunidad por agrupamiento (Anderson and May, 1985) y los cambios de los parámetros en el ciclo de vida (Minchella, 1985). En esta cadena de eventos, la defensa inmune ocupa el último lugar (Schmid-Hempel and Ebert, 2003).

La Inmunidad de los insectos es un área de investigación notable, pero poco se sabe de cómo los insectos reconocen a los hongos y cómo se inician sus respuestas inmunes (Ratcliffe y Rowley, 1979; Butt *et al.*, 1988; Hajek y St. Leger, 1994). Dicha defensa es una condición que puede estar bajo regulación del estrés nutricional (Siva-Jothy and Thompson, 2002; Rantala *et al.*, 2003) y ambiental; por ejemplo, la respuesta inmune podría ser aumentada después de un plazo corto de exposición a un estrés ambiental, mientras que una exposición prolongada podría inhibir la misma respuesta (Goloway and Depledge, 2001; Sorvari *et al.*, 2007).

El sistema inmune es adaptativo (Rosengaus *et al.*, 1999) y es capaz de responder efectivamente contra invasores extraños, como lo son parásitos y patógenos, mediante encapsulación celular, péptidos antimicrobiales, cascada de profenoloxidasa y nodulación por fagocitosis (Wilson, 2005). Por otra parte, un

insecto podría adquirir una ventaja selectiva si es capaz de detectar el riesgo de ataque de un hongo entomopatógeno y modificar su comportamiento evitando el contacto y la transmisión entre los insectos hospederos, o por medio de una respuesta post-contacto como la limpieza (Chouvenc *et al.*, 2008). A pesar de que los hongos entomopatógenos tienen la habilidad de adherirse firmemente a la superficie del hospedero y penetrar directamente la cutícula para establecer la infección (St. Leger *et al.*, 1996), sólo pocos insectos tienen la capacidad de evadir a sus patógenos a través de la limpieza, por lo que el integumento quitinoso esclerotizado de estos hospederos forma una eficiente barrera primaria contra la mayoría de los microorganismos.

Una vez sobre la cutícula, antes de la emergencia del tubo germinativo, los conidios se fijan por la acción conjunta de fuerzas hidrofóbicas, secreción de mucilago y enzimas (Boucias *et al.*, 1998); y ya fijos, la penetración de la cutícula del hospedero se logra por la combinación de medios enzimáticos y mecánicos (Butt *et al.*, 1998). Durante este proceso se ha demostrado, mediante estudios de eventos bioquímicos y fisiológicos de hongos en el hemocelo, que existe una provocación y supresión de la respuesta del sistema inmune del hospedero (Gillespie *et al.*, 1997). Así mismo, se ha encontrado que los componentes del hospedante activados por los conidios en la superficie cuticular o por los metabolitos del hongo liberados durante las fases tempranas de germinación, podrían ser responsables de la supresión de la germinación *in vivo* (Boucias and Latge, 1988). También se ha establecido que basta con la sola abrasión de la cutícula para inducir un aumento en los niveles de actividad antimicrobial de la matriz cuticular y del cuerpo graso circundantes, por lo que el exoesqueleto del insecto parece participar activamente en la respuesta inmune (Brey *et al.*, 1993). Otra reacción de defensa que se ha observado es la melanización en la cutícula localizada alrededor del punto de penetración de la hifa del hongo; sin embargo, es poco probable que las lesiones cuticulares causadas por la invasión de las células del hongo, opuestamente al daño físico, generen una respuesta inmune detectable (Wraight *et al.*, 1990).

Una vez que el hongo ha llegado al hemocelo, generalmente hay dos mecanismos de defensa fundamentales en los insectos, los cuales son la respuesta humoral y celular (Ratcliffe y Rowley, 1979; Butt *et al.*, 1988; Hajek y St. Leger,

1994). Uno de los sistemas de activación humoral mejor estudiados es la cascada de activación de profenoloxidasas (Söderhall y Smith, 1986), donde algunos componentes de los hongos tales como β -1,3 glucano o quitina, pueden iniciar la secuencia de activación de dicha cascada (Kanost *et al.*, 1990). La respuesta celular incluye fagocitosis, formación de nódulos y encapsulación (Gillespie *et al.*, 1997), y está mediada por los hemocitos que son los responsables de identificar a la entidad desconocida en la hemolinfa y, en algunos casos, de forma activa perseguir y encapsular al objeto extraño (Gunnarsson y Lackie, 1985; Hou y Chang, 1985).

En algunos casos, la respuesta celular ha sido reportada en hospedantes antes de que la invasión del hongo alcance el hemocelo. Por ejemplo, en infecciones de *S. gregaria* con *Metarhizium anisopliae* (Metsch.), los hemocitos circulan y se agrupan en sitios sobre la superficie interna del integumento donde la penetración del hongo tomará lugar, lo cual se cree es consecuencia de la producción de compuestos solubles generados por el hongo o por la interacción hongo-hospedante, que estimula la migración quimotáctica positiva y el agrupamiento de los hemocitos (Gunnarsson, 1998).

Frecuentemente se ha considerado que el resultado de una infección depende de la resistencia del huésped y la virulencia del parásito, donde la defensa inmune del hospedero podría ser muy débil para responder, o el parásito muy virulento para que la respuesta se observara. Sin embargo, los parásitos no simplemente resisten la defensa inmune del hospedero, por el contrario, los parásitos activamente evaden o manipulan el sistema inmunológico para su propio beneficio (Schmid-Hempel, 2008). Existen evidencias que indican que la superación de la defensa celular en insectos durante la micosis implica la mediación de metabolitos secundarios, tales como las beauvericinas, ciclosporinas y destruccinas (Huxhman *et al.*, 1989; Cavelier *et al.*, 1998), e incluso algunos hongos pueden producir toxinas que aumenten su virulencia (Papierok and Coremans-Pelseneer, 1980).

Con respecto a los Entomophthorales, además de tener preferencias por el huésped, poseen un conjunto de factores que pueden estar involucrados en el éxito de la infección y en el crecimiento dentro del insecto hospedero tales como la habilidad para adherirse, germinar y penetrar en la cutícula del insecto, la utilización

de los componentes de la hemolinfa para el crecimiento y la evasión de la respuesta inmune del insecto (Hajek y St. Leger, 1994). En estos hongos, la respuesta celular suele limitarse frecuentemente a la melanización cuticular en los sitios de penetración del hongo y no se observa una respuesta mediada por hemocitos (Brobyn y Wilding, 1977; Brey *et al.*, 1986; Butt *et al.*, 1988), ya que la mayoría de Entomophthorales se multiplican durante las primeras etapas de la colonización del huésped como protoplastos sin pared (MacLeod *et al.*, 1980; Kobayashi *et al.*, 1984; Keller, 1997) y por lo tanto, no atraen a los hemocitos (Dunphy y Nolan, 1982); sin embargo, especies de *Entomophaga*, las cuales colonizan el hemocele en forma de protoplastos son eficientemente encapsulados y fagocitados por los hemocitos de la palomilla gitana (*Lymantria dispar*) (Butt and Humber, 1989).

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Cría de *Plutella xylostella*

La cría de *P. xylostella*, proveniente del estado de Guanajuato, México, se mantuvo en una cámara de cría con un fotoperiodo 16:8, luz:oscuridad, y una temperatura de 22 °C. El insecto se alimentó con plantas de brócoli variedad WALTMAN.

3.2. Aislamientos de hongos

Los experimentos se llevaron a cabo con 2 aislamientos de *Z. radicans* y cinco aislamientos de *P. blunckii* (cuadro 1). Todos los aislamientos están conservados en nitrógeno líquido en las colecciones del Laboratorio de Patología de Insectos del Colegio de Postgraduados, México, y en la Estación Experimental de Rothamsted, Inglaterra.

Cuadro 1. Aislamientos de *Z. radicans* y *P. blunckii* empleados en esta investigación. Todos los aislamientos están resguardados en las colecciones de la Estación Experimental de Rothamsted, Inglaterra y el laboratorio de Patología de Insectos, Colegio de Postgraduados, México.

Especie	Aislamiento	Hospedante	Origen geográfico
<i>Z. radicans</i>	NW386	<i>P. xylostella</i>	México
<i>Z. radicans</i>	NW250	<i>P. xylostella</i>	Malasia
<i>P. blunckii</i>	NW449	<i>P. xylostella</i>	México
<i>P. blunckii</i>	NW381	<i>P. xylostella</i>	México
<i>P. blunckii</i>	NW454	<i>P. xylostella</i>	México
<i>P. blunckii</i>	NW450	<i>P. xylostella</i>	México
<i>P. blunckii</i>	NW453	<i>P. xylostella</i>	México

3.3. Recuperación de los aislamientos del nitrógeno líquido (NL)

Para recuperar los aislamientos del NL, un tubo criogénico se removió y se transfirió a baño maría por cinco minutos a 37-40°C. Inmediatamente después, el tubo se colocó en alcohol al 95% durante dos minutos y se transfirió a una campana de flujo laminar. El tubo se abrió, el micelio se retiró mediante un asa bacteriológica y se distribuyó en tres o cuatro cajas de Petri con medio SEMA (Agar Dextrosa Sabouraud suplementado con leche y yema de huevo).

3.4. Estimación de la virulencia relativa de aislamientos de *P. blunckii* hacia larvas de *P. xylostella*

El objetivo de este experimento fue detectar si existen diferencias en virulencia entre los aislamientos de *P. blunckii* (cuadro 1) hacia *P. xylostella*.

Los métodos para cada aislamiento fueron los mismos. Diferentes grupos de larvas se inocularon con diferentes concentraciones de cada aislamiento. Para la inoculación, se tomaron 5 círculos del hongo (9 mm de diámetro) y se colocaron sobre papel filtro humedecido en la tapa de una caja de Petri de 55 mm de diámetro. Se prepararon seis cajas por cada aislamiento para los diferentes tiempos de exposición al hongo (5', 10', 25', 35', 45' y 60'). También se incluyó una caja por cada aislamiento del hongo, solamente con papel filtro húmedo como testigo. Las cajas de Petri con los círculos de hongos fueron expuestas a una humedad relativa alta y se incubaron a 22 °C en oscuridad total por 18 horas antes de la realización de los bioensayos.

Posteriormente, grupos de 15 larvas del tercer ínstar temprano se colocaron en un círculo de hoja de brócoli de aproximadamente 40 mm de diámetro, fijadas previamente con 5 ml de agua-agar al 2% en la base de una caja de Petri de 55 mm de diámetro. Después de esto, un cubreobjetos de 10 mm de diámetro se puso en el centro de cada hoja de brócoli.

Finalmente para la inoculación, las tapas de las cajas Petri con el hongo, previamente incubadas durante 18 horas, se colocaron sobre las bases de las cajas conteniendo las larvas. Para obtener diferentes concentraciones del hongo, los grupos de larvas fueron expuestos a los diferentes intervalos de tiempo mencionados anteriormente. Los grupos de larvas utilizados como testigos se mantuvieron por sesenta minutos bajo las mismas condiciones pero sin recibir inóculo alguno. Transcurrido los diferentes tiempos de inoculación, cada grupo de larvas se transfirió a cajas ventiladas de polietileno de 500 mL, con una hoja de brócoli como alimento. El experimento se incubó a 22 °C en oscuridad total. La infección se registró diariamente por 5 días. Todo el experimento se repitió en 3 diferentes ocasiones.

El experimento se realizó bajo un diseño completamente al azar, y los resultados se analizaron mediante un análisis Probit de modelos paralelos. Antes de comparar la virulencia entre aislamientos, se observó si los datos de cada repetición se podían combinar en un solo grupo de resultados. El análisis consistió en aplicar tres tipos de modelos. Primero, el ajuste de todos los datos a una sola línea Probit; segundo, la diferencia entre las ordenadas al origen de los datos de cada repetición y tercero la diferencia entre pendientes de cada grupo de datos. El mejor modelo se seleccionó en cada caso con base en pruebas parciales de F. Las concentraciones que causaron el 50% de mortalidad se estimaron a partir del mejor modelo. Los límites de confianza se calcularon de acuerdo al teorema de Fieller (Fieller, 1944).

Una vez evaluada la similitud entre repeticiones, se comparó la respuesta entre aislamientos mediante el mismo tipo de análisis descrito anteriormente. Todos los análisis se realizaron mediante el programa GenStat Ver. 8.0 (Payne *et al.*, 2005).

3.5. Efecto del orden de inoculación en la interacción de *P. blunckii* y *Z. radicans* en larvas de *P. xylostella*

Con base en los resultados de virulencia de *P. blunckii* (Sección 3.4) y los de *Z. radicans* (datos no publicados), se seleccionaron los aislamientos NW250 y NW386 de *Z. radicans* y el NW449 de *P. blunckii* para este experimento.

El objetivo de este experimento fue conocer el probable efecto del orden de inoculación en el resultado de la interacción entre *P. blunckii* y *Z. radicans*. Para esto, se tuvieron 2 combinaciones de aislamientos NW250-NW449 y NW386-NW449, y dos órdenes de inoculación de cada una de estas combinaciones, es decir, tratamientos donde un grupo de larvas se inoculó primero con el aislamiento de *Z. radicans* y posteriormente con el aislamiento de *P. blunckii*, y viceversa.

La metodología fue la misma para cada combinación de aislamientos y se describe a continuación. Empleando la misma metodología descrita en la sección 3.4, dos grupos de 15 larvas de *P. xylostella* se inocularon durante 60 minutos con conidios de *Z. radicans*. De éstos dos grupos, uno de ellos fue nuevamente inoculado pero con conidios de *P. blunckii* por otros 60 minutos. El segundo grupo inoculado con *Z. radicans* sirvió como testigo positivo para este hongo. Simultáneamente, un tercer grupo de larvas fue inoculado únicamente con conidios de *P. blunckii*, el cual sirvió como testigo positivo de éste. Un cuarto grupo de larvas fue mantenido bajo las mismas condiciones de inoculación, pero sin recibir conidios de ninguna especie durante el mismo tiempo que tuvo el tratamiento que se inoculó con las dos especies de hongo, y se consideró a este tratamiento como testigo absoluto. Empleando el mismo número de grupos de larvas de *P. xylostella*, todo el procedimiento descrito anteriormente se volvió a realizar, pero alternando el orden de inoculación, es decir inoculando primero *P. blunckii* y posteriormente *Z. radicans*. En cada una de las inoculaciones se colocó junto con las larvas, un cubreobjetos circular de 10 mm de diámetro para estimar la concentración de conidios.

Después de las inoculaciones, cada grupo de larvas se transfirió a recipientes ventilados de polietileno de 500 mL de capacidad, con trozos de hoja de brócoli, y se incubaron a 22° C en total oscuridad. La mortalidad fue registrada diariamente por cinco días. Durante el registro de mortalidad, todas las larvas fueron clasificadas en una de las siguientes categorías: viva, infectada por *Z. radicans*, infectada por *P. blunckii*, infectada por ambos patógenos y muerta por causas no identificadas. Para identificar las causas de muerte, las larvas muertas fueron colocadas individualmente en la base de una caja de Petri de 50 mm de diámetro conteniendo papel filtro estéril, humedecido con agua destilada estéril. Las cajas de Petri se incubaron invertidas a la misma temperatura de incubación durante 48 horas. La

posición invertida permitió colectar los conidios disparados por los cadáveres de larvas en cubreobjetos colocados en la base de las cajas de Petri. Posteriormente, todos los cubreobjetos fueron fijados con lactofenol azul de algodón al 10%, en un portaobjetos. La presencia o ausencia de conidios, así como su identidad fue registrada, con ayuda de un microscopio, mediante la morfología de los conidios. En esta fase, no se cuantificó las cantidades de conidios.

De manera simultánea, también se evaluó la presencia de esporas de resistencia en los cadáveres. Los cinco tratamientos en cada orden de inoculación (10 tratamientos) y en cada combinación de aislamientos (2 combinaciones) fueron realizados el mismo día y el experimento completo fue repetido en tres ocasiones diferentes.

3.5.1. Análisis estadístico

Cada combinación de aislamientos fue analizado de manera independiente. Los datos de cada combinación, con sus dos órdenes de inoculación, fueron analizados mediante regresión logística (asumiendo una distribución binomial) con cada causa de muerte como una variable respuesta, ya sea mortalidad ocasionada por *Z. radicans*, por *P. blunckii*, por ambos patógenos o por causas no determinadas. El número de larvas muertas fue una proporción del total de larvas evaluadas. Cuando se analizó la mortalidad debido a un aislamiento inoculado, solo, o en combinación con otro aislamiento, únicamente los datos de tratamientos donde un aislamiento en específico se inoculó fueron incluidos en el análisis, por lo que el número de datos y los grados de libertad fueron diferentes dependiendo de la variable analizada. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa GenStat ver. 8.0 (Payne *et al.*, 2005).

IV. RESULTADOS

4.1. Virulencia de aislamientos de *P. blunckii* hacia larvas de *P. xylostella*

El análisis Probit de modelos paralelos no encontró diferencias entre las ordenadas al origen de cada línea Probit generada para cada aislamiento ($F_{4,80}=1.87$, $P=0.124$), ni entre las pendientes ($F_{4,80}=0.18$, $P=951$). Lo que sugieren que la virulencia de los diferentes aislamientos hacia larvas de *P. xylostella* es similar.

De acuerdo con las CL_{50} obtenidas del análisis (cuadro 2), se observa que la virulencia del aislamiento NW449 fue la mayor. A pesar de que esta diferencia no fue estadísticamente significativa, este aislamiento fue seleccionado para continuar con los experimentos de interacción inter-específica.

Cuadro 2. Valores de CL_{50} estimadas para cada aislamiento. LFI=Límite Fiducial Inferior, LFS=Límite Fiducial Superior, CL=Concentración Letal.

Aislamiento	CL_{50} (con/mm ²)	LFI	LFS	O. Origen	Pendiente
NW449	497	173.2	3356	-1.683	0.5846
NW381	2374	296.4	1030421	“	“
NW454	3591	430	1802412	“	“
NW450	4358	685.8	884481	“	“
NW453	5183	581.7	3234786	“	“

4.2. Interacción entre los aislamientos NW386 de *Z. radicans* y NW449 de *P. blunckii*

La concentración de conidios por mm² de cada aislamiento en cada uno de los tratamientos, se muestra en el cuadro 3. En los tratamientos donde se inocularon ambas especies, la concentración de *P. blunckii* fue mayor comparada con *Z. radicans*; sin embargo, esta diferencia fue consistente en ambos órdenes de

inoculación, por lo que se considera que este factor no tuvo un efecto en los resultados.

Cuadro 3. Número de conidios obtenidos por aislamiento en la interacción NW449-NW386.

Tratamiento	Conidios/mm ²
386	45.33
449	209.33
386+449	19 +188.66
386	48
449	303
449+386	165.33 + 16

Se presentan los resultados de infección para cada variable por separado, infección por *P. blunckii*, *Z. radicans* y por causas no determinadas. No se encontró ninguna larva infectada por ambas especies de hongos.

4.2.1. Mortalidad ocasionada por *P. blunckii* (NW449)

No se encontraron diferencias entre las repeticiones ($\chi^2_2= 1.34$, $P=0.263$), por lo que todos los datos fueron combinadas para la comparación entre tratamientos. La proporción de larvas infectadas por *P. blunckii* fue significativamente más alta en el tratamiento donde únicamente se inoculó *P. blunckii* comparado con el tratamiento donde se inoculó tanto *P. blunckii* como *Z. radicans* ($\chi^2_1= 15.35$, $P<0.001$) (Fig.1). Dicha diferencia no tuvo un efecto significativo en el orden de inoculación entre ambos aislamientos ($\chi^2_1= 0.15$, $P=0.696$).

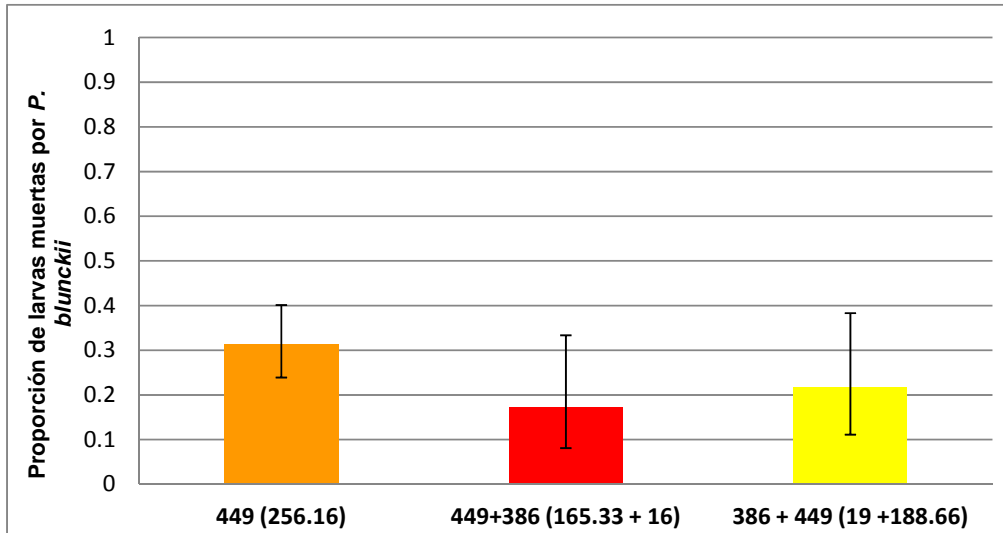


Figura 1. Proporción de larvas de *P. xylostella* infectadas con el aislamiento NW449 (*P. blunckii*) en la interacción con NW386 (*Z. radicans*), donde se observa la infección causada cuando se inoculó solamente a NW449 (primera columna), cuando este fue inoculado primero (segunda columna) y cuando NW449 fue inoculado después de NW386 (tercera columna). Las barras de error representan intervalos de confianza (95%) transformadas a partir de la escala logística. Los números que están entre paréntesis representan la concentración promedio de conidios inoculados (conidios/mm²).

4.2.2. Mortalidad ocasionada por *Z. radicans* (NW386)

No se encontraron diferencias entre las repeticiones ($\chi^2_2 = 1.02$, $P = 0.361$) por lo que los datos fueron combinados para las siguientes comparaciones. La proporción de larvas infectadas por *Z. radicans* fue significativamente mayor en el tratamiento donde únicamente se inoculó *Z. radicans* en comparación con el tratamiento donde se inoculó *Z. radicans* y *P. blunckii* (Fig. 2) ($\chi^2_1 = 12.53$, $P < 0.001$). Sin embargo, ésta diferencia entre ambas proporciones fue afectada significativamente por el orden de inoculación ($\chi^2_1 = 5.55$, $P = 0.019$), ya que al inocular primero *P. blunckii*, la proporción de larvas infectadas por *Z. radicans* fue menor que cuando las larvas fueron inoculadas primero con *Z. radicans* (Fig. 2).

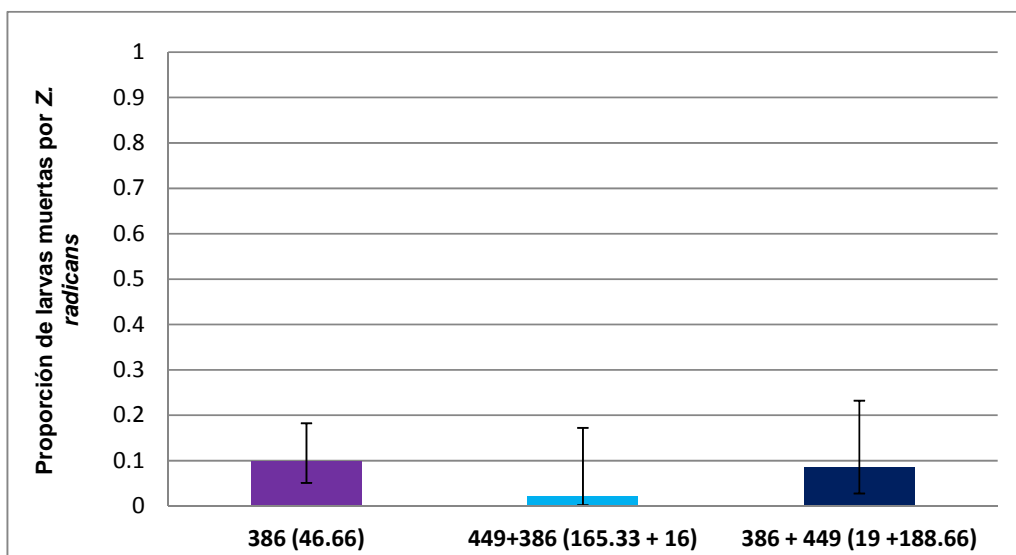


Figura 2. Proporción de larvas de *P. xylostella* infectadas con el aislamiento NW386 (*Z. radicans*) en la interacción con NW449 (*P. blunckii*), donde se observa la infección causada cuando se inoculó solamente a NW386 (primera columna), cuando éste fue inoculado después de NW449 (segunda columna) y cuando NW386 fue inoculado primero (tercera columna). Las barras de error representan intervalos de confianza (95%) transformados a partir de la escala logística. Los números que están entre paréntesis representan la concentración de conidios inoculados (conidios/mm²).

4.2.3. Larvas muertas por causas no identificadas

En todos los tratamientos se obtuvo una pequeña proporción de larvas muertas por causas no identificadas, pues no se encontraron conidios o esporas de resistencia en los cadáveres o en los cubreobjetos utilizados. Dicha proporción fue similar entre las repeticiones ($F_{2,10}=1.08$, $P= 0.375$). Así mismo, esta proporción fue similar en todos los tratamientos ($F_{2,10}= 0.06$, $P= 0.946$) y el orden de inoculación no afectó esta proporción ($F_{2,10}= 0.50$, $P= 0.623$) (Fig. 3).

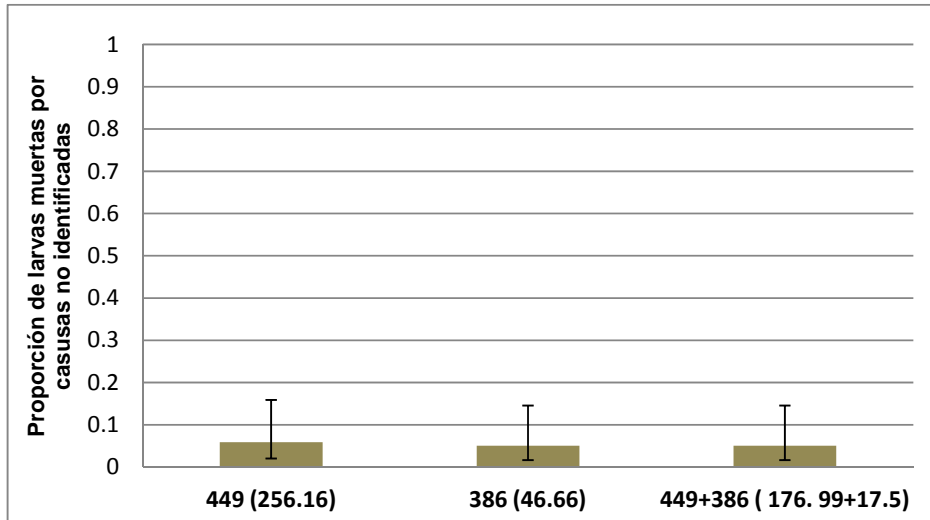


Figura 3. Proporción de larvas de *P. xylostella* muertas por causas no identificadas en la interacción entre NW449 (*P. blunckii*) y NW386 (*Z. radicans*), donde se observa la proporción de larvas muertas en donde se inoculó solamente a NW449 (primera columna), en donde se inoculó solamente a NW386 (segunda columna) y en donde se inocularon a ambos patógenos (NW449 y NW386) (tercera columna). Las barras de error representan intervalos de confianza (95%) transformados a partir de la escala logística. Los números que están entre paréntesis representan la concentración de conidios inoculados (conidios/mm²).

4.3. Interacción entre los aislamientos NW250 de *Z. radicans* y NW449 de *P. blunckii*

La concentración de conidios inoculada por mm² en cada uno de los tratamientos se muestra en el cuadro 4. En los tratamientos donde se inocularon ambas especies, la concentración de *P. blunckii* fue menor comparada con *Z. radicans*; sin embargo, esta diferencia fue consistente en ambos órdenes de inoculación, por lo que se considera que este factor no tuvo un efecto en los resultados.

Cuadro 4. Número de conidios obtenidos por aislamiento en la interacción NW449-NW250.

Tratamiento	Conidios/mm ²
250	213
449	277
250+449	244 + 66.33
250	321
449	296
449+250	145 + 435

4.3.1. Mortalidad ocasionada por el aislamiento NW449 de *P. blunckii*

No se encontraron diferencias entre las repeticiones ($\chi^2_2 = 0.46$, $P=0.633$), por lo que todos los datos fueron combinados para la comparación entre tratamientos. La proporción de larvas infectadas por *P. blunckii* no fue significativamente diferente entre los tratamientos donde únicamente se inoculó *P. blunckii* y donde se inocularon *P. blunckii* más *Z. radicans* ($\chi^2_1 = 3.72$, $P=0.054$) (Fig. 4). Sin embargo, la proporción de larvas infectadas por *P. blunckii* fue mucho mayor cuando se inoculó primero *Z. radicans* y después *P. blunckii* que viceversa ($\chi^2_1 = 18.24$, $P<0.001$) (Fig. 4).

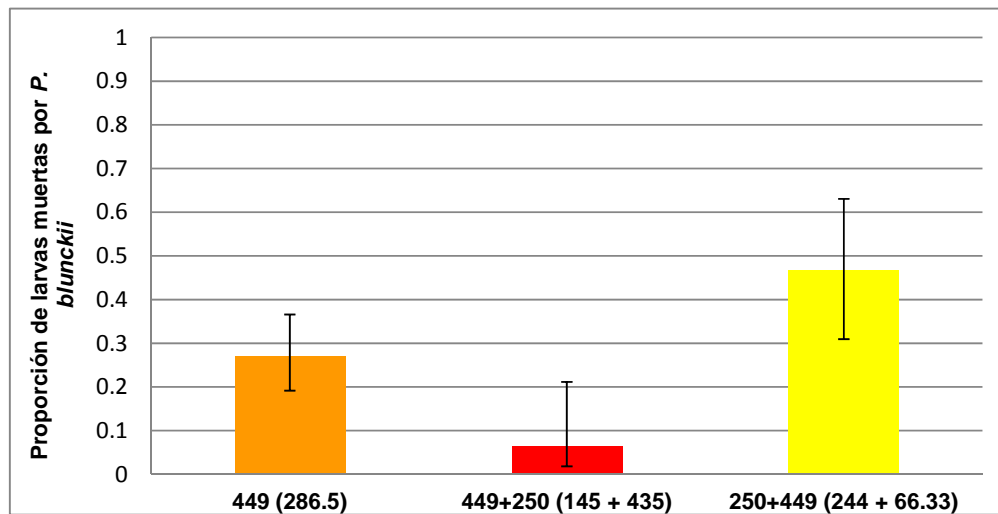


Figura 4. Proporción de larvas de *P. xylostella* infectadas con el aislamiento NW449 (*P. blunckii*) en la interacción con NW50 (*Z. radicans*), donde se observa la infección causada cuando se inoculó solamente a NW449 (primera columna), cuando éste fue

inoculado primero (segunda columna) y cuando NW449 fue inoculado después de NW250 (tercera columna). Las barras de error representan intervalos de confianza (95%) transformados a partir de la escala logística. Los números que están entre paréntesis representan la concentración de conidios inoculados (conidios/mm²).

4.3.2. Mortalidad ocasionada por *Z. radicans* (NW250)

No hubo entre los datos de las diferentes repeticiones ($\chi^2_2 = 0.43$, $P = 0.649$), por lo que los resultados fueron combinados para las comparaciones entre tratamientos. La proporción de larvas infectadas por *Z. radicans* fue significativamente mayor cuando se inoculó únicamente *Z. radicans* en comparación con las larvas donde se inocularon *Z. radicans* más *P. blunckii* ($\chi^2_1 = 10.93$, $P < 0.001$) (Fig. 5). Esta diferencia tuvo un efecto significativo cuando el orden de inoculación fue modificado ($\chi^2_1 = 5.50$, $P = 0.019$), de manera que la mortalidad ocasionada por *Z. radicans* fue aún más reducida al ser inoculado primero *Z. radicans* y después *P. blunckii* que viceversa (Fig. 5).

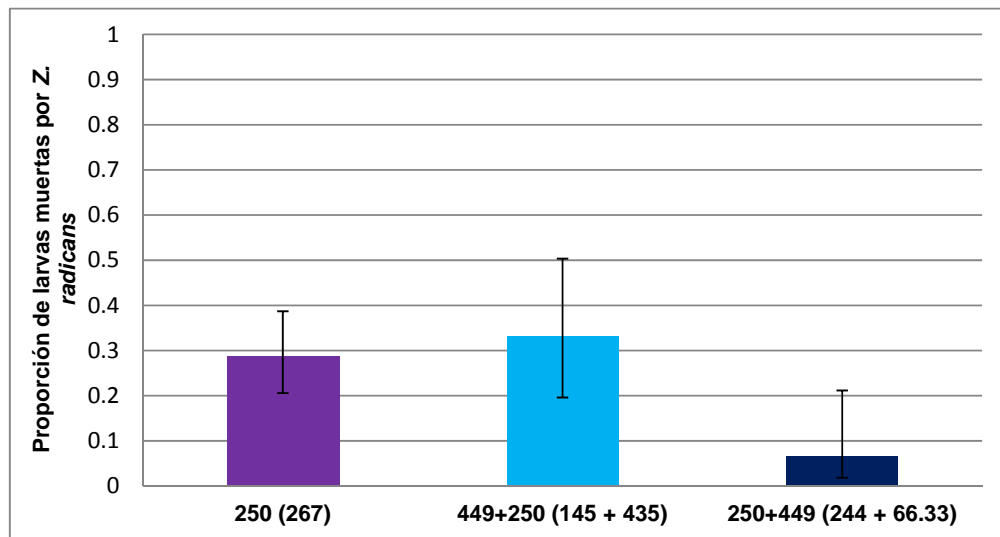


Figura 5. Proporción de larvas de *P. xylostella* infectadas con el aislamiento NW250 (*Z. radicans*) en la interacción con NW449 (*P. blunckii*), donde se observa la infección causada cuando se inoculó solamente a NW250 (primera columna), cuando este fue inoculado después de NW449 (segunda columna) y cuando NW250 fue inoculado primero (tercera columna). Las barras de error representan intervalos de confianza (95%) transformados a partir de la escala logística. Los números que están entre paréntesis representan la concentración de conidios inoculados (conidios/mm²).

4.3.3. Mortalidad ocasionada por los aislamientos NW250 y NW449

No se encontraron diferencias significativas entre las repeticiones ($X^2_2 = 1.60$, $P = 0.201$). Solamente se obtuvieron larvas infectadas por ambos patógenos (NW250 y NW449) en donde se inoculó primero a *P. blunckii* y después a *Z. radicans* ($X^2_2 = 12.07$, $P < 0.001$) (Fig. 6), lo que demuestra que el orden de inoculación tuvo una gran influencia en el resultado de dicha interacción ($X^2_1 = 14.35$, $P < 0.001$).

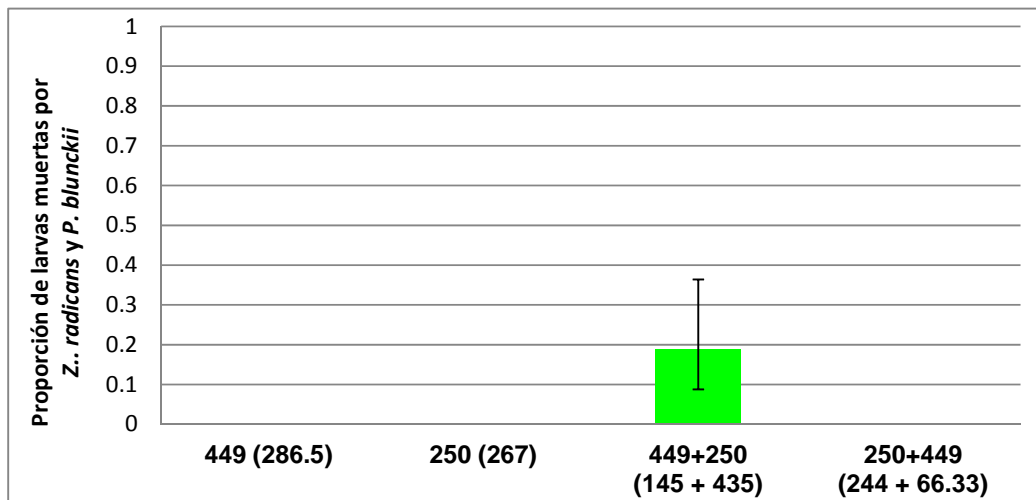


Figura 6. Proporción de larvas de *P. xylostella* infectadas con ambos aislamientos (NW250 de *Z. radicans* y NW449 de *P. blunckii*) en la co-inoculación, donde se observa que solamente cuando NW449 se inoculó primero se obtuvieron larvas infectadas por ambos patógenos. Las barras de error representan intervalos de confianza (95%) transformados a partir de la escala logística. Los números que están entre paréntesis representan la concentración de conidios inoculados (conidios/mm²).

4.3.4. Larvas muertas por causas no identificadas

La proporción de larvas muertas por causas no identificadas fue similar entre repeticiones ($F_{2,10}=0.05$, $P=0.947$) y tratamientos ($F_{2,10}= 0.39$, $P= 0.676$), y no fue afectada por el orden de inoculación ($F_{1,10}= 0.87$, $P= 0.351$) (Fig. 7).

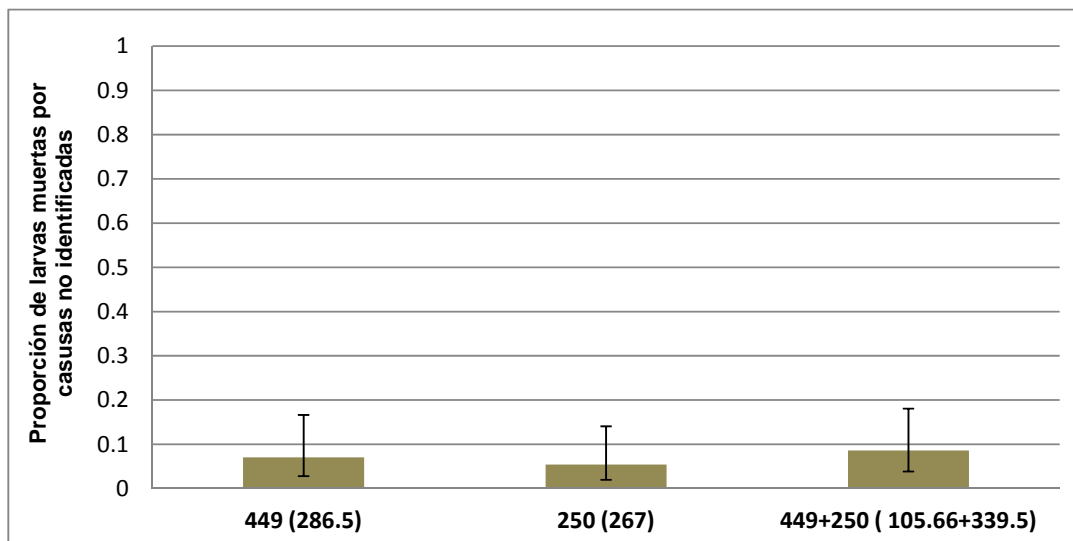


Figura 7. Proporción de larvas de *P. xylostella* muertas por causas no identificadas en la interacción de NW449 (*P. blunckii*) y NW250 (*Z. radicans*), donde se observa la proporción de larvas muertas en donde se inoculó solamente a NW449 (primera columna), en donde se inoculó solamente a NW250 (segunda columna) y en donde se inocularon a ambos patógenos (NW449 y NW250) (tercera columna). Las barras de error representan intervalos de confianza (95%) transformados a partir de la escala logística. Los números que están entre paréntesis representan la concentración de conidios inoculados (conidios/mm²).

V. DISCUSIÓN

La virulencia de los aislamientos de *P. blunckii* hacia larvas de *P. xylostella* fue similar, lo cual podría ser causa de que todos provienen de la misma zona geográfica y hospedante. Sin embargo, es interesante mencionar que los resultados que se obtuvieron en este trabajo no fueron similares a los obtenidos en un estudio anterior, en donde emplearon los mismos aislamientos pero una población de *P. xylostella* originaria de Filipinas (Guzmán-Franco, 2005), siendo esta última población mucho más susceptible. Esta diferencia pudo deberse a la relación específica entre el sistema inmune del insecto utilizado (población mexicana) y la capacidad del patógeno para evadirlo, pues la virulencia está determinada, entre otras cosas, por las propiedades del hospedante, como lo es la respuesta inmune (Graham *et al.* 2005, Margolis y Levin, 2008). De esta manera, cuando patógenos y hospedantes son de la misma zona geográfica puede suceder cualquiera de las siguientes situaciones: que los patógenos estén mejor adaptados a sus hospedantes (Parker, 1985; Animado 1989; Manning *et al.*, 1995; McCoy *et al.*, 2002; Thrall *et al.*, 2002; Greischar y Koskella, 2007), o bien, que los hospederos estén mejor adaptados a sus patógenos (Kaltz *et al.*, 1999). Por tal motivo, suponemos que la población del insecto utilizado está mejor adaptada a los aislamientos probados mediante un proceso de co-evolución, pues el origen geográfico de ambos es México.

Un ejemplo clásico donde se ha observado una disminución de la virulencia por el proceso de co-evolución es el de la liberación de un virus myxoma para controlar conejos en Australia y debido a la fuerte presión de selección (Fenner and Fantini, 1999) la resistencia de los conejos aumentó con el paso del tiempo. Esto último indica que las interacciones pueden ser modificadas no sólo por los aislamientos, sino también por el origen de la población de los insectos utilizados.

La proporción total de larvas infectadas obtenidas en la co-inoculación entre NW386 y NW449 fue menor a la obtenida en comparación con los tratamientos donde se inocularon los patógenos de manera individual; esto sugiere que podría existir antagonismo entre estos aislamientos, fenómeno previamente reportado por

otros autores y que señala una competencia por los recursos compartidos (Guzmán-Franco *et al.*, 2009).

La mortalidad de *P. blunckii* fue mayor a la obtenida por *Z. radicans* (NW386) (Figuras 1 y 2), sin embargo, esto podría estar influenciado por el mayor número de conidios inoculados de *P. blunckii* (cuadro 3).

El orden de inoculación tuvo un efecto significativo únicamente para NW386 (Fig. 2) y no para NW449 (Fig. 1), lo que significa que la reducción en el número de larvas infectadas por NW449, al competir con NW386, fue consistente e independiente del orden de inoculación, lo que probablemente sea consecuencia de la mayor concentración de NW449 comparado con NW386 en ambos órdenes de inoculación. Por otro lado, la reducción en el número de larvas infectadas por NW386, al competir con NW449, fue mucho más drástica al ser inoculado primero NW449, ya que al inocular primero NW386 el número de larvas infectadas por este aislamiento fue mayor comparado cuando se inoculó primero NW449; este resultado sugiere cierto grado de competitividad por parte de NW386 quien pudo infectar más larvas al ser inoculado primero, a pesar de estar en desventaja numérica (concentración) en comparación con NW449. Resultados similares han sido obtenidos en la interacción de dos clones de malaria (*Plasmodium chabaudi*) en ratones, donde observaron que cuando un clon se inyectó primero no tuvo que competir, a diferencia de cuando ambos se inyectaron en el mismo día, o uno se inyectó varios días después de su competidor (de Roode *et al.*, 2005).

En la combinación NW250 y NW449, la proporción de larvas infectadas con NW449 fue similar en los tratamientos donde se inoculó únicamente NW449 comparado con los tratamientos donde se inoculó junto con NW250; sin embargo, esta diferencia fue afectada por el orden de inoculación, ya que interesantemente, la mayor proporción de larvas infectadas con NW449 fue cuando se inoculó primero a NW250, lo cual sugiere cierto sinergismo en esta combinación y, específicamente, con este orden de inoculación, ya que en esta combinación, pero al inocular primero NW449 y luego NW250, la proporción de larvas infectadas por NW449 se redujo drásticamente. Este mismo fenómeno se observó en la proporción de larvas inoculadas con NW250, donde al inocular primero NW449 y después NW250, la

proporción de larvas infectadas por NW250 fue mayor que cuando se inoculó primero NW250. El incremento en mortalidad ocasionado en los tratamientos donde se inocularon ambos aislamientos en comparación con el tratamiento donde se inoculó únicamente un solo patógeno, podría ser consecuencia del mayor número de conidios totales inoculados, ya que estos pueden actuar saturando la respuesta inmune del hospedero, tal como fue observado en otros experimentos (Thomas *et al.*, 2003), y aumentar la probabilidad de éxito de los patógenos. En el mismo sentido, otros autores han señalado que la diferencia en el número de conidios inoculados por cada uno de los diferentes aislamientos en la interacción influye drásticamente en el resultado de la misma (Guzmán-Franco *et al.*, 2009); sin embargo, nuestros resultados sugieren que, además del número de conidios inoculados, el orden de inoculación tiene un efecto significativo en los resultados de estas interacciones (Fig. 4).

En esta combinación en especial (NW250 y NW449), se puede observar que el orden de inoculación fue muy significativo (Figs. 4 y 5), ya que en las inoculaciones duales, el primer patógeno inoculado siempre fue el que produjo una menor proporción de larvas infectadas. Como es que el orden de inoculación puede afectar a los patógenos durante la co-infección es poco conocido; sin embargo, se cree que los patógenos en este tipo de interacciones, además de afectar la dinámica del otro patógeno, pueden afectar el sistema inmune del hospedero (Cox, 2001), por lo que una probable explicación sería que el patógeno que fue inoculado primero tuvo que enfrentar directamente al sistema inmune de la larva y evadirlo, lo que significó un costo de energía para dicho aislamiento y, por tanto, el segundo patógeno no tuvo que realizar el mismo gasto de energía, y pudo invadir una larva ya con el sistema inmune debilitado.

La importancia del sistema inmune en el resultado de interacciones entre hongos entomopatógenos ha sido reportada previamente. En un estudio donde se infectaron hormigas (*Acromyrmex echinator*) con *Metharhizium anisopliae* var. *anisopliae* (un patógeno virulento, obligado y generalista), y *Aspergillus flavus*, (oportunista y generalmente avirulento), se observó que el patógeno menos virulento fue el que causó la mayor proporción de hormigas infectadas durante la co-infección, lo cual se debió, probablemente, a que *M. anisopliae* var. *anisopliae*

produjo toxinas durante su colonización que degradaron la respuesta inmune del hospedero y esto le dio una mayor capacidad competitiva a *A. flavus* (Hughes and Boomsma, 2009). Este tipo de interacción, conocida como competencia aparente mediada por el sistema inmune (Mideo, 2009), ha sido considerada una de la más importantes (Cox, 2001) y ocurre aún en invertebrados que poseen un sistema inmune menos complejo (Hughes *et al.*, 2004).

Únicamente en la combinación NW250 y NW449 se obtuvieron larvas infectadas con ambos patógenos, y específicamente cuando *P. blunckii* fue inoculado primero (Fig. 6); esto pudo deberse a la mayor capacidad competitiva de *P. blunckii*, pues es un especialista comparado con *Z. radicans* (Pell *et al.*, 2001), lo que le permitiría sobrevivir en el ambiente aún en presencia de otro patógeno en el mismo hospedante. Por esto, cuando *Z. radicans* (NW250) se inoculó después no tuvo que enfrentarse al sistema inmune del insecto y, aunado a que *P. blunckii* hizo un gasto de energía para evadir dicho sistema, pudo competir mejor por el recurso compartido. Contrariamente, cuando *P. blunckii* fue inoculado al final no tuvo que realizar el gasto de energía para evadir el sistema inmune y, al ser un mejor competidor, desplazó completamente a *Z. radicans*, ya que no se obtuvieron larvas en la infección dual al inocularse primero *P. blunckii*.

Finalmente, las diferencias entre los resultados de estas interacciones (NW250-NW449 y NW386-NW449) se debieron, probablemente, a las características biológicas de los dos aislamientos utilizados de *Z. radicans*, pues, aunque ambos han sido aislados de *P. xylostella*, su origen geográfico es diferente y sólo uno (NW386) es capaz de producir esporas de resistencia (Guzmán-Franco, 2005). Lo anterior podría sugerir que el sistema inmune de la larva tiene una mayor capacidad de defensa contra el aislamiento NW386, comparado con el aislamiento NW250, provocando que la proporción de larvas muertas sea diferente entre las interacciones. Además, el número de conidios inoculados del aislamiento NW250 fue mucho mayor a los del NW386 (cuadros 3 y 4), lo que también pudo provocar que la mortalidad ocasionada por la interacción NW449-NW250 fuera mayor a la NW449-NW386 (Figura 2 y 5).

A pesar de dichas diferencias, en ambas interacciones se encontraron larvas infectadas por *P. blunckii* y por *Z. radicans*, lo cual sugiere que estas especies tienen la capacidad de coexistir. Resultados similares han sido descritos previamente por Guzmán-Franco *et al.*, (2009).

De forma general, el patógeno que logró infectar el mayor número de larvas fue *P. blunckii* (Figura 1 y 4), seguido por NW250 y finalmente NW386. Dicho resultado pudo deberse a la especialización de cada patógeno, pues *P. blunckii* sólo lo se ha encontrado infectando a *P. xylostella*, mientras que algunas especies de *Z. radicans* pueden infectar a otros hospederos (Pell *et al.*, 2001), lo cual sugiere que *P. blunckii*, al ser un especialista, está bajo una mayor presión de selección y en constante coevolución con su hospedero (Combes and Theron, 2000), probablemente porque las habilidades de este patógeno para evadir el sistema inmune e infectar a *P. xylostella* sean mejores a las de *Z. radicans*. Así mismo, también se sugiere que el origen geográfico de los aislamientos de *Z. radicans* podría jugar un papel importante, ya que el aislamiento NW386 de México fue menos competitivo que el aislamiento exótico (NW250).

Al respecto, se ha sugerido que este proceso de co-evolución debería favorecer a la especialización, ya sea por la existencia de cambios funcionales que limitan la capacidad de los generalistas en algún hábitat o porque la evolución podría avanzar más rápido dentro de un nicho más estrecho (Whitlock, 1996). Sin embargo, paradójicamente sólo una minoría de patógenos son especialistas (Woolhouse *et al.*, 2001). En general, la teoría ha demostrado que no existe una regla simple para determinar si los patógenos generalistas serán más o menos virulentos que los patógenos especialistas, ya que existen ejemplos de patógenos de humanos mostrando todas las posibles combinaciones de baja o alta virulencia (Woolhouse *et al.*, 2001).

Nuestros resultados son importantes ya que nos permiten tener una mejor comprensión de lo que podría estar sucediendo en condiciones naturales, durante las co-infecciones de *Z. radicans* y *P. blunckii* en poblaciones de *P. xylostella*, pues en campo es muy probable que estos patógenos tengan que interactuar y además, que uno llegue o inicie su infección después del otro. De esta manera, se podrán

determinar mejores estrategias para futuros programas de control biológico utilizando estos hongos. Así mismo, la combinación NW449 y NW250 que es entre un aislamiento nativo y un exótico, comparado con la combinación de dos aislamientos nativos (NW449 y NW386) mostró cuan diferente puede ser el resultado de una interacción, lo cual refuerza aún más la necesidad de tener mayores estudios antes de introducir organismos exóticos en el ambiente, ya que esto podría ocasionar cambios en la distribución y abundancia de organismos nativos, llegando incluso a la extinción local o global de estas especies (blanco o no blanco) (van Lenteren, 2006). Entonces, una alternativa para reducir estos riesgos, y en particular en el control biológico aumentativo, sería hacer uso de especies nativas (van Lenteren, 2006), como lo son los entomopatógenos que hemos estudiado.

VI. CONCLUSIÓN

Nuestros resultados sugieren que los patógenos estudiados tienen la capacidad de co-existir, por lo cual suponemos que en condiciones naturales es muy probable que interactúen. Además, encontramos que el orden de inoculación sí afecta el resultado de estas interacciones, probablemente por interacciones específicas entre el sistema inmune del insecto y el aislamiento utilizado.

La influencia del orden de inoculación fue mayor en la interacción entre NW250 y NW449; en donde el patógeno inoculado al final fue el que tuvo la capacidad de infectar un mayor número de larvas, pues se enfrentó a un sistema inmune debilitado y su competidor había sufrido, previamente, un gasto de energía.

El aislamiento NW250 parece ser más competitivo que el NW386, esto pudo deberse al origen geográfico de ambos, pues es probable que el sistema inmune del hospedante tenga una mayor capacidad para defenderse del aislamiento NW386 que del NW250.

En general, nuestros resultados indican que *P. blunckii* fue un mejor competidor que el aislamiento mexicano de *Z. radicans* ya que infectó un mayor número de larvas. Lo cual sugiere que el proceso de co-evolución entre estos patógenos y su hospedante ha provocado que *P. blunckii* tenga mejores capacidades de infección, situación que no fue observado cuando *P. blunckii* compitió con un aislamiento exótico de *Z. radicans* (NW250).

Con la información obtenida se podrán entender mejor la dinámica de las co-infecciones y se determinarán estrategias más adecuadas para la utilización de estos hongos en futuros programas de control biológico de *P. xylostella*.

VII. LITERATURA CITADA

- Abdel R. K.M, Barta M and Cagán L. 2010. Effects of combining *Beauveria bassiana* and *Nosema pyrausta* on the mortality of *Ostrinia nubilalis*. Cent. Eur. J. Biol. 5 (4): 472-480.
- Abrams P.A. 1987. Alternative models of character displacement and niche shift. I. Adaptive shifts in resource use when there is competition for nutritionally nonsubstitutable resources. Evolution 41: 651–661.
- Alexopoulos C.J., Nims C.W., Blackwell M. 1999. Introduction Mycology 4th edition, John Wiley & sons. New York.
- Alizon S. and van Baalen M. 2008. Multiple infections, immune dynamics, and the evolution of virulence. Am. Nat, 172:E150-E168.
- Altamirano R., Avila J.A., Flores E. E. 1997. Sistemas agroindustriales en México. Indicadores, situación actual, tendencias. Rabobank, CIESTAAM.
- Anaya R.S. and Romero N.J. Hortalizas: plagas y enfermedades. Ed. Trillas. 544 p.
- Anderson R.M., and May R.M. 1982. Coevolution of hosts and parasites. Parasitology, 85:411-426.
- Anderson R.M. and May R.M. 1985. Vaccination and herd immunity to infectious disease. Nature 318: 323–329.
- Bautista M.N. 2006. Insectos plaga. Una guía ilustrada para su identificación. Bayer CropScience. Colegio de Postgraduados. 173 p.
- Baverstock J., Clak S.J., Alderson P.G. and Pell J.K. 2009. Intraguild interactions between the entomopathogenic fungus *Pandora neoaphidis* and an aphid predator and the parasitoid at the population scale. J. Invertebr. Pathol. 102:167-172.
- Beauvais A., Latge J.P., Vey A. and Prevost M.C. 1989. The role of surface components of the entomopathogenic fungus *Entomophaga aulicae* in the

- cellular immune response of *Galleria mellonella* (Lepidoptera). *J. Gen. Microbiol.* 135: 489–498.
- Blackwell M. 2010. Fungal evolution and taxonomy. En: Roy Helen, Fernando Vega, Dave Chandler, Mark Goettel, Judith Pell, Eric Wajnberg (Ed.). *The Ecology of Fungal Entomopathogens*. Springer, London. Pp. 7-16.
- Boucias D.G., Pendland J.C. and Latge J.P. 1988. Non-specific factors involved in attachment of entomopathogenic Deuteromycetes to host insect cuticle. *Appl Env. Microbiol.* 54:1795-1805.
- Boucias D.G. and Latge J.P. 1988. Non-specific induction of *Conidiobolus obscurus* and *Nomuraea rileyi* with host and non-host cuticle.
- Brey P.T., Latge J.P. and Prevost M.C. 1986. Integumental penetration of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* by *Conidiobolus obscurus* (Entomophthoraceae). *J. Invertebr. Pathol.* 48: 34-41.
- Brey P.T., Lee W-J., Yamakawa M., Koizumi Y., Perrot S., Francois M. and Ashida M. 1993. Role of integument in insect immunity: Epicuticular abrasion and induction of cecropin synthesis in cuticular epithelial cells. *PNAS* 90: 6275-6279.
- Brobyn P.J. and Wilding N. 1977. Invasive and developmental processes of Entomophthora species infecting aphids. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 69: 349-366.
- Brown J.S., Gilliland S.M., and Holden D.W. 2001. A *Streptococcus pneumoniae* pathogenicity island encoding an ABC transporter involved in iron uptake and virulence. *Mol. Microbiol.* 40:572–585.
- Brown S.P. and Grenfell B.T. 2001. An unlikely partnership: parasites, concomitant immunity and host defence. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 268: 2543–2549.
- Brown S.P., Le Chat L. and Taddei F. 2008. Evolution of virulence: triggering host inflammation allows invading pathogens to exclude competitors. *Ecol. Lett.* 11:44–51.

- 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 Día de campo. Celaya, Gto, México. Pp: 1-9.
- Bujanos R. M. y Mejía A. C. 2008. Estudios de Riesgo. Palomilla Dorso de Diamante *Plutella xylostella* (L.) en el Bajío, México. Publicación electrónica. Consultado el 8 de Enero de 2011. Disponible en:
http://www.siafeg.com/Estudios%20de%20Riesgo/Estudios/Estudio_Palomilla.htm.
- Buckling A. and Brockhurst M.A. 2008. Kin selection and the evolution of virulence. *Heredity* 100:484–488.
- Butt T.M., Segers R., Leal S.C. and Kerry B.R. 1998. Variation in the subtilisins of fungal pathogens of insects and nematodes. In: Bridge P., Couteaudier Y., Clarkson J., editors. *Molecular variability of fungal pathogens*. Ascot, UK: CAB International, p 149-169.
- Butt T.M. and Humber R.A. 1989. An immunofluorescence study of mitosis in a mite-pathogen, *Neozygites* sp. (Zygomycetes: Entomophthorales). *Protoplasma* 151: 115-123.
- Butt T.M., Wraight S.P., Galaini-Wraight S., Humber R.A., Roberts D.W. and Soper R.S. 1988. Humoral encapsulation of the fungus *Erynia radicans* (Entomophthorales) by the potato leafhopper *Empoasca fabae* (Homoptera: Cicadellidae). *J. Invertebr. Pathol.* 52: 49-56.
- Cavelier F., Verducci J., Andre F., Haraux F., Sigalat C., Traris M. and Vey A. 1998. Cyclopeptides as leads for novel pesticides: tentoxin and destruxin. *Pest Sci* 52: 81-89.
- Charnley A. K. 2003. Fungal pathogens of insects: cuticle degrading enzymes and toxins. *Adv. Bot. Res.* 40:241–321.
- Chouvenec T., Su N.Y. and Elliott M.L. 2008. Interactions between the subterranean termite *Reticulitermes flavipes* (Isoptera: Rhinotermitidae) and the

- entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* in foraging arenas. J. Econ Entomol 101:885-893.
- Combes C. and Theron A. 2000. Metazoan parasites and resource heterogeneity: constraints and benefits. Int. J. Parasitol. 30: 299.
- Cox F.E.G. 2001. Concomitant infections, parasites and immune responses. Parasitology, 122: S23–S38.
- Davies C.M., Fairbrother E. and Webster J. 2002. Mixed strain schistosome infections of snails and the evolution of parasite virulence. Parasitology, 124:31-38.
- Dayan T. and Simberloff D. 2005. Ecological and community-wide character displacement: the next generation. Ecol. Lett. 8, 875–894.
- de Roode JC, Culleton R, Cheesman SJ, Carter R, Read AF. 2004. Host heterogeneity is a determinant of competitive exclusion or coexistence in genetically diverse malaria infections. Proc R Soc Lond B, 271:1073-1080.
- de Roode J.C., Read A.F., Chan B,H.K, Mackinnon M.J. 2003. Rodent malaria parasites suffer from the presence of conspecific clones in three-clone *Plasmodium chabaudi* infections. Parasitology, 127:411-418.
- de Roode, J. C., Helinski M. E. H., Anwar M. A., and Read A. F. 2005. Dynamics of multiple infection and within-host competition in genetically diverse malaria infections. American Naturalist. 166(5): 531–542.
- Dumont M., Moné H., Mouahid G., Idris A., Shaban M. and Boissier J. 2007. Influence of pattern of exposure, parasite genetic diversity and sex on the degree of protection against reinfection with *Schistosoma mansoni*. Parasitol. Res. 101: 247–252.
- Dunphy G.B. and Nolan R.A. 1982. Cellular immune response of spruce budworm larvae to *Entomophthora egressa* protoplasts and other test particles. J. Invertebr. Pathol. 39: 261-263.

- Ebert D., Zschokke-Rohringer C.D., Carius H.J. 2000. Dose effects and density-dependent regulation of two microparasites of *Daphnia magna*. *Oecologia*, 122:200-209.
- Elkinton J.S., Hajek A.E., Boettner G.H. y Simons E.E. 1991. Distribution and apparent spread of *Entomophaga maimaiga* (Zygomycetes: Entomophthorales) in gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) populations in North America. *Environ Entomol.* 20:1601–1605.
- Evans H.C. 1989. Mycopathogens of insects of epigeal and aerial habitats. In *Insect-Fungus Interactions*, ed. N Wilding, NMCollins, P Hammond, JFWebber, pp. 205–38. San Diego: Academic.
- Fenner F. and Fantini B. 1999. Biological control of vertebrate pests: The history of myxomatosis, an experiment in evolution. CABI, Wallingford, UK.
- Ferguson H.M. and Read A.F. 2002. Genetic and environmental determinants of malaria parasite virulence in mosquitoes. *Proc R Soc Lond B*, 269:1217-1224.
- Fieller, E. C. (1944). A fundamental formula in the statistics of biological assay. *Quart. J. Pharm.* 17, 117
- Frank S.A. 1998. Foundations of social evolution Princeton, Princeton University Press.
- Furlong M.J., Pell J.K., Choo O.P., Rahman S.A. 1995: Field and laboratory evaluation of a sex pheromone trap for the autodissemination of the fungal entomopathogen *Zoophthora radicans* (Entomophthorales) by the diamond-back moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Bull. Entomol. Res.* 85: 331-337.
- Furlong M.J., Pell J.K., Reddy G.V.P. 1997. Premortality Effects of *Zoophthora radicans* Infection in *Plutella xylostella*. *Journal of invertebrate pathology* 70: 214-220.
- Furlong J.M. and Pell J. K. 2000. Conflicts between a Fungal Entomopathogen, *Zoophthora radicans*, and Two Larval Parasitoids of the Diamondback Moth. *Journal of Invertebrate Pathology* 76 (2): 85-94.

- Gandon S., Jansen V.A.A. and van Baalen M. 2001a. Host life history and the evolution of parasite virulence. *Evolution* 55:1056–1062.
- Gandon, S., van Baalen M. and Jansen V.A.A. 2002. The evolution of parasite virulence, superinfection, and host resistance. *Am. Nat.* 159:658–669.
- Gillespie J.P., Kanost M.R. and Trenczek T. 1997. Biological mediators of insect immunity. *Ann Rev Entomol* 42:611-643.
- Gower C.M., and Webster J.P. 2005. Intraespecific competition and the evolution of virulence in a parasitic trematode. *Evolution* 59: 544-553.
- Graham A.L., Allen J.E. and Read A. F. 2005. Evolutionary causes and consequences of immunopathology. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 36: 373–397.
- Grech K., Watt K. and Read A. F. 2006. Host-by-parasite interactions for virulence and resistance in a malaria model system. *J. Evol. Biol.* 19:1620–1630.
- Greischar M. A., and B. Koskella. 2007. A synthesis of experimental work on parasite local adaptation. *Ecol. Letts.* 10:418–434.
- Griffin A.S., West S.A., Buckling A. 2004. Cooperation and competition in pathogenic bacteria. *Nature* 430:1024-1027
- Golloway T.S. and Depledge M.H. 2001. Immunotoxicity in vertebrates: measurement and ecotoxicological relevance. *Ecotoxicology* 10: 5-23.
- Gunnarsson S.G.S., and Lackie A.M. 1985. Hemocytic aggregation in *Schistocerca gregaria* and *Periplaneta americana* as a response to injected substances of microbial origin. *J. Invertebr. Pathol.* 46: 312–319.
- Gunnarsson S.G.S. 1998. Infection of *Schistocerca gregaria* by the fungus, *Metarhizium anisopliae*: cellular reactions in the integument studied by scanning electron and light microscopy. *J. Invertebr Pathol* 52: 9-17.
- Guzmán-Franco A. W. 2005. Interactions between *Zoophthora radicans* and *Pandora blunckii* isolates in *Plutella xylostella* populations. PhD Thesis. The University of Nottingham, UK. Pp. 262.

- Guzmán-Franco A.W, Clark S.J., Alderson P. G. & Pell J. K. 2009. Competition and co-existence of *Zoophthora radicans* and *Pandora bluncki*, two co-occurring fungal pathogens of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Mycological Research*, 113: 1312-1321.
- Hajek A.E., Humber R.A., Elkington J.S. 1995. Mysterious origin of *Entomophthora maimaiga* in North America. *Am.Entomol. Spring*: 31-42.
- Hajek, A.E. and St. Leger R.J. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annu. Rev. Entomol.* 39: 293- 322.
- Hughes W.O.H. and Boomsma J.J. 2004. Let your enemy do the work: within-host interactions between two fungal parasites of leaf-cutting ants. *Proc R Soc Lond B*, 271:S104-S106.
- Hughes O.H.W., Petersen S.K., Ugelvig V.L., Pedersen D., Thomsen L., Poulsen M. and Boomsma J. 2004. Density-dependence and within-host competition in a semelparous parasite of leaf-cutting ants. *BMC Evolutionary Biology*, 4:45.
- Hodgson DJ, Hitchman RB, Vanbergen AJ, Hails RS, Possee RD, Cory JS. 2004. Host ecology determines the relative fitness of virus genotypes in mixed-genotype nucleopolyhedrosis infections. *J Evol Biol*, 17:1018-1025.
- Hou R. F. and Chang J.K. 1985. Cellular defense response to *Beauveria bassiana* in the silkworm, *Bombyx mori*. *Appl. Ent. Zool.* 20: 118–125.
- Huxham I.M., Lackie A.M. and McCorkindale N.J. 1989. Inhibitory effects of cyclodepsipeptides, destruxins, from the fungus *Metarhizium anisopliae* on cellular immunity in insects. *J Insect Physiol*, 35: 97-105.
- Inglis G.D., Goettel M.S., Butt T.M., Strasser H. 2001. Use of Hyphomycetous fungi for managing insect pests. *Fungi as Biocontrol Agents: progress, problems and potential* (Butt, T.M., Jackson, C. y N. Magan Eds.). CABI Publishing. pp. 23-69.
- Inglis G.D., Johnson D.L., Cheng K-J, Goettel M.S. 1997. Use of pathogen combinations to overcome the constraints of temperature on

- entomopathogenic zygomycetes against grasshoppers. *Biol Control*, 8:143-152.
- Inglis G.D., Duke G.M., Kawchuk L.M., Goettel M.S. 1999. Influence of oscillating temperatures on the competitive infection and colonization of the migratory grasshopper by *Beauveria bassiana* and *Metarhizium flavoviride*. *Biol Control*, 14:111-120.
- Jacques R.P. and Morris O.N. 1981. Compatibility of pathogens with other methods of pest control and with different crops. *Microbial control of insect pests and plant diseases, 1970-1980*. Edited by H.D. Burges, Academic press, New York, London. Pp. 695-715.
- Kaltz O., Gandon S., Michalakis Y. and Shykoff J.A. 1999. Local maladaptation in the anther-smut fungus *Microbotryum violaceum* to its host plant *Silene latifolia*: evidence from a cross-inoculation experiment. *Evolution* 53:395–407.
- Kanost, M. R., Kawooya, J. K., Law, J. H., Ryan, R. O., Van Heusden, M. C., and Ziegler, R. 1990. Insect hemolymph proteins. *Adv. Insect Physiol.* 22, 299–396.
- Keller S. 1997. The genus *Neozygites* (Zygomycetes, Entomophthorales) with special reference to species found in tropical regions. *Sydowia* 49: 118-146.
- Kirkup B.C. and Riley M.A. 2004. Antibiotic-mediated antagonism leads to a bacterial game of rock-paper-scissors in vivo. *Nature* 428: 412–414.
- Kobayashi Y., Mogami, K. and Aoki J. 1984. Ultrastructural studies on the hyphal growth of *Erynia neoaphidis* in the green peach aphid, *Myzus persicae*. *Trans. Mycol. Soc. Jpn.* 25: 425-434.
- Lambrechts L., Halbert J., Durand P., Gouagna L. C., and Koella J. C. 2005. Host genotype by parasite genotype interactions underlying the resistance of anophelin mosquitoes to *Plasmodium falciparum*. *Malaria J.* 4:3.
- Lefèvre T., Sanchez M., Ponton F., Hughes D., and Thomas F. 2007. Virulence in resistance in malaria: who drives the outcome of infection? *Trends Parasitol* 23:299–302.

- López L.C.C. y Scorsetti A. C. 2007. Revisión de los hongos Entomophthorales (Zygomycota: Zygomycetes) patógenos de insectos de la República Argentina. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 42 (1-2): 33 – 37.
- Macleod D.M., Tyrrell D. and Welton M.A. 1980. Isolation and growth of the grasshopper pathogen, *Entomophthora grylli*. *J. Invertebr. Pathol.* 36: 85-89.
- Maltais P.M., Nuckle J.R. and Leblanc P.V. 1994. Economic threshold for management of lepidopterous larvae on broccoli in southeastern New-Brunswick. *J. Econ. Entomol.*, 87: 766-774.
- Manning S.D., Woolhouse M.E.J., and Ndamba J. 1995. Geographic compatibility of the freshwater snail *Bulinus globosus* and schistosomes from the Zimbabwe Highveld. *Int. J. Parasitol.* 25:37–42.
- Margolis E., and Levin B.R. 2008. The evolution of bacteria-host interactions: virulence and the immune over-response. Pp. 3–12 in F. Baquero, C. Nombela, G.H. Cassell, and Gutierrez A., eds. *Evolutionary biology of bacterial and fungal pathogens*. ASM Press, Washington.
- Massey R.C., Buckling A., French-Constant R. 2004. Interference competition and parasite virulence. *Proc R Soc Lond B*, 271:785-788.
- May R.M. and Nowak M.A. 1995. Coinfection and evolution of parasite virulence. *Proc. R. Soc. Lond. B* 261: 209-215.
- McCoy K.D., Boulinier T., Schjorring S. and Michalakis Y. 2002. Local adaptation of the ectoparasite *Ixodes uriae* to its seabird host. *Evol. Ecol. Res.* 4:441–456.
- McGuire M.R., Maddox J.V. and Ambrus T. E.J. 1987 a. Host range studies of an *Erynia radicans* strain (Zygomycetes: Entomophthorales) isolated from *Empoasca fabae* (Homoptera: Cicadellidae). *J. Invertebr. Pathol.* 50: 75-77.
- McKenzie F.E. and Bossert W.H. 1997. The optimal production of gametocytes by *Plasmodium falciparum*. *J. Theor. Biol.* 193: 419–428.
- Meyling N.V. and Hajek A.E. 2010. Principles from community and metapopulation ecology: application to fungal entomopathogens. *BioControl* 55:39–54.

- Minchella D.J. 1985. Host life-history variation in response to parasitism. *Parasitology* 90, 205–216.
- Mideo N.S., Alizon and Day T. 2008. Linking within-and between-host dynamics in the evolutionary epidemiology of infectious diseases. *Trends Ecol. Evol.* 23:511–517.
- Mideo N. 2009. Evolutionary Parasitology, Parasite adaptations to within-host competition. *Trends in Parasitology* (25) 6: 261-268.
- Moore J. 2002. *Parasites and the Behaviour of Animals*. Oxford University Press. Oxford.
- Nowak M.A. and May R.M. 1994. Superinfection and coevolution of virulence. *Proc. R. Soc. Lond. B* 255: 81-89.
- Papierok B. 1982. Entomophthorales: Virulence and bioassay design, pp. 176-181. In: *Invertebrate pathology and microbial control, Proceedings 3rd International Colloquium on Invertebrate Pathology, 15th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, Brighton*.
- Papierok B. and Coremans-Pelseneer J. 1980. Contribution à l'étude de *Conidiobolus osmodes* Dreschler (Zygomycètes, Entomophthoraceae), agent occasionnel d'épizooties chez les pucerons (Homoptères, Aphididae). *Cryptogamie-Mycologie* 1: 111-117.
- Papierok B., Hajek A.E. 1997. *Manual of Techniques in Insect Pathology*. USA, Academic Press. Chapter V-2, Fungi:Entomophthorales. Pp. 187-211.
- Parker, M. A. 1985. Local population differentiation for compatibility in an annual legume and its host-specific fungal pathogen. *Evolution* 39:713– 723.
- Pedersen A. B. and Fenton A. 2006. Emphasizing the ecology in parasite community ecology. *Trends Ecol. Evol.* 22:133–139.
- Payne, R.W., Murray, D.M., Harding, S.A., Baird, D.B. and Soutar, D.M. 2005. *GenStat for Windows (8th Edition) Introduction*. VSN International, Hemel Hempstead

- Pell J. K., Eilenberg J., Hajek A. E. and Steinkraus D. C. 2001. Biology, ecology and pest managements potential of Entomophthorales. Wallingford, U. K. CABI Publishing, 71-153.
- Pell J. K., Wilding N., Player A. L. and Clark S.J. 1993b. Selection of an Isolate of *Zoophthora radicans* (Zygomycetes: Entomophthorales) for Biocontrol of the Diamondback Moth *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Journal of Invertebrate Pathology*. 61: 75–80.
- Perez C.J. and Shelton, A.M. 1997. Resistance of *Plutella xylostella* (Lepidoptera Plutellidae) to *Bacillus thuringiensis* Beliner in Central America. *Journal Econ. Entomol.* 90(1):87-93.
- Pozo E. M., Reyes E.S., MacSwiney C. A., Nieves R. J.M. y Arteaga S. K. 2003. Fundación Guanajuato Produce, A.C. Plan estratégico de investigación y transferencia de tecnología en el sector agropecuario y agroindustrial. Publicación electrónica. Disponible en:

<http://www.snitt.org.mx/pdfs/demanda/brocoli.pdf>. Consultado el 4/07/2010.
- Rajakumar S., Bleiss W., Hartmann S., Schierack P., Marko A. and Lucius R. 2006. Concomitant immunity in a rodent model of filariasis: the infection of *Meriones unguiculatus* with *Acanthocheilonema viteae*. *J. Parasitol.* 92: 41–45.
- Ramos G.I. 2000. Evaluación de efectividad biológica del insecticida MK-0244 (Benzoato de emamectina) para el control de la palomilla dorso de diamante en brócoli en Celaya, Gto., México.
- Rantala M.J., Kortet R., Kotiaho J.S., Vainikka A. and Suhonen J. 2003a. Condition dependence of pheromones and immune function in the grain beetle *Tenebrio molitor*. *Funct. Ecol.* 17:534-540.
- Ratcliffe N.A. and Rowley A.F. 1979. Role of hemocytes in defense against biological agents, pp. 331-414. In: GUPTA, A.P. (ed.) *Insect hemocytes*, Cambridge Univ. Press, Cambridge.

- Read A.F. and Taylor L.H. 2001. The ecology of genetically diverse infections. *Science*, 292, 1099–1102.
- Riethmacher, G.W. & Kranz, J., 1994. Development of disease incidence of Entomophthoraceae in field populations of *Plutella xylostella* in the Philippines. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 101(4), 357-367.
- Rojas J.C., Cruz-López L., Malo E.A., Díaz-Gómez O., Calyecac G. and Cibrian T.J. 2006. Identification of the sex pheromone of *Copitarsia decolora* (Lepidoptera:Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 99 (3): 797-802.
- Rosengaus R.B., Traniello J.F.A, Chen T., Brown J.J and Karp R.D.1999. Immunity in a social insect. *Naturwissenschaften* 86:588-591.
- Roy H.E., Steinkraus D.C., Eilenberg J., Hajek A.E., and Pell J.K. 2006. Bizarre interactions and Endgames: Entomopathogenic Fungi and Their Arthropod Host. *Annu. Rev. Entomol.* 51:331-57
- Schorring S. and Koella J. 2003. Sub-lethal effects of pathogens can lead to the evolution of lower virulence in multiple infections. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 270:189–193.
- Salvaudon L., Heraudet V. and Shykoff J. A. 2005. Parasite-host fitness trade-offs change with parasite identity: genotype-specific interactions in a plant-pathogen system. *Evolution* 59:2518–2524.
- Sarfraz M., Keddie, A. B. and Dossall, L. M., 2005. Biological control of the diamondback moth, *Plutella xylostella*: A review. *Biocontrol Science and Technology*, 15(8), 763-789
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), con información de las Delegaciones de la SAGARPA. 2010. Avance de siembras y cosechas. Resumen nacional por estado. Año agrícola 2010. Riego + temporal. Publicación electrónica. Consultado el 4/03/2011. Disponible en:
http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=128.

- Schmid-Hempel P. 2008. Parasite immune evasion: a momentous molecular war. *Trends in Ecology and Evolution* 23(6): 318-326.
- Schmid-Hempel P. and Ebert D. 2003. On the evolutionary ecology of specific immune defence. *Trends Ecol. Evol.* 18(1): 27-32.
- Silvia-Jothy M.T. and Thompson J.W. 2002. Short-term nutrient deprivation effects adult immune function in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor* L. *Physiol. Entomol.* 27: 206-212.
- Soderhall K. and Smith V.J. 1986. The prophenoloxidase activating system: The biochemistry of its activation and role in arthropod cellular immunity, with special reference to crustaceans. *In* "Immunity in Invertebrates" (M. Brehelin, Ed.). Springer, New York. Pp. 208–223.
- Sorvari J., Rantala L.M., Rantala M.J., Hakkarainen H. and Eeva T. 2007. Heavy metal pollution disturbs immune response in wild ant populations. *Environment Pollut.* 145: 324-328.
- Staves P.A. and Knell R.J. 2010. Virulence and competitiveness: testing the relationship during inter- and intraspecific mixed infections. *Evolution* 64(9): 2643–2652.
- Steinhaus E. A. 1949. *Principles of Insect Pathology*. New York: McGraw Hill
- St. Leger R.J., Joshi L., Bidochka M.J., and Roberts D.W. 1996. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *PNAS* 93: 6349-6354.
- Suárez-Vargas A.D., Bautista-Martínez N., Valdez-Carrasco J., Angulo-Ormeño A., Alatorre-Rosas R., Vera-Graziano J., Equihua-Martínez A. y V. Manuel-Pinto. 2006. Fluctuación poblacional de *Copitarsia decolora* (Guenée) y su asociación con crucíferas comerciales. *Agrociencia* 40: 501-509.
- Tanada y Kaya, H.K., 1993. *Insect Pathology*. Academia Press, San Diego. Pp. 666.
- Taylor L.H, Welburn S.C., Woolhouse M.E.J. 2002. *Theileria annulata*: virulence and transmission from single and mixed clone infections in cattle. *Exp Parasitol*, 100:186-195.

- Taylor L.H., Mackinnon M.J. and Read A.F. 1998. Virulence of mixed-clone and single-clone infections of the rodent malaria *Plasmodium chabaudi*. *Evolution*, 52:583-591.
- Thomas F., Bonsall M.B. and Dobson A.P. 2005. Parasitism, biodiversity and conservation. In : *Parasitism and Ecosystems*, edited by F. Thomas, F. Renaud and J.F. Guégan. Oxford University Press, Oxford. U.K. Pp. 124-139.
- Thomas M.B., Watson E. L. and Valverde-García P. 2003. Mixed infections and insect-pathogen interactions. *Ecology Letters*, 6: 183–188.
- Tomiyaama H., Aoki J. 1982. Infection of *Erynia blunckii* (Lack, Ex Zimm.) Rem. Et Henn (Entomophthorales: Entomophthoraceae) in the diamondback moth, *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Appl. Entomol Zool* 17(3): 375-384.
- Thrall P. H., Burdon J. J. and Bever J. D. 2002. Local adaptation in the *Linum marginale*-*Melampsora lini* host-pathogen interaction. *Evolution* 56: 1340–1351.
- Urzúa B. R., Muñiz B. R., Maciel R.C. J., Aguilera M. G. y Telléz M. M. A. 2006. Susceptibilidad a insecticidas en poblaciones de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) del estado de Guanajuato, México. *Agrociencia*, 40(3): 355-362.
- van Baalen M. and Sabelis M.W.. 1995. The dynamics of multiple infection and the evolution of virulence. *Am. Nat.* 146: 881–910.
- van Lenteren J.C., Bale J., Bigler F., Hokkanen H.M.T. and Loomans A.J.M. 2006. Assessing risks of releasing exotic biological control agents of arthropod pests. *Annu. Rev. Entomol.* 51:609–34.
- Velasco-Silva J. L., Alatorre-Rosas R., Pell J. K. and Guzmán-Franco A. 2000. Characterization of native entomophthoralean fungi associated with *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) in the Bajío region, Guanajuato, México. In: *Abstracts of the XXXIII Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology*. México. University of Guanajuato, 97.

- Wheeler M.B., Stuart G.S. and Hapner K.D. 1993. Agglutinin mediated opsonization of fungal blastospores in *Melanoplus differentialis* (Insecta). *J. Insect Physiol.* 39: 477–483.
- Whitlock M. C. 1996. The Red Queen versus the Jack-of-All-Trades: Evolutionary rates and the evolution of specialization. *The American Naturalist* 148:S65-S77.
- Wilson K. 2005. Evolutionary ecology of insect host-parasite interactions: an ecological immunology perspective, pp.289-346. *In* Holloway G.J and Rolff J. (eds.), *Insect evolutionary ecology: proceedings of the Royal Entomological Society's 22nd symposium*. CABI Publishing, Wallingford, United Kingdom.
- Woolhouse E. J. M., Taylor H. L., Haydon T. D. 2001. Population Biology of Multihost Pathogens. *Ecology and evolution of infection. Science, New Series*, 292 (5519): 1109-1112.
- Wraight S.P., Butt T.M., Galaini-Wraight S., Alle L.L., Soper R.S. and Roberts D.W. 1990. Germination and infection processes of the entomophthoralean fungus *Erynia radicans* on the potato leafhopper *Empoasca fabae*. *J Invertebr Pathol* 56: 157-174.