



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

"DINÁMICA DE INFECCIONES DUALES Y COMPETENCIA ENTRE *Zoophthora radicans* Y *Pandora blunckii* EN LARVAS DE *Plutella xylostella*"

Sandoval Aguilar José Alberto

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

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

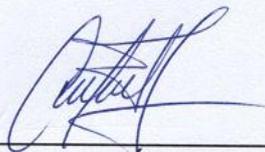
2012

La presente tesis titulada: **DINÁMICA DE INFECCIONES DUALES Y COMPETENCIA ENTRE Zoophthora radicans Y Pandora blunckii EN LARVAS DE Plutella xylostella**, realizada por el alumno: **José Alberto Sandoval Aguilar**, 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



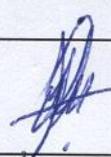
DR. ARIEL W. GUZMÁN FRANCO

ASESOR



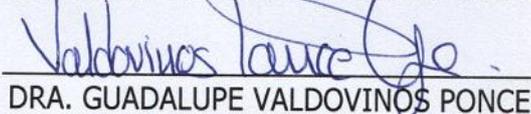
DRA. RAQUEL ALATORRE ROSAS

ASESOR



DRA. MARÍA TERESA SANTILLAN GALICIA

ASESOR



DRA. GUADALUPE VALDOVINOS PONCE

Montecillo, Texcoco, Estado de México, 2012

DINÁMICA DE INFECCIONES DUALES Y COMPETENCIA ENTRE
Zoophthora radicans* Y *Pandora blunckii* EN LARVAS DE *Plutella
xylostella

RESUMEN

La competencia inter-específica puede afectar la evolución de los patógenos al modificar su distribución, persistencia y sobrevivencia. Se estudiaron las infecciones duales ocasionadas por *Zoophthora radicans* y *Pandora blunckii* en poblaciones de *Plutella xylostella*. Dos aislamientos, uno de cada especie de hongo, se inocularon en larvas de *P. xylostella* de manera simultánea o con 4, 8 ó 12 horas de diferencia entre ambos patógenos donde el orden de inoculación fue alternado. En general, la mayor proporción de infección se presentó en los tratamientos donde cada especie de hongo se inoculó sola, en comparación con aquellos en donde se inocularon conjuntamente las dos especies de hongos. Con respecto a los tratamientos donde se inocularon las dos especies de hongos, la mayoría de las larvas infectadas que esporularon produjeron conidios únicamente de una sola especie. Este resultado tuvo una interacción significativa con el orden de inoculación. *P. blunckii* infectó menos larvas al ser co-inoculada con *Z. radicans* independientemente del orden de inoculación. *Z. radicans* infectó menos larvas en presencia de *P. blunckii* pero únicamente cuando se inoculó primero; sin embargo, cuando se inoculó después de *P. blunckii*, *Z. radicans* infectó más larvas logrando proporciones similares al tratamiento donde este aislamiento se inoculó solo. La proporción de larvas infectadas que produjeron conidios de las dos especies de hongos fue baja, nunca por arriba del 20%, y la mayoría se obtuvo cuando ambas especies de hongos se inocularon simultáneamente o con una diferencia de cuatro horas entre ambas inoculaciones, además este resultado fue independiente del orden de inoculación. Ambos factores, orden de inoculación y la diferencia en los tiempos de inoculación entre ambas especies de hongos, contribuyeron a la sobrevivencia de *Z. radicans* y *P. blunckii* al competir por el mismo hospedante (*P. xylostella*).

**DYNAMICS OF DUAL INFECTIONS AND COMPETITION BETWEEN
Zoopthora radicans AND *Pandora blunckii* IN *Plutella xylostella* LARVAE**

ABSTRACT

Within-host competition affects the evolution of pathogens modulating the distribution, persistence and survival of entomopathogenic fungi. We investigated dual-infections in *Plutella xylostella* populations using the entomopathogenic fungi *Zoopthora radicans* and *Pandora blunckii*. One isolate of each species was co-inoculated simultaneously onto *P. xylostella* larvae or with 4, 8 or 12 hours between inoculation times (prior residency time), and the order of inoculation was alternated. The greatest overall proportion of infection in larvae occurred when either fungus was inoculated alone compared to when they were dual-inoculated. When larvae were co-inoculated with both fungal species, the greatest proportion of infected larvae produced conidia from only one species, compared to larvae producing conidia from both fungi (dual-infection). The proportion of infected larvae producing conidia from one fungus had significant interaction with order of inoculation; *Pandora blunckii* infected less larvae in the presence of *Z. radicans* regardless of the order of inoculation, however, *Zoopthora radicans* infected less larvae in the presence of *P. blunckii* but only when the former was inoculated first, when inoculated last *Z. radicans* infected more larvae achieving proportions similar the treatment where this pathogen was inoculated alone. The proportion of dual infected larvae was never above 0.2 (approx. 20%) and the majority was obtained when both fungal species were inoculated simultaneously or when the prior residency time was 4 h regardless of the order of inoculation. Both prior residency time and order of inoculation contribute to the likelihood that each competing species survives during infection of *P. xylostella*.

AGRADECIMIENTOS

Sobre todo agradezco a mi Dios por la existencia de cosas tan magníficas en este mundo y por permitirme vivir en él, junto con todas las personas importantes de mi vida. Así como permitir la realización de mis metas, objetivos y sueños.

Al Colegio de Postgraduados, por la oportunidad de recibir experiencia y por abrir mi mente a nuevos objetivos, sin duda es una institución que ofrece lo más importante, conocimiento.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al proyecto N° CB2007/82365 “Interacciones molecular y poblacional de los hongos entomopatógenos *Zoopthora radicans* y *Pandora blunckii* en poblaciones de *Plutella xylostella*”, por brindarme los recursos necesarios para realizar esta investigación, gracias por su apoyo.

Al Dr. Ariel W. Guzmán Franco por ayudarme en adquirir conocimientos y por transmitirme que la voluntad es la fuerza para realizar nuestras metas.

A la Dra. Raquel Alatorre Rosas que por su amor a la investigación y enseñanza transmite conocimiento a todo aquel que lo necesita.

A la Dra. Ma. Teresa Santillán Galicia y a la Dra. Guadalupe Valdovinos Ponce por su ayuda y consejos que me sirvieron para mejorar en más de un aspecto.

Al M. C. Jorge M. Valdez Carrasco por su ayuda en la toma de fotografías y enseñanza académica.

A mi familia conformada por José Sandoval Ruiz, María Adelina Aguilar Aguilar, Daniel Sandoval Aguilar y Nancy Mendoza Guadarrama por su amor incondicional, ustedes son mi felicidad.

A mis compañeros y amigos que me brindaron su apoyo Erika, Jorge, Lupita, Jony, Fabián, Nico y Alejandro. A mis profesores, y personal administrativo, por ayudarme durante la estancia en esta institución.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Nancy que es una persona admirable, que por su amor, quiero llegar más alto de lo que alguna vez me propuse y que ha hecho de mis sueños una realidad. A José, Adelina y Daniel, su lucha es una inspiración para seguir adelante, juntos podremos superar cualquier adversidad. A mis abuelos José Luis[†], Eulalia[†], Rolando[†] y Juanita, la experiencia que me transmitieron me ha ayudado a alcanzar mis metas. A mi tía Francisca y a sus hijos Israel, Erika y Germán, que he compartido con ellos momentos felices. A mis amigos Génesis, Nereida, Mariana, Erika, Ana, Cinthya, Sarah, Beatriz, Moisés, Ricardo, Ivan, Israel, Abisai, Oscar, Alejandro (Trébol), Fredy, Alejandro (Negro) y Alejandro Martínez que aunque tomemos caminos diferentes siempre serán mis amigos.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	III
ABSTRACT	IV
AGRADECIMIENTOS.....	V
DEDICATORIA	VI
CONTENIDO.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE CUADROS	XII
I. INTRODUCCIÓN	1
1. 1. Objetivo	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2. 1. Hongos entomopatógenos	4
2. 1. 1. Entomophthorales	4
2. 1. 1. 1. Biología de los Entomophthorales	5
2. 1. 1. 2. Modo de infección.....	6
2. 1. 2. <i>Pandora blunckii</i>	7
2. 1. 3. <i>Zoophthora radicans</i>	8
2. 2. Interacciones intra-gremios	8
2. 3. Interacciones entre patógenos	9
2. 3. 1. Sinergismo	10
2. 3. 2. Aditividad.....	10

2. 3. 3. Antagonismo	10
2. 3. 3. 1. Competencia.....	11
2. 4. Factores adicionales que afectan el resultado de una interacción	12
2. 4. 1. Orden de infección.....	12
2. 5. Sistema inmune del insecto.....	12
III. HIPÓTESIS	13
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	14
4. 1. Cría de <i>Plutella xylostella</i>	14
4. 2. Aislamientos de <i>Pandora blunckii</i> y <i>Zoophthora radicans</i>	14
4. 3. Recuperación de los aislamientos de criopreservación.....	15
4. 4. Interacción de aislamientos de <i>Z. radicans</i> y <i>P. blunckii</i> en larvas de <i>P. xylostella</i>	15
4. 4. 1. Preparación del inóculo.....	16
4. 4. 2. Inoculación	16
4. 4. 2. 1. Establecimiento del experimento	17
4. 5. Diseño experimental y análisis estadístico	19
V. RESULTADOS	21
5. 1. Interacción entre los aislamientos Zr-NW386 y Pb-NW449.....	21
5. 1. 1. Proporción de larvas infectadas por Pb-NW449	21
5. 1. 2. Proporción de larvas infectadas por Zr-NW386	22
5. 1. 3. Proporción de larvas infectadas por Zr-NW386 y Pb-NW449	22
5. 2. Interacción entre los aislamientos Zr-NW250 y Pb-NW449.....	23
5. 2. 1. Proporción de larvas infectadas por Pb-NW449	23
5. 2. 2. Proporción de larvas infectadas por Zr-NW250	24
5. 2. 3. Proporción de larvas infectadas por Zr-NW250 y Pb-NW449	25

5. 3. Interacción entre los aislamientos Zr-NW386 y Pb-NW454.....	26
5. 3. 1. Proporción de larvas infectadas por Pb-NW454	26
5. 3. 2. Proporción de larvas infectadas por Zr-NW386	27
5. 3. 3. Proporción de larvas infectadas por Zr-NW386 y Pb-NW454	28
5. 4. Interacción entre los aislamientos Zr-NW250 y Pb-NW454.....	29
5. 4. 1. Proporción de larvas infectadas por Pb-NW454	29
5. 4. 2. Proporción de larvas infectadas por Zr-NW250	30
5. 4. 3. Proporción de larvas infectadas por Zr-NW250 y Pb-NW454	31
VI. DISCUSIÓN	33
VII. CONCLUSIONES	36
VIII. LITERATURA CITADA	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1. Esquematización del diseño y aplicación de tratamientos con la combinación de aislamientos.....	18
Figura 2. Estructuras para el reconocimiento del patógeno que ganó la infección.....	19
Figura 3. Proporción de larvas de <i>P. xylostella</i> infectadas por Pb-NW449 y en combinación con Zr-NW386.....	21
Figura 4. Proporción de larvas de <i>P. xylostella</i> infectadas por Zr-NW386 y en combinación con PbNW449.....	22
Figura 5. Proporción de larvas de <i>P. xylostella</i> infectadas por Zr-NW386 y Pb-NW449.....	23
Figura 6. Proporción de larvas de <i>P. xylostella</i> infectadas por Pb-NW449 y en combinación con Zr-NW250.....	24
Figura 7. Proporción de larvas de <i>P. xylostella</i> infectadas por Zr-NW250 y en combinación con Pb-NW449.....	25
Figura 8. Proporción de larvas de <i>P. xylostella</i> infectadas por Zr-NW250 y Pb-NW449.....	26
Figura 9. Proporción de larvas de <i>P. xylostella</i> infectadas por Pb-NW454 y en combinación con Zr-NW386.....	27
Figura 10. Proporción de larvas de <i>P. xylostella</i> infectadas por Zr-NW386 y en combinación con Pb-NW454.....	28
Figura 11. Proporción de larvas de <i>P. xylostella</i> infectadas por Zr-NW386 y Pb-NW454.....	29
Figura 12. Proporción de larvas de <i>P. xylostella</i> infectadas por Pb-NW454 y en combinación con Zr-NW250.....	30

Figura 13. Proporción de larvas de <i>P. xylostella</i> infectadas por Zr-NW250 y en combinación con Pb-NW454.....	31
Figura 14. Proporción de larvas de <i>P. xylostella</i> infectadas por Zr-NW250 y Pb-NW454.....	32

ÍNDICE DE CUADROS

Página

Cuadro 1. Aislamientos de Entomophthorales que fueron empleados en esta investigación.....	14
Cuadro 2. Combinación de aislamientos para la inoculación dual evaluada en larvas de <i>P. xylostella</i>	15

I. INTRODUCCIÓN

Las interacciones entre diversos organismos dentro de un ecosistema pueden ser muy complejas. Es muy común que insectos herbívoros puedan ser hospedantes de más de un enemigo natural, por lo que éstos interactuarán entre sí y con el hospedante (Furlong y Pell, 2005). Una interacción trófica inter o intra-específica es aquella en la que dos organismos diferentes comparten un hospedante y uno de ellos se alimenta del otro (Rosenheim *et al.*, 1995; Dixon, 2000; Brodeur y Rosenheim, 2000). Independientemente del tipo de interacción que ocurra, ya sea como especies individuales o complejo de especies, los enemigos naturales contribuyen al manejo de poblaciones de insectos plaga (Roy y Pell, 2000).

La infección de un hospedante por dos especies diferentes de hongos entomopatógenos puede ser común, pero el resultado de dicha interacción puede ser muy variable. Por ejemplo, se ha observado que cuando dos hongos entomopatógenos con diferente virulencia interactúan, uno de ellos puede inhibir las defensas del hospedante (generalmente el más virulento), y posteriormente el patógeno avirulento o menos virulento es capaz de superar a su competidor en la infección (Hughes y Boomsma, 2004). Este tipo de interacción, podría ayudar a entender el comportamiento de hongos entomopatógenos que al liberarlos en un lugar determinado interactúen con aislamientos ya presentes en el sistema.

En México y en otras regiones del mundo donde se producen crucíferas, se han encontrado en condiciones naturales a los hongos entomopatógenos *Pandora blunckii* Humber (Bose & Mehta) y *Zoophthora radicans* Batko (Brefeld) (Entomophthoromycotina: Entomophthorales) infectando a *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), (Velasco-Silva *et al.*, 2000; Riethmacher y Kranz, 1994). Por lo que el estudio de las interacciones entre estas dos especies infectando a *P. xylostella*, es importante porque aporta mayor información para entender la ecología de estas dos especies, y su papel en la regulación natural de la población de *P. xylostella*, considerada como una de las plagas más importantes en el cultivo de crucíferas. Tan sólo en México

se siembran alrededor de 50, 000 hectáreas de crucíferas, de las cuales el 72.42% son de brócoli, 12.45% de col y el 7.0% de coliflor (Bujanos, 2000). En el Estado de Guanajuato esta plaga, también conocida como la palomilla dorso de diamante, es la plaga más importante de los cultivos de crucíferas en este estado (Shelton *et al.*, 1993; Bujanos, 2000). El control químico es la medida más utilizada para el manejo de esta plaga. Algunos de los insecticidas de bajo riesgo que se utilizan en el estado de Guanajuato son el benzoato de emamectina, el indoxacarb y el spinosad (Barrera-Urzúa *et al.*, 2006). Sin embargo, el uso inadecuado de estos agroquímicos propicia la pérdida de su efectividad biológica en campo y representa una amenaza al ambiente y a la salud humana debido al aumento en la frecuencia de las aplicaciones o al uso de insecticidas de alto riesgo (Shelton *et al.*, 1993; Talekar y Shelton, 1993; Mau y Gusukman-Minuto, 2001; Zhao *et al.*, 2002), por lo que el control biológico y en particular el microbiano constituye una de las opciones más viables, especialmente cuando una sola especie de insecto es la plaga principal o dominante, como es el caso de la palomilla dorso de diamante en crucíferas (Sarfraz y Keddie, 2005).

Existe información muy limitada acerca del resultado de las interacciones entre *P. blunckii* y *Z. radicans* al co-infectar larvas de *P. xylostella*. Se sabe que la concentración de los patógenos juega un papel importante en el resultado de la co-infección (Guzmán-Franco *et al.*, 2009), así como el posible papel del sistema inmune de la larva (Guzmán-Franco *et al.*, 2011). Adicionalmente, información aún no publicada con estos dos patógenos (Zamora-Macorra *et al.* en prensa) y estudios con otros organismos señalan que el orden y la diferencia en los tiempos de invasión de patógenos al hospedante (Jäger y Schjørring, 2006; Lohr *et al.*, 2010) son importantes para definir el resultado de la interacción. Hasta ahora no existe información sobre Entomophthorales acerca de su habilidad de poder infectar hospedantes previamente infectados por otra especie, y si el tiempo de infección tras la inoculación del primer patógeno puede modificar el resultado de este tipo de interacción.

La dinámica y ecología de las interacciones entre patógenos es compleja y requiere ser estudiada ya que el conocimiento que se genere podría proporcionar las bases para establecer estrategias de control biológico con mayor probabilidad de éxito.

Con base en esta información, se planteó la presente investigación en la cual se estudio la posibilidad de que aislamientos de ambas especies de hongos pudieran infectar larvas de *P. xylostella* previamente infectadas por la otra especie; así mismo, se estudió si esta habilidad podía ser modificada por el tiempo de infección de la primera especie inoculada y finalmente, si estos resultados pueden ser afectados por los diferentes atributos biológicos de los aislamientos en estudio.

1. 1. Objetivo

El objetivo de esta investigación es determinar la capacidad que tienen aislamientos de las especies *Z. radicans* y *P. blunckii* de infectar larvas de *P. xylostella* previamente inoculadas con alguno de estos patógenos.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2. 1. Hongos entomopatógenos

Existe una gran diversidad de hongos entomopatógenos que pueden causar infecciones letales y epizootias en poblaciones de insectos (Jankevica, 2004). En el reino de los hongos hay más de 700 especies de entomopatógenos, la mayoría de los cuales se encuentran en las Divisiones Zygomycota y Ascomycota (Roy *et al.*, 2006). La División Ascomycota anteriormente estaba dividida en los grupos Ascomycota y Deuteromycota (hongos imperfectos); sin embargo, estudios morfológicos y moleculares recientes mostraron que muchos de estos hongos imperfectos, anteriormente incluidos en la clase Hyphomycetes (Deuteromycota) eran las formas asexuales de especies incluidas en el orden Hypocreales de la familia Clavicipitaceae, siendo esta última su ubicación taxonómica actual. La mayoría de los hongos entomopatógenos del grupo de los Entomophthorales están en la División Zygomycota (Roy *et al.*, 2006).

2. 1. 1. Entomophthorales

Los Entomophthorales se encuentran en la División Zygomycota (Alexopoulos *et al.*, 1996). El orden Entomophthorales incluye más de 200 especies patógenas de insectos y ácaros (Hajek *et al.*, 2012). Existen seis familias incluidas en este orden, Entomophthoraceae, Completoriaceae, Ancylistaceae, Meristacraceae, Neozygitaceae y Basidiobolaceae (Humber, 1989). La familia Entomophthoraceae cuenta con una gran diversidad de géneros dentro de los cuales se encuentran *Pandora* y *Zoophthora* (Humber, 1989).

La mayoría de los hongos entomopatógenos del grupo de los Entomophthorales presentan dos estructuras importantes: la primera son los conidios primarios que son diseminados activamente a partir de conidióforos, y la segunda es la formación de esporas de resistencia, las cuales se presentan cuando las condiciones nutricionales y/o físicas son desfavorables para la formación del tubo germinativo (Thaxter, 1888; Ben Ze'ev and Kenneth, 1982 a, b).

2. 1. 1. 1. Biología de los Entomophthorales

La principal característica de los Zygomycota es la producción de esporas de resistencia de pared gruesa llamadas zygosporas, que se originan a partir de la unión de dos gametangios. Existen también otras estructuras llamadas azygosporas que se forman partenogenéticamente (Alexopoulos *et al.*, 1996). En general, se considera que las zygosporas son esporas sexuales y las azygosporas asexuales. Sin embargo, la cariogamia y meiosis son procesos desconocidos en el orden de los Entomophthorales (Humber, 1981; Alexopoulos *et al.*, 1996), por lo que para este grupo de hongos las zygosporas y azygosporas solo se diferencian en su modo de desarrollo de las esporas de resistencia (Humber, 1981). Las esporas de resistencia representan el mecanismo más importante de supervivencia bajo condiciones adversas, y solo germinan bajo condiciones ambientales favorables y cuando el hospedante primario está presente (Pell *et al.*, 2001). Otra característica importante de este grupo es su habilidad de disparar el conidio primario activamente (Pell *et al.*, 2001; Tanada y Kaya, 1993), y la presencia de micelio cenocítico (sin septos) (Alexopoulos *et al.*, 1996).

Los hongos del grupo de los Entomophthorales tienen un ciclo de vida muy característico, inicia con la producción de conidios en conidióforos que emergen del insecto infectado. Estos conidios, conocidos como primarios, son disparados activamente por presión hidrostática y pueden llegar a la superficie de un hospedante adecuado, en donde, el proceso de infección se inicia

nuevamente. Si los conidios primarios llegan a otra superficie que no sea un hospedante, estos producen conidios secundarios, los cuales eventualmente son también disparados. La producción de conidios secundarios u otros de mayor orden (terciarios etc.) continúan hasta que el protoplasma del conidio se agota y este muere (Pell *et al.*, 2001; Tanada y Kaya, 1993).

Algunos géneros como *Zoophthora* no siempre liberan los conidios activamente (Wilding, 1986); en su lugar, éstos producen un capiloconidio en un conidióforo elongado y delgado que durante su desarrollo, el citoplasma contenido en el conidióforo es transportado hacia el capiliconidio (Humber, 1981; Alexopoulos *et al.*, 1996). El capiloconidio es pegajoso y se adhiere a un hospedante cuando éste pase cerca (Alexopoulos *et al.*, 1996; Pell *et al.*, 2001).

2. 1. 1. 2. Modo de infección

La primera barrera que el conidio debe superar durante el proceso de infección es la cutícula del insecto. De manera general, el conidio usa mecanismos físicos y enzimáticos para penetrar la cutícula que podría o no incluir la formación de estructuras especializadas de infección como los apresorios (Pell *et al.*, 2001). Una vez dentro del insecto, el hongo se reproduce como cuerpos hifales o protoplastos. El hongo usa la reserva de nutrientes del hospedante matándolo por inanición (Pell *et al.*, 2001). Una vez que el hongo ha invadido por completo a su hospedante, y dependiendo de las condiciones ambientales, emerge del insecto muerto produciendo conidióforos y conidios (Tanada y Kaya, 1993). Durante el proceso de invasión, los Entomophthorales pueden tener un uso limitado de toxinas o puede ser nulo (Humber, 1984). Los insectos infectados por algunas especies de este grupo de hongos son fijados mediante rizoides en la superficie en donde el insecto se encontraba, lo que incrementa la posibilidad de que un insecto sano se ponga en contacto con el insecto infectado y se inicie una nueva infección (Pell *et al.*, 2001).

Algunas especies como *Zoophthora radicans* producen esporas de resistencia al final del ciclo de infección (Glare *et al.*, 1989; Yeo *et al.*, 2001). Una vez que la espora de resistencia ha germinado, produce conidios primarios con lo que el ciclo de vida inicia nuevamente (Pell *et al.*, 2001). Aún no está definida la causa de su formación (Glare *et al.*, 1989; Hajek y St. Leger, 1994), y es una característica muy variable entre aislamientos de esta especie (Glare *et al.*, 1989).

2. 1. 2. *Pandora blunckii*

El género *Pandora* presenta núcleos grandes, generalmente $\geq 5 \mu\text{m}$ de diámetro y durante la interface presentan cromatina prominentemente condensada. Los conidióforos se ramifican en los ápices, rara vez se bifurcan, entrelazados semejando una estructura parecida a un himenio, suele presentar una estructura parecida a cistidia 2-3 veces más gruesa que los conidióforos estrechándose hacia la parte apical (Humber, 1989). Los conidios primarios son ovoides a cilíndricos, piriformes, clavados o fusionados sin tendencia a mostrar simetría bilateral (la papila basal puede ser desplazada lateralmente desde el eje), uninucleados y bitunicados (la capa de la pared se puede separar) (Humber, 1989). Los conidios secundarios son más o menos parecidos a los conidios primarios, capiliconidio ausente (Humber, 1989), rizoides monohifales, de 2 a 3 veces más gruesos que los conidióforos, altamente vacuolados que terminan en disco adhesivo discoide o ramificado irregularmente (Humber, 1989). No se reporta la producción de esporas de resistencia. *Pandora blunckii* es uno de los patógenos más importantes que hasta la fecha únicamente se ha reportado infectando a la palomilla dorso de diamante *P. xylostella* (L.) (Pell *et al.*, 2001).

2. 1. 3. *Zoophthora radicans*

En el género *Zoophthora* las células vegetativas se desarrollan como cuerpos hifales, los núcleos son de tamaño medianos a grandes y presentan gránulos prominentes de cromatina condensada durante la interfase (Humber, 1989). Los conidióforos son simples y se derivan de cuerpos hifales esféricos; las células conidiógenas son ligeramente claviformes. La mayoría de las especies presentan una estructura parecida a cistidia en himenio, de por lo menos el doble de grosor de los conidióforos (Humber, 1989). Los conidios primarios son uninucleados, alargados o fusionados, a menudo fuertemente curvados, papila basal ampliamente cónica, bitunicada y uninucleada (Humber, 1989). Rizoides al menos dos veces más gruesos que los conidióforos o células vegetativas (Humber, 1989). Las esporas de resistencia surgen por gemación de la célula parental (Humber, 1989).

Este hongo puede atacar a una amplia gama de órdenes de insectos (Walter *et al.*, 2003), entre ellos destacan insectos de importancia económica que atacan a cultivos hortícolas como la palomilla dorso de diamante (Pell *et al.*, 2001).

2. 2. Interacciones intra-gremios

Un gremio es un grupo de especies que utilizan recursos idénticos y potencialmente limitados por lo que compiten por estos (Root, 1967). La eficiencia en la regulación de especies plaga por agentes de control biológico pueden estar influenciadas por este tipo de interacciones. Las interacciones positivas intragremios resultan en la disminución de la densidad de equilibrio de la plaga; sin embargo, las interacciones negativas intragremios pueden alterar el control de plagas ya que puede existir depredación entre especies de enemigos naturales (Baverstock *et al.*, 2009). No hay un acuerdo acerca de si es benéfico o no, la existencia de diversidad de enemigos naturales en el control de plagas (Pell, 2007); sin embargo, se ha sugerido que la depredación

entre especies puede ser negativa, ya que resultaría en un antagonismo entre especies que reduciría la mortalidad del insecto hospedante o plaga (Roy *et al.*, 2003; Straub *et al.*, 2008).

2. 3. Interacciones entre patógenos

Las interacciones negativas y positivas, como la competencia, la depredación y la simbiosis se consideran factores que determinan la estructura y organización de las comunidades (Salles *et al.*, 2003).

Una comunidad está conformada por diversas especies, las cuales eventualmente interactúan a diferentes escalas espaciales y pueden afectar a las demás en su natalidad y mortalidad (Leibold *et al.*, 2004; McCann *et al.*, 1998). La mayoría de las comunidades incluyen una serie de grandes consumidores, pero no todas ellas son estrictamente monófagas, por lo que muchos pueden competir por el mismo recurso o presa (Sih *et al.* 1985).

Los organismos están expuestos a una gran variedad de patógenos, es frecuente encontrar a un hospedante infectado por dos o más especies (Cox, 2001; Read y Taylor, 2001). Estos tipos de interacciones dentro del hospedante, aunque son poco conocidas, pueden tener efectos importantes en la dinámica de las poblaciones del hospedante (Mideo *et al.*, 2008), en la estructura de la comunidad (Pedersen y Fenton, 2006), y en la evolución del parásito (Staves y Knell, 2010).

En infecciones mixtas, las interacciones entre los patógenos y el hospedante son muy complejas por lo que pueden darse distintas situaciones; puede ser que la virulencia aumente en uno o ambos patógenos infecciosos, o uno o ambos puedan ser suprimidos, o que uno pueda ser exitoso para colonizar al hospedante y suprimir a su competidor (Cox, 2001). Como consecuencia, los enemigos naturales de los insectos han evolucionado de una manera multitrófica, su interacción puede ser de forma sinérgica, aditiva o antagonista (Roy y Pell, 2000).

2. 3. 1. Sinergismo

Las interacciones sinérgicas se logran cuando la mortalidad de la población plaga causada por dos o mas enemigos naturales es mayor a la causada individualmente por cada uno de ellos (Roy y Pell, 2000). En una infección múltiple, la interacción de dos patógenos en un hospedante, ocasionan una mayor virulencia (Bremermann y Pickering, 1983; Frank, 1996; van Baalen y Sabelis, 1995). No obstante, la introducción de variables biológicas, como la escases de recurso del hospedante y la competencia que pueden generar, puede cambiar drásticamente esta relación (Chao *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2002; Schjørring y Koella 2003; West y Buckling, 2003).

2. 3. 2. Aditividad

La mortalidad aditiva es provocada cuando los enemigos naturales no interactúan, por lo que la mortalidad del hospedante es igual que la combinación de mortalidad individual causada por cada agente (Roy y Pell, 2000).

2. 3. 3. Antagonismo

Pueden existir tres posibles niveles de antagonismo (Ferguson y Stiling, 1996). En el primer nivel, los enemigos naturales interactúan y como resultado la mortalidad total de la población plaga es menor que la mortalidad aditiva. En el segundo nivel, la mortalidad total de la población plaga es menor que la mortalidad causada por una de las especies de enemigos naturales. En el tercer nivel, la mortalidad total de la población plaga es menor que la mortalidad causada por las dos especies de enemigos naturales cuando ocasionan la infección por separado (Roy y Pell, 2000).

2. 3. 3. 1. Competencia

La competencia es una interacción entre individuos causada por una necesidad compartida de un recurso en cantidades limitadas y que conduce a una reducción en la supervivencia, crecimiento y/o reproducción de los individuos que compiten (Begon *et al.*, 1996).

La competencia es una de las interacciones potencialmente antagónicas que daría lugar a la interferencia entre especies de enemigos naturales (Roy y Pell, 2000). Existen tres tipos de competencia entre organismos que son reconocidos por los ecologistas, la explotación, la interferencia y la competencia aparente (Read y Taylor, 2001).

En la competencia por explotación uno de los organismos que interactúan en la infección es capaz de desplazar al otro para aprovechar los recursos disponibles del hospedante mediante adaptaciones que mejoran la capacidad para adquirir dichos recursos (Mideo, 2009; Dayan y Simberloff, 2005)

En la competencia por interferencia, uno de los microorganismos inhibe el crecimiento del otro, reduce la tasa de crecimiento de la población y reduce la virulencia de su competidor produciendo toxinas (Massey *et al.*, 2004).

La competencia aparente es medida por el sistema inmune del hospedero, ya que para los parásitos el sistema inmune presenta un gran desafío para su supervivencia (Mideo, 2009). Sin embargo, pocas estrategias de evasión mediante el sistema inmune están adaptadas para tratar con un doble desafío de la inmunidad para la competencia (Mideo, 2009). Por lo que la respuesta inmune inducida por un parásito modifica el entorno del hospedante, y estos cambios tienen un impacto en su capacidad para resistir las infecciones sucesivas por diferentes especies de parásitos y facilita la infección (Cox, 2001).

2. 4. Factores adicionales que afectan el resultado de una interacción

El resultado de una interacción también puede ser modificado por diversos factores adicionales como diferencias genéticas entre poblaciones de la misma especie de hospedante (de Roode *et al.*, 2004; Hodgson *et al.*, 2004), el orden en que infectaron los patógenos (Paul *et al.*, 2004; de Roode *et al.*, 2005) y el modo de transmisión de estos (Vizoso y Ebert, 2005).

2. 4. 1. Orden de infección

Se ha sugerido que las diferencias en tiempo de eventos de infección juega un papel muy importante en el resultado final de una interacción (de Roode *et al.*, 2005; Jäger y Schørring, 2006). Se considera que los patógenos que encuentran a su hospedante ya infectado por otro patógeno están en desventaja, por dos posibles razones: primero por la reducción de nutrientes, y segundo por la activación del sistema inmune del hospedante (Read y Taylor 2001; de Roode *et al.*, 2005). Sin embargo, también se ha encontrado que un patógeno tiene ventajas al llegar a un hospedante previamente infectado por que el hospedante podría ya tener su sistema inmune afectado por el primer patógeno y no poner resistencia a una nueva infección (Rolff y Siva-Jothy, 2003).

2. 5. Sistema inmune del insecto

Las defensas contra los parásitos y patógenos se deben a una variedad de mecanismos, las cuales incluyen cambios en el comportamiento del insecto como la defensa, la inmunidad de la población y los cambios en los parámetros del ciclo de vida (Moore, 2002; Anderson y May, 1985; Minchella, 1985). En esta lista de mecanismos, la defensa por el sistema inmune ocupa el último lugar (Schmid-Hempel y Ebert, 2003).

Las defensas antimicrobianas en los insectos se establecen a través de la respuesta celular, como la fagocitosis y la encapsulación por hemocitos, y respuestas humorales inmediatas como la síntesis de péptidos antimicrobianos y la reacción en cascada de la fenoloxidasa (pro-PO) (Gillespie *et al.*, 1997; Trenczek, 1998; Meister *et al.*, 2000).

La activación eventual de estas respuestas conduce a la síntesis de melanina y la producción de compuestos humorales como quinonas que circulan en la hemolinfa (Schmid-Hempel y Ebert, 2003), los cuales son tóxicos para los microorganismos (Söderhall, 1998). Antes de que se formen nódulos (capas de hemocitos) la melanina tiene la función de evitar la entrada, encapsular y matar al invasor (Schmid-Hempel y Ebert, 2003). Para los hongos Entomophthorales, la respuesta del insecto se limita a la melanización cuticular en la región por donde penetra el hongo y la respuesta por hemocitos no es activada (Brobyn y Wilding, 1977; Brey *et al.*, 1986; Butt *et al.*, 1988), ya que la mayoría de estos hongos se desarrollan como protoplastos sin pared en las primeras etapas de colonización del hospedante y no son reconocidos por los hemocitos (MacLeod *et al.*, 1980; Kobayashi *et al.*, 1984; Keller, 1997; Dunphy y Nolan, 1982).

III. HIPÓTESIS

P. blunckii, al ser un patógeno especialista puede infectar larvas previamente inoculadas con *Z. radicans*.

Z. radicans, al ser un patógeno generalista no puede infectar larvas previamente inoculadas con *P. blunckii*.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4. 1. Cría de *Plutella xylostella*

La cría de *P. xylostella* se realizó en jaulas de acrílico de 35 cm de ancho, 45 cm de largo y 48 cm de profundidad, las cuales se colocaron en una cámara de cría con un fotoperiodo de 16:8 horas de luz: oscuridad a una temperatura constante de 22 °C. Los insectos se alimentaron con plantas de brócoli (*Brassica oleracea*) var. Waltham.

4. 2. Aislamientos de *Pandora blunckii* y *Zoophthora radicans*

Los experimentos se llevaron a cabo con dos aislamientos de *Z. radicans* (Zr) y *P. blunckii* (Pb) (Cuadro 1). Los aislamientos están conservados en viales criogénicos mantenidos en nitrógeno líquido (NL) en las colecciones del Laboratorio de Patología de Insectos del Colegio de Postgraduados, Texcoco, México y en la Estación Experimental de Rothamsted, Inglaterra.

Cuadro 1. Aislamientos de *P. blunckii* y *Z. radicans*.

Especie	Aislamiento	Hospedante	Origen geográfico
<i>Z. radicans</i>	Zr-NW386	<i>P. xylostella</i>	México
<i>Z. radicans</i>	Zr-NW250	<i>P. xylostella</i>	Malasia
<i>P. blunckii</i>	Pb-NW449	<i>P. xylostella</i>	México
<i>P. blunckii</i>	Pb-NW454	<i>P. xylostella</i>	México

4. 3. Recuperación de los aislamientos de criopreservación

Los viales criogénicos con los hongos se colocaron en un termo con NL. Posteriormente, se transfirieron a un baño María de 37-40°C durante cinco minutos y se colocaron en alcohol al 95% durante dos minutos en una campana de flujo laminar. El micelio de cada aislamiento se distribuyó individualmente en tres o cuatro cajas Petri con medio de cultivo SEMA (Agar Dextrosa Sabouraud suplementado con leche y yema de huevo).

4. 4. Interacción de aislamientos de *Z. radicans* y *P. blunckii* en larvas de *P. xylostella*

El objetivo de estos experimentos fue determinar la capacidad de *Z. radicans* y *P. blunckii* para infectar larvas de *P. xylostella* a diferentes tiempos de haber sido previamente inoculadas con uno de estos patógenos. Se estudiaron cuatro combinaciones de aislamientos (Cuadro 2). Cada combinación se considero como un experimento independiente.

Cuadro 2. Combinación de aislamientos para la inoculación dual evaluada en larvas de *P. xylostella*.

Combinación	Aislamientos
1	Zr-NW250 VS Pb-NW449
2	Zr-NW250 VS Pb-NW454
3	Zr-NW386 VS Pb-NW449
4	Zr-NW386 VS Pb-NW454

4. 4. 1. Preparación del inóculo

El inóculo se estableció sobre la cara interna de tapas de cajas Petri de 50 mm de diámetro con papel filtro humedecido con agua destilada estéril para inducir la esporulación del hongo. Dicho inóculo consistió de 5 rodajas de micelio de 9 mm de diámetro obtenidas del borde de una colonia de 15 días de edad (“Tapa inóculo”).

Las tapas con los discos de micelio se colocaron en su base correspondiente y se pusieron de manera invertida en una caja de plástico acondicionada para asegurar una humedad relativa alta y favorecer la esporulación. Las cajas se mantuvieron a 22 °C durante 18 h antes de la inoculación de las larvas.

Para estimar la concentración del inóculo, se colocó un disco de hoja de brócoli embebido en 5 ml de agua-agar al 1.5 % en la base de una caja de Petri de 50 mm de diámetro (con el envés hacia arriba); sobre el centro de la hoja se puso un cubreobjetos circular de 10 mm de diámetro. La base se cubrió con su tapa (“Base alimento”).

4. 4. 2. Inoculación

En la “Base alimento” se depositaron 15 larvas de tercer instar temprano y se cubrió con la “Tapa inóculo”, así mientras las larvas se alimentaban iban siendo inoculadas durante la esporulación de las colonias. Este procedimiento de inoculación se aplicó para todas las combinaciones (Cuadro 2).

4. 4. 2. 1. Establecimiento del experimento

Dos grupos de larvas (A-B) se inocularon con *Z. radicans* durante 30 minutos (Tiempo 12 – T12). Otros seis grupos de larvas (C-D, E-F, y G-H) se inocularon independientemente y durante el mismo tiempo a las 4, 8 y 12 horas después, dando lugar a los tiempos 8 (T8), 4 (T4) y 0 (T0), respectivamente. Inmediatamente después de haber inoculado el último par de grupos de larvas (G-H) (T0), solo un grupo de cada par (A, C, E y G) se inoculó simultáneamente durante 30 minutos con un aislamiento de *P. blunckii* (Fig. 1).

El segundo grupo de larvas de cada par (B, D, F y H) no se inoculó con *P. blunckii* y se consideró como el testigo positivo para la infección con *Z. radicans*. De manera simultánea, un grupo diferente de larvas se inoculó únicamente con *P. blunckii*, y se consideró como el testigo positivo para la infección con *P. blunckii*. El testigo negativo para cada uno de los tratamientos (T0 a T12) se estableció en un grupo de larvas sin inocular.

Todos los grupos de larvas tratadas se incubaron a 22° C en cajas ventiladas de poliestireno conteniendo pedazos de hoja de brócoli y se evaluaron cada 24h hasta que todas las larvas murieran o puparan. Las larvas muertas se transfirieron individualmente a papel filtro humedecido, el cual se colocó en la base de una caja de Petri de 50 mm de diámetro. Las bases se cubrieron con las tapas correspondientes en las que previamente se colocaron cubreobjetos. Todas las cajas se incubaron de manera invertida durante 5 días adicionales a 22 °C, de manera que los conidios producidos por las larvas infectadas fueron colectados en los cubreobjetos. El o los causantes de la infección se determinaron por la presencia de conidios de cada especie de hongo (Fig. 2).

Para los experimentos donde se observó la capacidad de *Z. radicans* de infectar larvas con presencia de *P. blunckii* se empleó la misma metodología descrita anteriormente; pero las larvas se inocularon inicialmente con *P. blunckii* y posteriormente con *Z. radicans*.

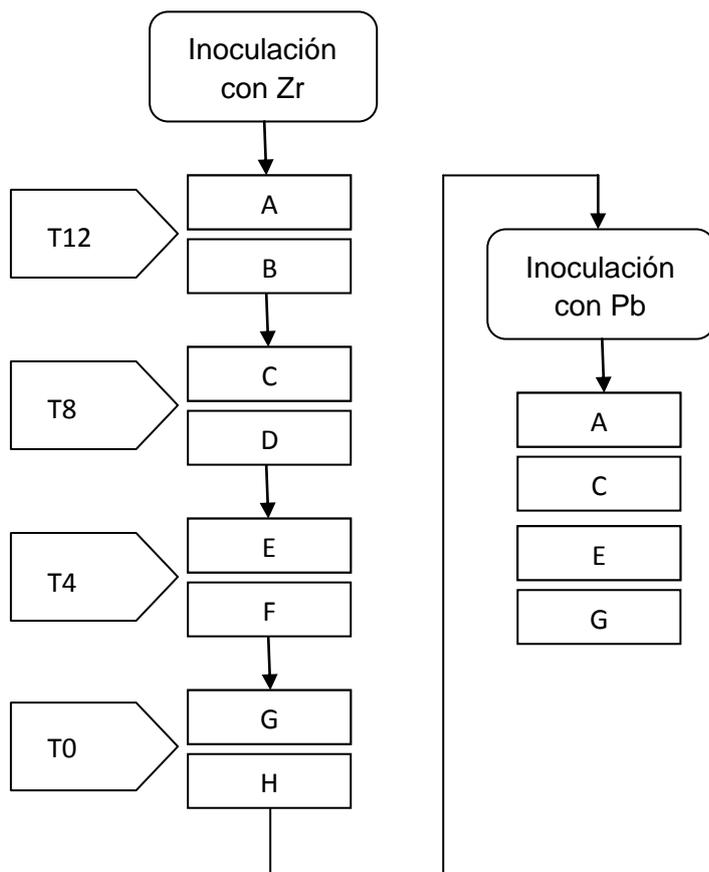


Figura 1. Esquematización del diseño y aplicación de los tratamientos con la combinación de aislamientos.

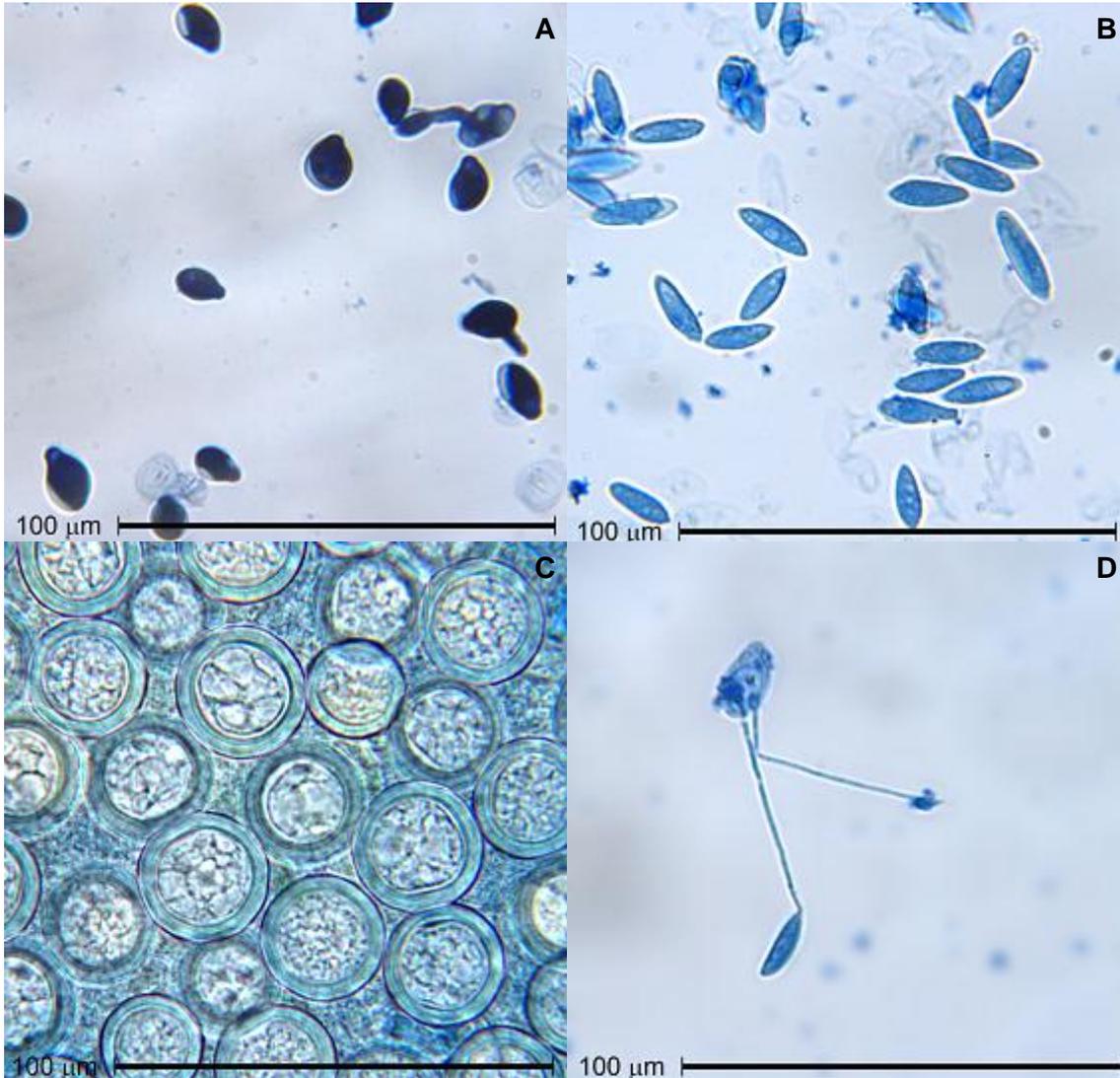


Figura 2. Estructuras para el reconocimiento del patógeno que ganó la infección. A) Conidios de *P. blunckii*. B) Conidios de *Z. radicans*. C) Esporas de resistencia de *Z. radicans*. D) Capiliconidia de *Z. radicans*.

4. 5. Diseño experimental y análisis estadístico

Los experimentos se realizaron bajo un diseño completamente al azar, en donde todos los tratamientos de todas las combinaciones se realizaron el mismo día y en tres ocasiones diferentes.

Los resultados se analizaron por separado para cada combinación de aislamiento y se hizo una regresión logística con cuatro causas de mortalidad como variables; (1) mortalidad por *Z. radicans*, (2) mortalidad por *P. blunckii*, (3) mortalidad por ambos patógenos, o (4) mortalidad por causas no determinadas. La mortalidad se comparó entre los diferentes tratamientos dentro de cada combinación y su interacción con el tiempo transcurrido a partir de su inoculación con el primer patógeno.

Para cada combinación de aislamientos se describieron únicamente las comparaciones en donde se obtuvo un efecto significativo ($P < 0.05$).

V. RESULTADOS

5. 1. Interacción entre los aislamientos Zr-NW386 y Pb-NW449

5. 1. 1. Proporción de larvas infectadas por Pb-NW449

La mayor proporción de larvas infectadas por Pb-NW449 en el tratamiento en donde únicamente se inoculó este aislamiento fue significativamente mayor que en el tratamiento en donde se inocularon ambos patógenos (Pb-NW449 y Zr-NW386) ($F_{1,32}=17.36$, $P<0.001$) (Fig. 3). Sin embargo, la proporción de larvas infectadas por Pb-NW449 se redujo cuando este aislamiento se inoculó primero que Zr-NW386 ($F_{1,32}=11.38$, $P=0.002$) (Fig. 3).

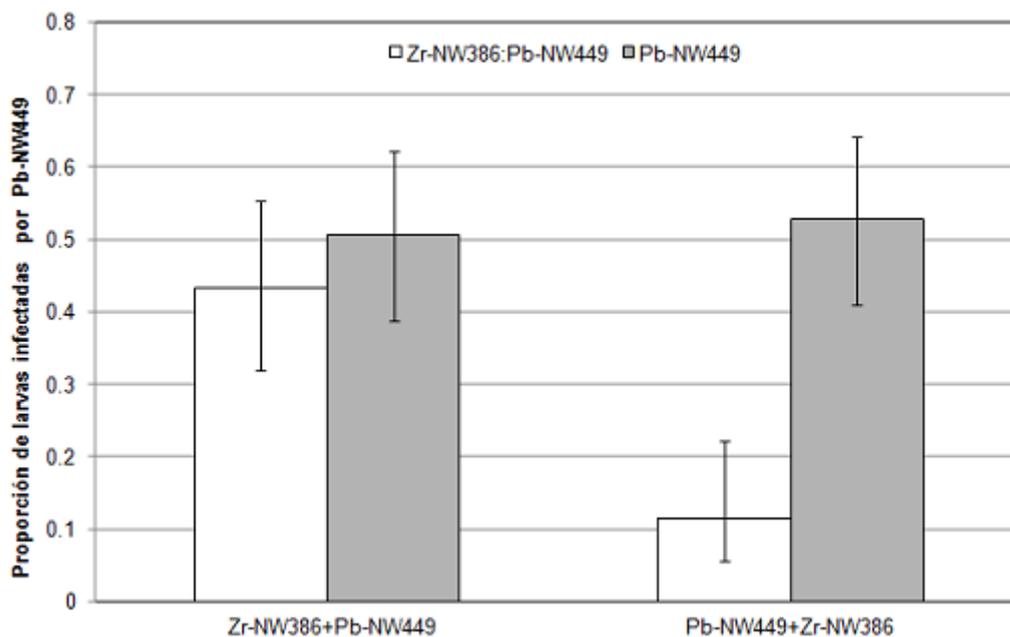


Figura 3. Proporción de larvas de *P. xylostella* infectadas solo por Pb-NW449 y en combinación con Zr-NW386. El orden de colocación del código de cada aislamiento en las leyendas de los tratamientos con inoculación dual (ambos patógenos) representa el orden de inoculación. Las barras de error representan los límites de confianza al 95% transformados a partir de la escala logística.

5. 1. 2. Proporción de larvas infectadas por Zr-NW386

En general, la proporción de larvas infectadas con Zr-NW386 fue mayor en aquellas que solo se inocularon con este aislamiento, en comparación con las larvas inoculadas junto con Pb-NW449 ($F_{1,32}=4.93$, $P<0.034$). Sin embargo, la mayor proporción de larvas infectadas con Zr-NW386 se observó cuando Pb-NW449 se inoculó primero ($F_{1,32}=28.19$, $P<0.001$) (Fig. 4).

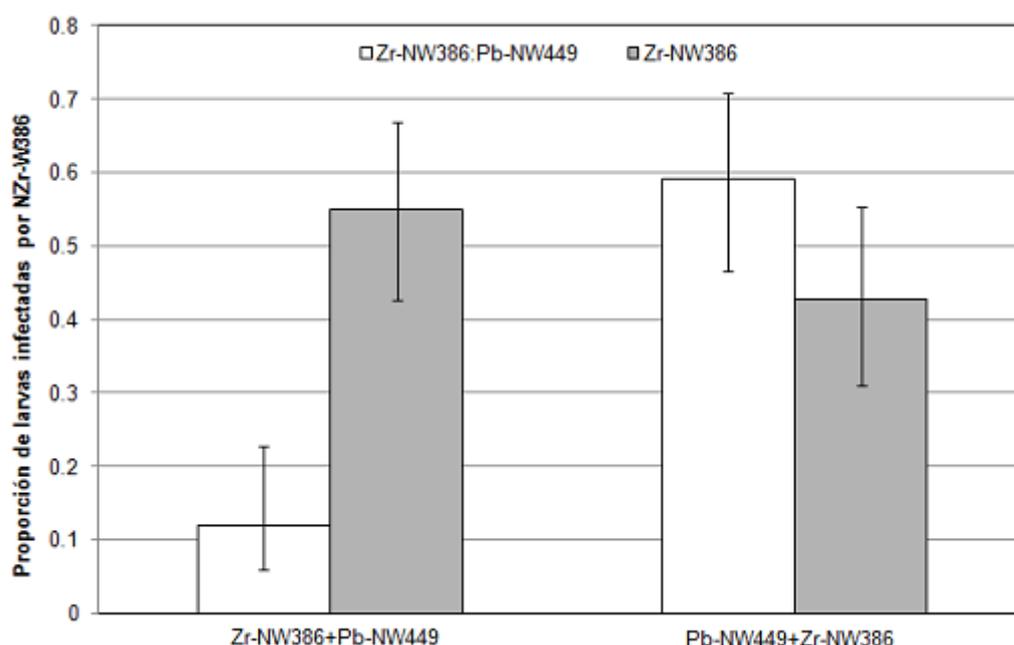


Figura 4. Proporción de larvas de *P. xylostella* infectadas por Zr-NW386 y en combinación con Pb-NW449. El orden de colocación del código de cada aislamiento en las leyendas de los tratamientos con inoculación dual (ambos patógenos) representa el orden de inoculación. Las barras de error representan los límites de confianza al 95% transformados a partir de la escala logística.

5. 1. 3. Proporción de larvas infectadas por Zr-NW386 y Pb-NW449

La proporción de larvas infectadas por ambos patógenos mostró diferencias significativas en función del el orden de inoculación ($F_{1,16}=7.10$, $P=0.017$). La mayor proporción de larvas infectadas se observó cuando Pb-NW449 se inoculó primero (Fig. 5). También se encontró un efecto significativo en la proporción de larvas infectadas con ambos cuando hubo una diferencia

de 60 minutos y cuando hubo una diferencia de cuatro horas (4) ($F_{3,16}=4.61$, $P=0.016$) (Fig. 5).

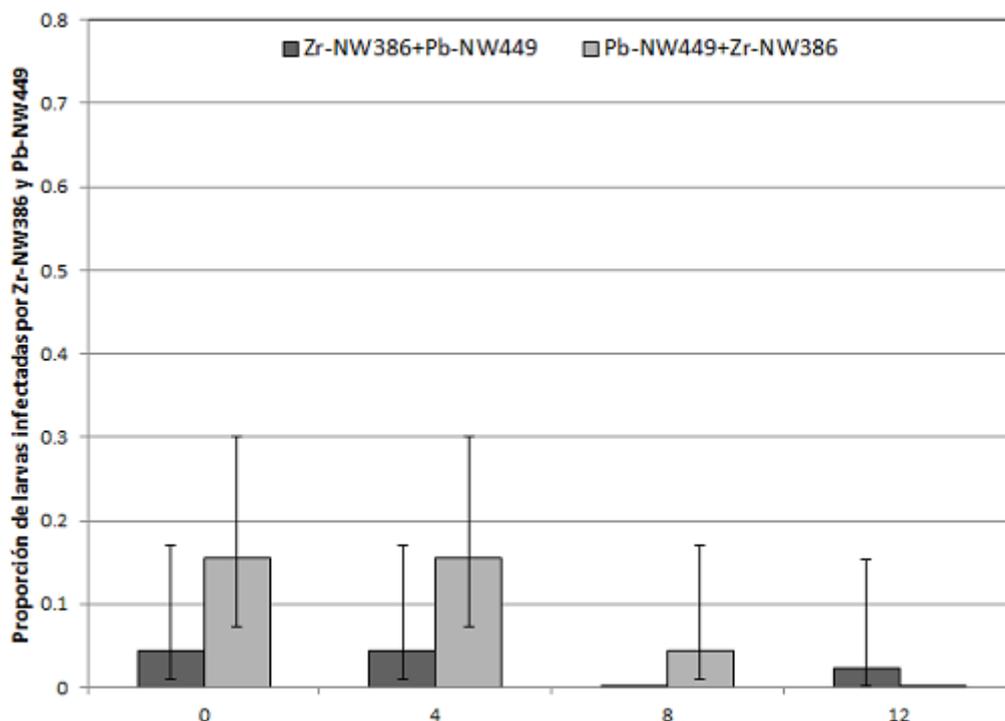


Figura 5. Proporción de larvas de *P. xylostella* infectadas por Zr-NW386 y Pb-NW449. Se muestra infección lograda en tratamientos donde el orden de inoculación fue alternado, y en tratamientos donde se permitió diferentes tiempos (0-12) entre las inoculaciones del primer y segundo patógeno. El orden de colocación del código de cada aislamiento en las leyendas de los tratamientos representa el orden de inoculación. Las barras de error representan los límites de confianza al 95% transformados a partir de la escala logística.

5. 2. Interacción entre los aislamientos Zr-NW250 y Pb-NW449

5. 2. 1. Proporción de larvas infectadas por Pb-NW449

Se encontraron diferencias significativas en las proporciones de infección logradas entre los tratamientos donde únicamente se inoculó a Pb-NW449 y en el tratamiento en el cual se inocularon Pb-NW449 más Zr-NW250

($F_{1,32}=22.97$, $P<0.001$). La mayor proporción de mortalidad se encontró en el tratamiento donde Pb-NW449 se inoculó solo (Fig. 6).

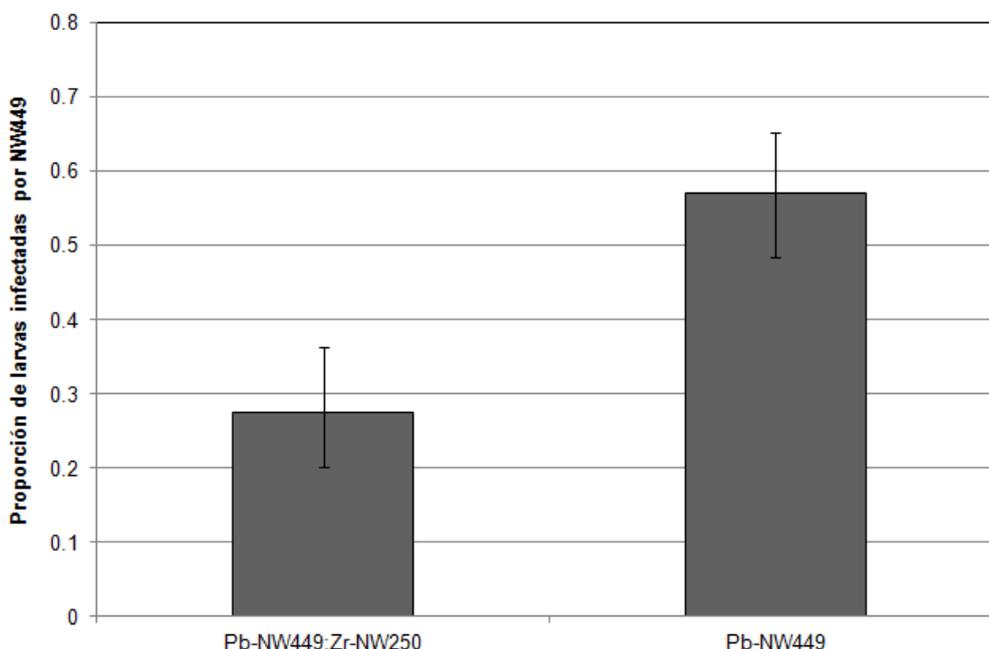


Figura 6. Proporción de larvas de *P. xylostella* infectadas por Pb-NW449 y en combinación con Zr-NW250. Las barras de error representan los límites de confianza al 95%, transformados a partir de la escala logística.

5. 2. 2. Proporción de larvas infectadas por Zr-NW250

La proporción de larvas infectadas con el aislamiento Zr-NW250 fue mayor en el tratamiento donde únicamente se inoculó este patógeno en comparación con el tratamiento donde se inoculó Zr-NW250 mas Pb-NW494 ($F_{1,32}=5.49$, $P<0.025$). Esta diferencia tuvo una interacción significativa con el orden de inoculación ya que la mayor proporción de larvas infectadas por Zr-NW250 fue obtenida cuando este patógeno fue inoculado al último ($F_{1,36}=18.705$, $P<0.022$). En las demás comparaciones no se obtuvieron diferencias significativas en la proporción de larvas muertas ($P>0.05$). La mayor proporción de mortalidad se obtuvo en el tratamiento inoculado únicamente con Zr-NW250 (Fig. 7).

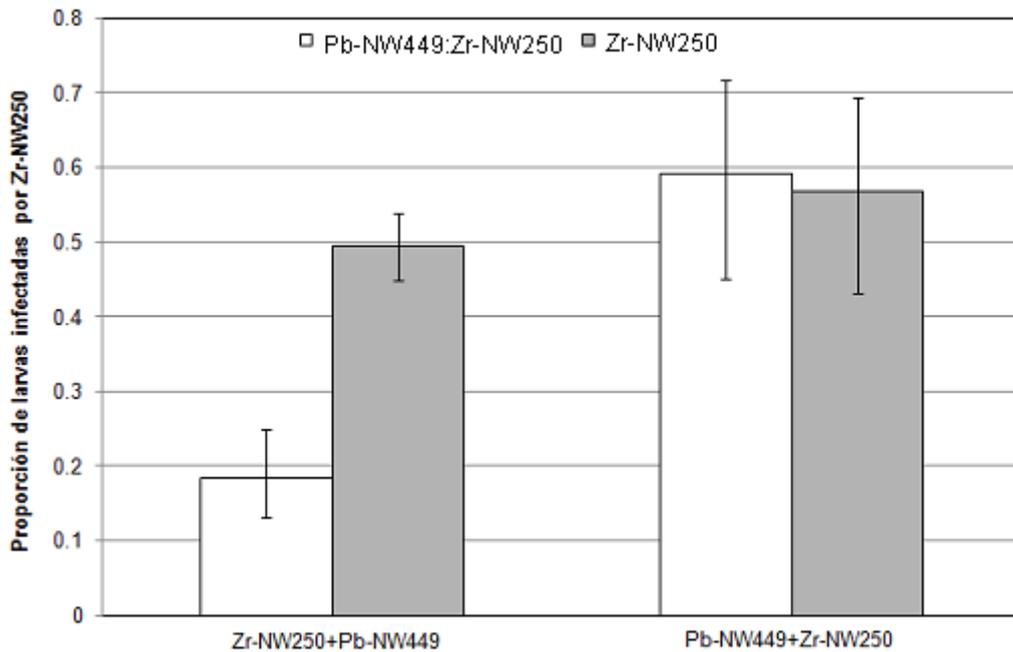


Figura 7. Proporción de larvas de *P. xylostella* infectadas por Zr-NW250 y en combinación con Pb-NW449, donde también se observa el efecto del orden de inoculación. El orden de colocación del código de cada aislamiento en las leyendas de los tratamientos con inoculación dual (ambos patógenos) representa el orden de inoculación. Las barras de error representan los límites de confianza al 95%, transformados a partir de la escala logística.

5. 2. 3. Proporción de larvas infectadas por Zr-NW250 y Pb-NW449

No se encontraron diferencias significativas en la proporción de larvas muertas en ninguna de las comparaciones ($P > 0.05$) (Fig. 8).

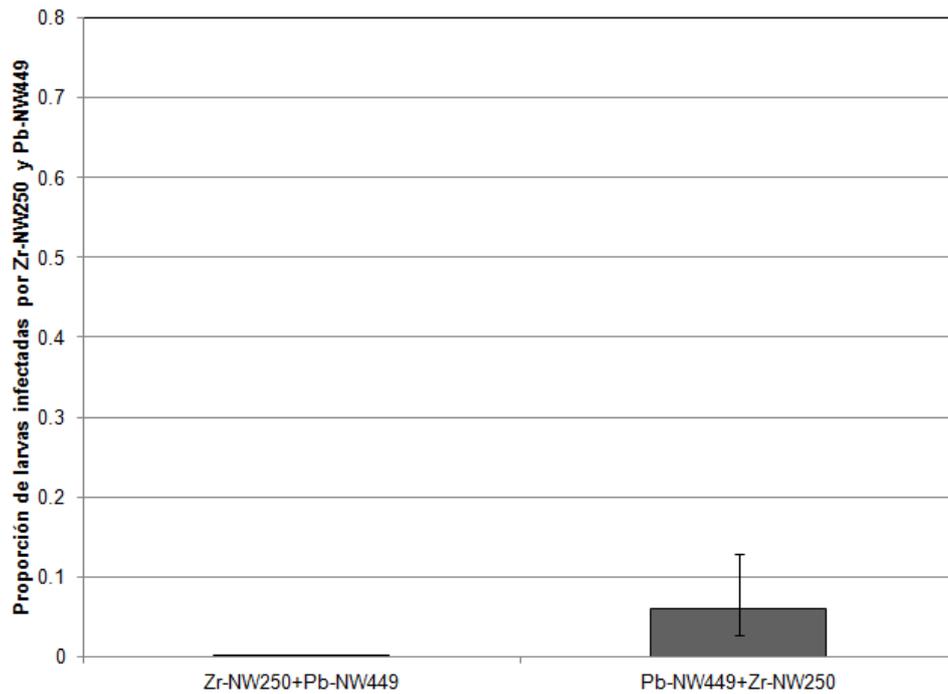


Figura 8. Proporción de larvas de *P. xylostella* infectadas por Zr-NW250 y Pb-NW449. Se muestra infección lograda en tratamientos donde el orden de inoculación fue alternado. El orden de colocación del código de cada aislamiento en las leyendas de los tratamientos representa el orden de inoculación. Las barras de error representan los límites de confianza al 95% transformados a partir de la escala logística.

5. 3. Interacción entre los aislamientos Zr-NW386 y Pb-NW454

5. 3. 1. Proporción de larvas infectadas por Pb-NW454

No se encontraron diferencias significativas en la proporción de la mortalidad entre ninguna de las comparaciones ($P > 0.05$) (Fig. 9).

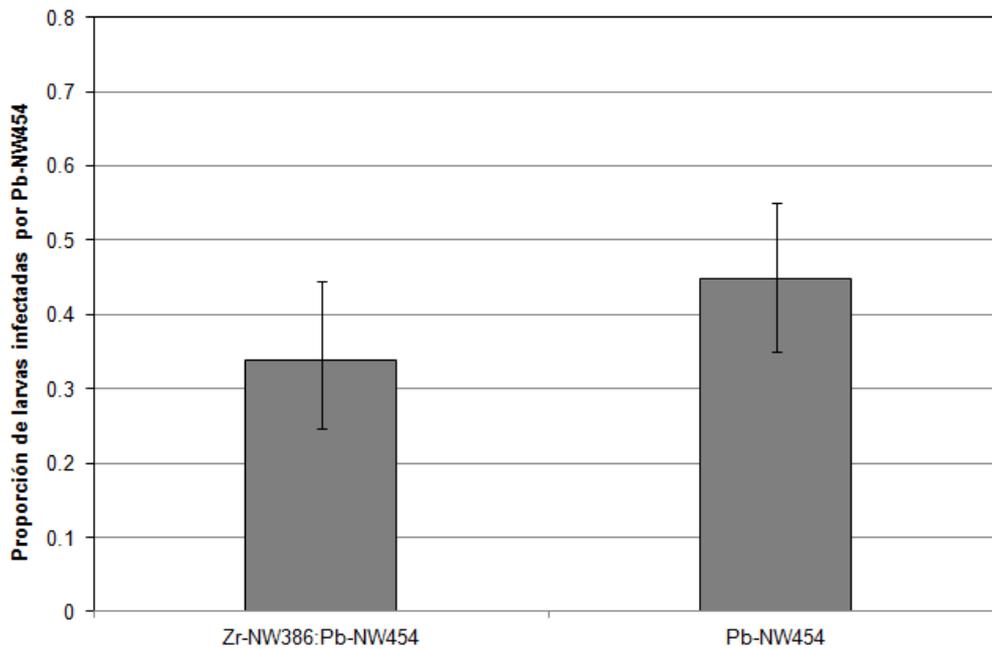


Figura 9. Proporción de larvas de *P. xylostella* infectadas por Pb-NW454 y en combinación con Zr-NW386. Las barras de error representan los límites de confianza al 95%, transformadas a partir de la escala logística.

5. 3. 2. Proporción de larvas infectadas por Zr-NW386

La mayor proporción de larvas infectadas con Zr-NW386 fue obtenida en el tratamiento donde únicamente se inoculó este patógeno en comparación con el tratamiento donde se inocularon ambos patógenos (Zr-NW386 mas Pb-NW454) ($F_{1,32}=8.85$, $P<0.006$). Sin embargo, esta diferencia entre los tratamientos donde únicamente se inoculó Zr-NW386 con respecto al tratamiento donde se inocularon ambos patógenos fue mucho más evidente cuando en los tratamientos con inoculación de ambos patógenos, el aislamiento Zr-NW386 fue inoculado primero ($F_{1,32}=4.71$, $P<0.038$). (Fig. 10).

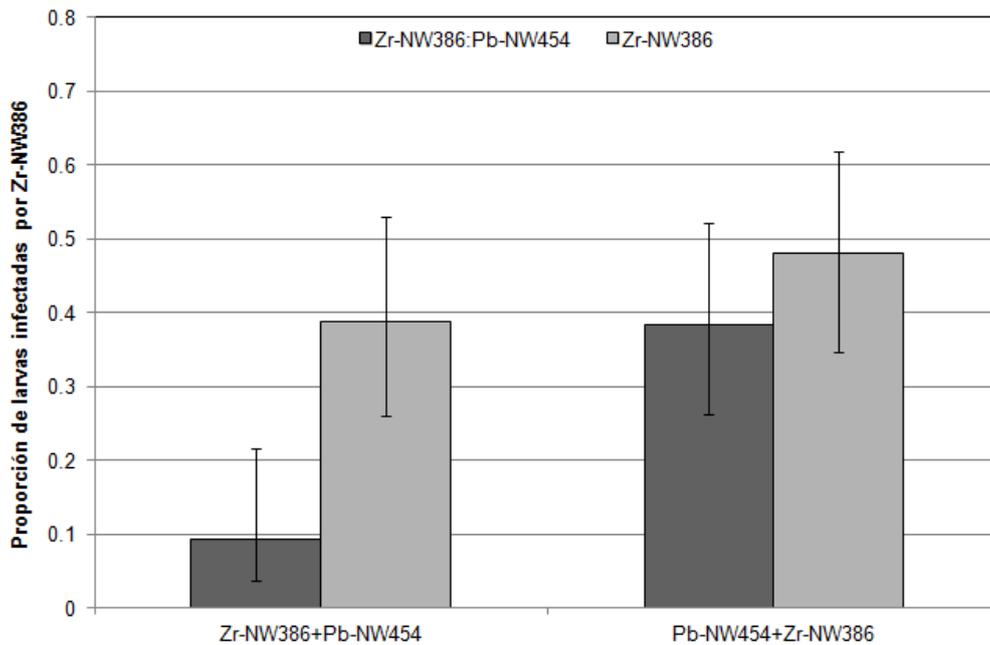


Figura 10. Proporción de larvas de *P. xylostella* infectadas por Zr-NW386 y en combinación con Pb-NW454, donde también se observa el efecto del orden de inoculación. El orden de colocación del código de cada aislamiento en las leyendas de los tratamientos con inoculación dual (ambos patógenos) representa el orden de inoculación. Las barras de error representan los límites de confianza al 95%, transformadas a partir de la escala logística.

5. 3. 3. Proporción de larvas infectadas por Zr-NW386 y Pb-NW454

No se encontraron diferencias significativas en la proporción de mortalidad en ninguna de las comparaciones ($P > 0.05$) (Fig. 11).

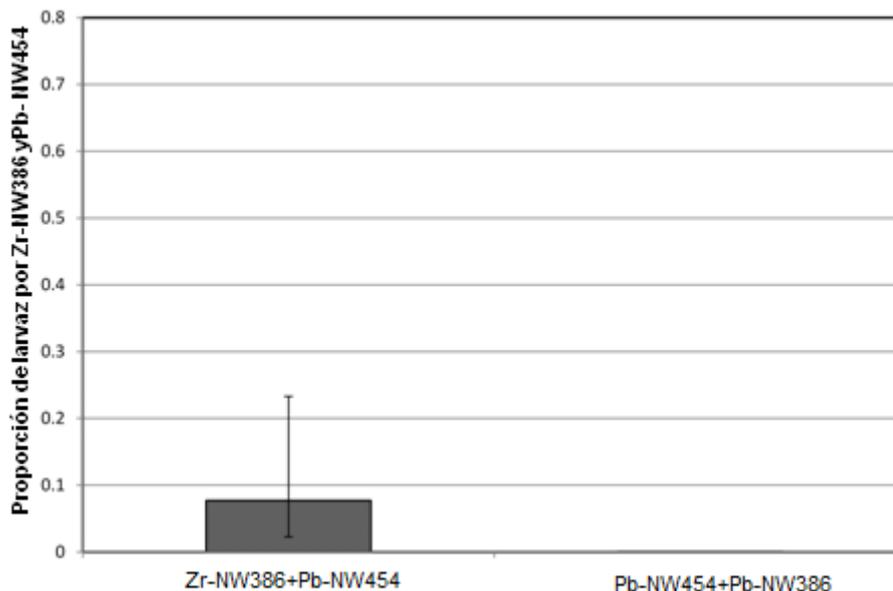


Figura 11. Proporción de larvas de *P. xylostella* infectadas por Zr-NW386 y Pb-NW454. El orden de colocación del código de cada aislamiento en las leyendas de los tratamientos representa el orden de inoculación. Las barras de error representan los límites de confianza al 95% transformadas a partir de la escala logística.

5. 4. Interacción entre los aislamientos Zr-NW250 y Pb-NW454

5. 4. 1. Proporción de larvas infectadas por Pb-NW454

La mayor proporción de larvas infectadas por Pb-NW449 fue obtenida cuando únicamente se inoculó este aislamiento en comparación con el tratamiento donde se inocularon ambos patógenos (Pb-NW454 más Zr-NW250) ($F_{1,32}=8.97$, $P<0.005$) (Fig. 12)

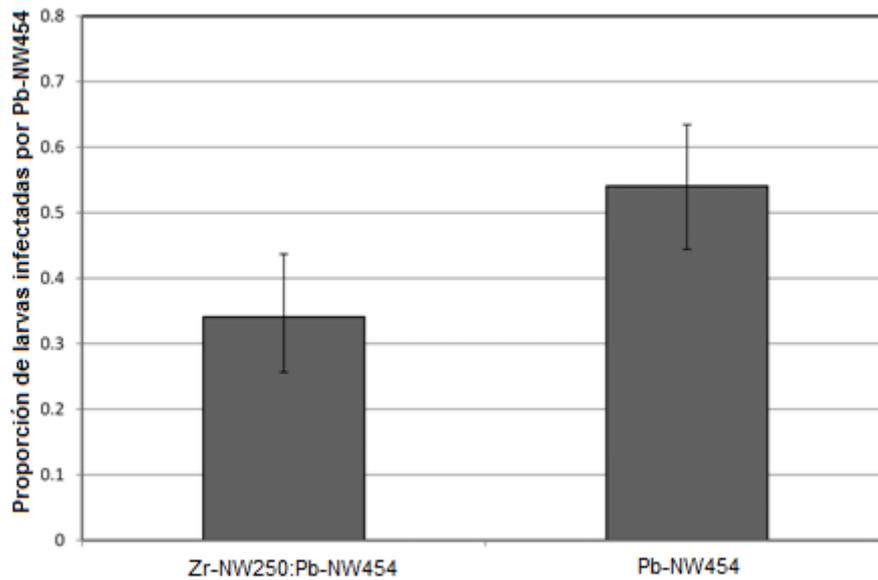


Figura 12. Proporción de larvas de *P. xylostella* infectadas por Pb-NW454 y en combinación con Zr-NW250. Las barras de error representan los límites de confianza al 95%, transformadas a partir de la escala logística.

5. 4. 2. Proporción de larvas infectadas por Zr-NW250

La mayor proporción de larvas infectadas por Zr-NW250 se obtuvo en el tratamiento donde se inoculó únicamente este patógeno en comparación con el tratamiento donde se inoculó Zr-NW250 más Pb-NW454 ($F_{1,36}=10.94$, $P<0.002$). Este resultado tuvo una interacción significativa con el orden de inoculación en los tratamientos donde se inocularon ambos patógenos, ya que la menor proporción de larvas infectadas con Zr-NW250 se obtuvo en el tratamiento donde primero se inoculó Zr-NW250 ($F_{1,36}=7.23$, $P<0.011$) (Fig. 13).

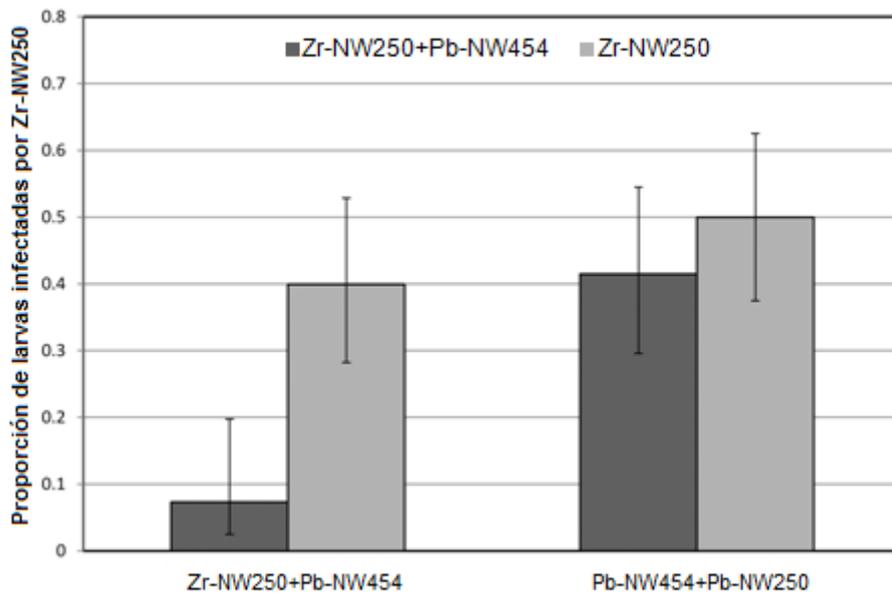


Figura 13. Proporción de larvas de *P. xylostella* infectadas por Zr-NW250 y en combinación con Pb-NW454, donde también se observa el efecto del orden de inoculación. El orden de colocación del código de cada aislamiento en las leyendas de los tratamientos con inoculación dual (ambos patógenos) representa el orden de inoculación. Las barras de error representan los límites de confianza al 95%, transformadas a partir de la escala logística.

5. 4. 3. Proporción de larvas infectadas por Zr-NW250 y Pb-NW454

La mayor proporción de larvas infectadas con ambos patógenos, Zr-NW250 y Pb-NW454, se obtuvo al tiempo 0 seguido por el tiempo 8, lo cual representa el tiempo que se permitió entre la inoculación con respecto del segundo patógeno ($F_{3,16}=3.55$, $P<0.038$) (Fig.14). Dicho resultado no tuvo una interacción significativa con el orden de inoculación del patógeno ($F_{3,16}=2.00$, $P<0.155$).

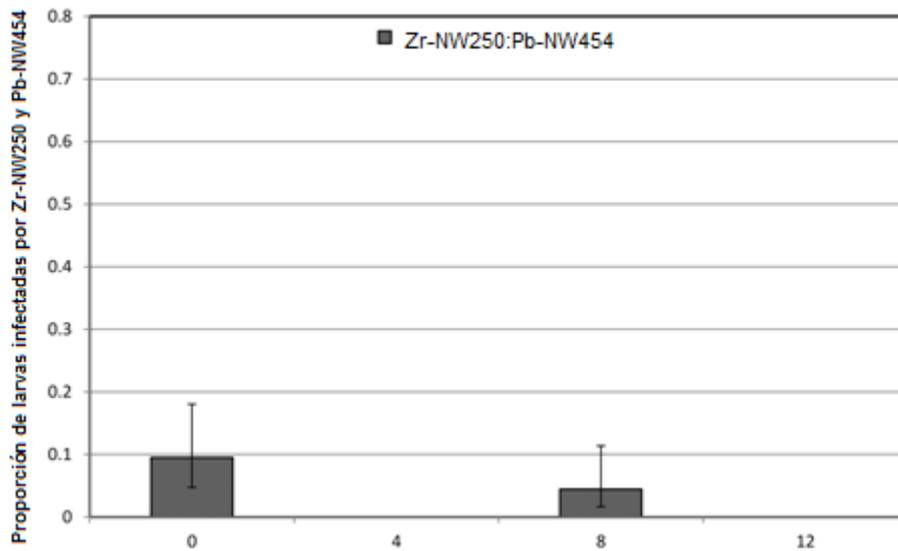


Figura 14. Proporción de larvas de *P. xylostella* infectadas por Zr-NW250 y Pb-NW454. Se muestra la infección lograda en tratamientos donde se permitió diferentes tiempos (0-12) entre las inoculaciones del primer y segundo patógeno. Las barras de error representan los límites de confianza al 95% transformadas a partir de la escala logística.

VI. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos demuestran que aislamientos de ambas especies pueden coexistir en su hospedante; sin embargo, bajo ciertas condiciones una especie es capaz de eliminar a la otra especie. En todas las interacciones, la presencia de dos especies de patógenos en la misma población de larvas disminuyó significativamente la infección por un patógeno determinado, en comparación con las poblaciones de larvas donde únicamente se inoculó un solo patógeno, lo cual ya ha sido reportado por otros autores (Guzmán-Franco *et al.*, 2009), quienes concluyeron que el resultado de la interacción entre aislamientos de estas especies esta determinada por la dosis de inoculación donde el aislamiento con la mayor concentración de conidios logrará infectar a una mayor proporción de larvas. Sin embargo, existen otros factores que también pueden modificar el resultado de una interacción como por ejemplo la virulencia (Gower y Webster, 2005), la dosis (Guzmán-Franco *et al.*, 2009; Staves y Knell, 2010), la relación que exista entre los patógenos (Alizon y van Baalen, 2008; Brown *et al.*, 2002), el orden de inoculación (Thomas *et al.* 2003; Zamora-Macorra *et al.*, en prensa) y el tiempo de residencia de un patógeno en el hospedante con respecto al segundo patógeno (de Roode *et al.*, 2005).

En esta investigación se consideró necesario estudiar dos factores importantes que podría modificar la interacción, como es el orden de llegada de los patógenos involucrados y la diferencia en el tiempo de residencia entre el primer y segundo patógeno dentro del insecto hospedante. En la proporción de larvas infectadas únicamente por un patógeno, independientemente de que haya sido inoculada con uno o dos patógenos, el orden de inoculación tuvo el mayor efecto; sin embargo esto afectó únicamente a los aislamientos de *Z. radicans* (Zr-NW250 y Zr-NW386), ya que al mayor número de larvas infectadas por cualquiera de estos dos aislamientos en los tratamientos inoculados con ambas especies, *Z. radicans* y *P. blunckii*, siempre se obtuvo cuando *Z. radicans* fue inoculado al último (Figs. 2 y 5). Este efecto no se observó con los aislamientos de *P. blunckii*, quienes pudieron infectar larvas de

P. xylostella, aún en presencia de *Z. radicans* sin importar el orden de inoculación y tiempo de residencia de *Z. radicans* en las larvas.

En una competencia entre dos patógenos por el mismo hospedante, es de suponer que el patógeno que llega primero tiene cierta ventaja sobre el segundo, logrando infectar un mayor número de larvas. Esto no fue el caso con los aislamientos de *Z. radicans*, es probable que el sistema inmune de la larva este jugando un papel importante en estas interacciones, como ha sido sugerido previamente (Guzmán-Franco *et al.*, 2011). Cuando *P. blunckii* llega primero a la larva, podría afectar al sistema inmune de la larva, ya que al ser este patógeno específico para este insecto, es posible que haya desarrollado mecanismos eficientes para lidiar con el sistema inmune de la larva e infectarla, favoreciendo al segundo patógeno (*Z. radicans*), el cual encuentra al hospedante debilitado, por lo que no gasta energía al lidiar con el sistema inmune de la larva y emplea toda su energía para desarrollarse e invadir a la larva mas fácilmente que *P. blunckii*. Posiblemente, si ambos patógenos fueran específicos a *P. xylostella*, la competencia sería más fuerte y quizá lleve a una competencia donde ambos patógenos no sobrevivan, resultado ya observado en interacciones entre organismos compartiendo el mismo nicho ecológico (de Roode *et al.*, 2005). En esta investigación todos los aislamientos eran virulentos hacia *P. xylostella* pero en diferentes grados. Para poder confirmar el efecto del sistema inmune, sería conveniente inocular dos especies de hongos, un con virulencia alta y otro completamente avirulento. Este tipo de interacciones ya han sido estudiadas, con otras especies de hongos entomopatógenos (Hughes y Boomsma, 2004), con resultados similares a los aquí observados. Cuando existen recursos limitados, lo más razonable es que el competidor más exitoso sería el que mejor explota al hospedante, y como tal, hace un mayor daño (Bell *et al.*, 2006); sin embargo, estas teorías no consideran el papel del sistema inmune de la larva, la cual puede tener un efecto muy importante.

Las diferencias en el tiempo de residencia entre el primer y segundo aislamiento, que fue desde 12 hasta 0 horas (en intervalos de cuatro horas), únicamente tuvieron un efecto significativo en las proporciones de larvas

infectadas con ambos aislamientos simultáneamente. De manera general podemos observar que las mayores proporciones de infecciones duales fueron en los primeros tiempos; es decir, cuando las diferencias entre el primero y segundo patógeno fue de 0 y 4 horas, y estas proporciones disminuyeron en tiempos mayores de residencia, esto puede deberse a que al inicio de la infección, el hospedante tiene recursos suficientes para sostener a ambos patógenos, los cuales se van agotando a medida de que ambos patógenos se desarrollan. Únicamente en la interacción Zr-NW386 y Pb-NW449 se observó un efecto significativo del orden de inoculación, y en este caso la mayor proporción de larvas infectadas con estos aislamientos de manera simultánea fue cuando Pb-NW449 fue inoculado primero. Esto sugiere que *P. blunckii* puede perder la competencia con *Z. radicans* cuando *P. blunckii* es inoculado primero, pero puede sobrevivir en una población de larvas con la presencia de *Z. radicans* mediante la co-infección como una estrategia de sobrevivencia. En general, es muy difícil plasmar un modelo evolutivo único en el desarrollo de infecciones múltiples, ya que los resultados pueden variar de acuerdo con los aislamientos tratando de infectar al mismo hospedante, así como el efecto de diversos factores que inciden directamente en esta interacción (de Roode *et al.*, 2005).

VII. CONCLUSIONES

En conclusión, los aislamientos tanto de *Z. radicans* como *P. blunckii* pueden infectar larvas previamente inoculadas con uno de estos patógenos. La especificidad de *P. blunckii* hacia *P. xylostella* favorece a su competidor en una interacción directa. *Zoophthora radicans* puede sobrevivir en poblaciones de larvas de *P. xylostella* inoculadas con *P. blunckii*, solo si *Z. radicans* es inoculado al último. *Pandora blunckii* puede infectar larvas inoculadas con *Z. radicans*, independientemente del orden de inoculación.

Ambos patógenos pueden sobrevivir en poblaciones de *P. xylostella* infectando ambos a la misma larva (infección dual), pero esta sucede en las diferencias de tiempo de residencia cortas (4 y 0 horas), y nuevamente para *P. blunckii* esto es independiente del orden de inoculación, y para *Z. radicans*, estos aislamientos deben ser inoculados al último.

La información generada aporta bases ecológicas importantes para el entendimiento de los mecanismos que estas dos especies han desarrollado para sobrevivir en poblaciones de *P. xylostella*, lo que a su vez aportará información valiosa para el futuro desarrollo de estos patógenos como agentes de control microbiano de esta plaga.

VIII. LITERATURA CITADA

Alexopoulos C. J. Mims C. W., Blackwell M. 1996. Introductory Mycology. 4th ed. USA. John Wiley & Sons, Inc. Pp 632.

Alizon S., van Baalen M. 2008. Multiple Infections, Immune Dynamics, and the Evolution of Virulence. *The American Naturalist*. 172, E150-E168.

Anderson R. M., May R. M. 1985. Vaccination and herd immunity to infectious disease. *Nature* 318, 323-329.

Barrera U. R., Bujanos M. R., Rodríguez M. J.C., Mora A. G., Martínez T. M. Á. 2006. Susceptibility to insecticides in populations of *Plutella xylostella* (L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE) from the state of Guanajuato, México. *Agrociencia* 40, 355-362.

Baverstock J., Clark S. J., Alderson P. G., Pell J. K. 2009. Intraguild interactions between the entomopathogenic fungus *Pandora neoaphidis* and an aphid predator and parasitoid at the population scale. *Journal of Invertebrate Pathology*. 102, 167-172.

Begon M., Harper J. L., Townsend C. R. 1996. Ecology: individuals, populations and communities. 3rd ed. Blackwell Science, Oxford, U.K. Pp 1068.

Bell S. A., de Roode C. J., Sim D., Read A. F. 2006. Within-host competition in genetically diverse malaria infections: parasite virulence and competitive success. *Evolution*. 60, 1358-1371.

Ben-Ze'ev I., Kenneth R. G. 1982a. Features-criteria of taxonomic value in the Entomophthorales: I. A revision of the Batkoan classification. *Mycotaxon*. 14, 393-455.

Ben-Ze'ev I., Kenneth R. G. 1982b. Features-criteria of taxonomic value in the Entomophthorales: II. A revision of the genus *Erynia* Nowakowski 1881 (= *Zoophthora* Batko 1964). *Mycotaxon*. 14, 456-475.

Bremermann H. J., Pickering J. 1983. A game-theoretical model of parasite virulence. *Journal of Theoretical Biology*. 100, 411-426.

Brey P. T., Latge J. P., Prevost M. C. 1986. Integumental penetration of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* by *Conidiobolus obscurus* (Entomophthoraceae). *Journal of Invertebrate Pathology*. 48, 34-41.

Brobyn P. J., Wilding N. 1977. Invasive and developmental processes of Entomophthora species infecting aphids. *Transactions of British Mycological Society*. 69, 349-366.

Brodeur J., Rosenheim J.A., 2000. Intraguild interactions in aphid parasitoids. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 97, 93-108.

Brown S. P., Hochberg, M. E., Grenfell B. T. 2002. Does multiple infection select for raised virulence? *Trends in Microbiology*. 10, 401-405.

Bujanos M. R. 2000. Manejo integrado de plagas en crucíferas. 47-61 pp. *In*: Bautista M. N., A. D. Suárez V. y O. Morales G. (eds.). Temas selectos en Fitosanidad de hortalizas. Instituto de Fitosanidad. Colegio de Postgraduados. Montecillos, México.

Butt T. M., Wraight S. P., Galaini-Wraight S., Humber R. A., Roberts D. W., Soper R. S. 1988. Humoral encapsulation of the fungus *Erynia radicans* (Entomophthorales) by the potato leafhopper *Empoasca fabae* (Homoptera: Cicadellidae). *Journal of Invertebrate Pathology*. 52, 49-56.

Chao L., Hanley K. A., Burch C. L., Dahlberg C., Turner P. E. 2000 Kin selection and parasite evolution: higher and lower virulence with hard and soft selection. *The Quarterly Review Biology*. 75, 261-275.

Cox F. E. G. 2001. Concomitant infections, parasites and immune response. *Parasitology*. 122, S23-S38.

Dayan T., Simberloff D. 2005. Ecological and community-wide character displacement: the next generation. *Ecology Letters*. 8, 875-894.

Dixon A. F. G. 2000. Insect predator-prey dynamics. Ladybirds beetles & Biological Control. Cambridge: Cambridge University Press. Pp 260.

de Roode J. C., Culleton R., Cheesman S. J., Carter R., Read A. F. 2004. Host heterogeneity is a determinant of competitive exclusion or coexistence in genetically diverse malaria infections. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 271, 1073–1080.

de Roode C. J., Helinski M. E. H., Anwar M. A., Read A. F. 2005. Dynamics of Multiple Infection and Within-Host Competition in Genetically Diverse Malaria Infections. *The American Naturalist*. 166, 531-542.

Dunphy G. B., Nolan R. A. 1982. Cellular immune response of spruce budworm larvae to *Entomophthora egressa* protoplasts and other test particles. *Journal of Invertebrate Pathology*. 39, 261-263.

Frank S. A. 1996. Models of parasite virulence. *The Quarterly Review of Biology*. 71, 37-78.

Ferguson K. I., Stiling, P. 1996. Non-additive effects of multiple natural enemies on aphid populations. *Oecologia*. 108, 375-379.

Furlong M. J., Pell J. K. 2005. Interactions between entomopathogenic fungi and arthropod natural enemies. Insect-fungal associations: ecology and evolution. Pp. 51-73.

Gillespie J., Kanost M. R., Trenczek T. 1997. Biological mediators of insect immunity. *Annual Review of Entomology*. 42, 611-643.

Glare T. R., Milner R. J., Chilvers G. A. 1989. Factors affecting the production of resting spores by *Zoophthora radicans* in the spotted alfalfa aphid *Theriophis trifolii* f. *maculate*. *Canadian Journal of Botany*. 67, 848-855.

Gower C. M., Webster J. P. 2005. Intraspecific competition and the evolution of virulence in a parasitic trematode. *Evolution*. 59, 544-553

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

Guzmán-Franco A. W., Clark S. J., Alderson P. G., Pell J. K. 2009. Competition and co-existence of *Zoophthora radicans* and *Pandora blunkii*, two co-occurring fungal pathogens of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Mycological Research* 113, 1312-1321.

Hajek A. E., St Leger, R. J. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect host. *Annual Review of Entomology*. 30, 293-322.

Hajek E. A., Papierok B., Eilenberg J. 2012. Methods for study of the Entomophthorales. Cornell University, Department of Entomology, Ithaca, N. Y., USA. Pp 285-316. *In*: Lawrence A. L. 2012. Manual of Techniques in Invertebrate Pathology.

Hodgson D. J., Hitchman R. B., Vanbergen A. J., Hails R. S., Possee R. D., Cory J. S. 2004. Host ecology determines the relative fitness of virus genotypes in mixed-genotype nucleopolyhedrovirus infections. *Journal of Evolutionary Biology*. 17, 1018-1025.

Hughes, W. O. H., Boomsma, J. J., 2004. Let your enemy do the work: within host interactions between two fungal parasites of leaf-cutting ants. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 271, 104-106.

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

Humber R. A. 1984. Foundations for an evolutionary classification of the Entomophthorales (Zygomycetes). *In*: Wheeler Q, Blackwell M (eds) Fungus-insect relationships. Columbia University Press, New York. Pp. 166-183.

Huber R. H. 1989. Synopsis of a revised classification for the Entomophthorales (Zygomycotina). *Mycotaxon*. 34, 441.

Jäger I., Schjørring S. 2006. Multiple infections: Relatedness and time between infections affect the establishment and growth of the cestode *Schistocephalus solidus* in its stickleback host. *Evolution*. 60, 616-622.

Jankevica L. 2004. Ecological Associations Between Entomopathogenic Fungi and Pest Insects Recorded in Latvia. *Latvia Entomology*. 41, 60-65.

Keller S. 1997. The genus *Neozygites* (Zygomycetes, Entomophthorales) with special reference to species found in tropical regions. *Sydowia* 49, 118-146.

Kobayashi Y., Mogami K., Aoki J. 1984. Ultrastructural studies on the hyphal growth of *Erynia neoaphidis* in the green peach aphid, *Myzus persicae*. *Transactions of the Mycological Society of Japan*. 25, 425-434.

Leibold M. A., Holyoak M., Mouquet N., Amarasekare P., Chase J. M., Hoopes M. F., Holt R. D., Shurin J. B., Law R., Tilman D., Loreau M., Gonzalez A. 2004. The metacommunity concept: a Framework for multi-scale community ecology. *Ecology Letters*. 7, 601-613.

Lohr J. N., Yin M., Wolinka J. 2010. Prior residency does not always pay off – co-infections in *Daphnia*. *Parasitology*. 137, 1493-500.

MacLeod D. M., Tyrrell D., Welton M. A. 1980. Isolation and growth of the grasshopper pathogen, *Entomophthora grylli*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 36, 85-89.

Massey C. R., Buckling A., French-Constant R. 2004. Interference competition and parasites virulence. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 271, 785-788.

Mau R. F. L., L. Gusukuma-Minuto. 2001. Diamondback moth resistance to spinosad in Hawaii: confirmation, review of causal factors and Establishment of a mitigation plan. *In: Proceedings of the 5th International Seminar on Technology of Cole Crops Production*. Universidad de Celaya, Guanajuato, México. Pp. 75-80.

McCann K., Hastings A., Huxel G.R. 1998. Weak trophic interactions and the balance of nature. *Nature*. 395, 794-798.

Meister M., Hetru C., Hoffmann J. A. 2000. The antimicrobial host defense of *Drosophila*. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 248, 17-36.

Mideo N., Alizon S., Day T. 2008. Linking within- and between-host dynamics in the evolutionary epidemiology of infectious diseases. *Trends in Ecology and Evolution*. 23, 511-517.

Mideo N. 2009. Evolutionary Parasitology. Parasite adaptations to within-host competition. *Trends in Parasitology*. 25, 261-268.

Minchella D. J. 1985. Host life-history variation in response to parasitism. *Parasitology*. 90, 205-216.

Moore J. 2002. *Parasites and the behavior of animals*. Oxford series in ecology and evolution. Oxford University Press. Pp 338.

Paul R. E. L., Lafond T., Müller-Graf C. D. M., Nithiuthai S., Brey P. T., Koella J. C. 2004. Experimental evaluation of the relationship between lethal or non-lethal virulence and transmission success in malaria parasite infections. *BMC Evolutionary Biology*. 4, 30.

Pedersen A. B., A. Fenton. 2006. Emphasizing the ecology in parasite community ecology. *Trends in Ecology and Evolution*. 22, 133-139.

Pell J. K. 2007. Ecological approaches to pest management using entomopathogenic fungi: concepts, theory, practice and opportunities. In: Ekesi, S., Maniania, N.G. (Eds.), Use of Entomopathogenic Fungi in Biological Pest Management. Research Signpost, Kerala, India. Pp. 145-177.

Pell J. K., Eilenberg J., Hajek A. E., Steinkraus D. C. 2001. Biology, ecology and pest management potential of entomophthorales. In: Butt T.M.; Jackson, C.; Magan, N. ed. Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential. CAB International, Wallingford, UK. Pp. 71-153.

Read A. F., 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, 357-367.

Rolff J., Siva-Jothy M. T. 2003. Invertebrate Ecological Immunology. *Science*. 301, 472-475.

Root R. 1967. The niche exploitation pattern of the blue-grey gnat catcher. *Ecological Monographs*. 37, 317-350.

Rosenheim J. A., Kaya H. K., Ehler L. E., Marois J. J., Jaffee B. A. 1995. Intraguild predation among biological control agent: Theory and evidence. *Biological Control*. 5, 303-335.

Roy H. E., Alderson P. G., Pell J. K. 2003. Effect of spatial heterogeneity on the role of *Coccinella septempunctata* as an intra-guild predator of the aphid pathogen *Pandora neoaphidis*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 82, 85-95

Roy H. E., Pell J. K. 2000. Interaction Between Entomopathogenic Fungi and Other Natural Enemies: Implication for Biological Control. *Biocontrol Science and Technology*. 10, 737-752.

Roy H. E., Steinkraus D. C., Eilenberg J., Hajek A. E., Pell J. K. 2006. Bizarre Interactions and Endgames: Entomopathogenic Fungi and Their Arthropod Host. *Annual Review of Entomology*. 51, 331-57.

Salles P., Bredeweg B., Araujo S., Neto W. 2003. Qualitative models of interactions between two populations. Universidad de Brasilia, Instituto de Ciencias Biológicas. *Binding Environmental Sciences and Artificial Intelligence*. 16, 291-308.

Sarfraz M., Keddie, A. B. Dossall, L. M., 2005. Biological control of the diamondback moth, *Plutella xylostella*: A review. *Biocontrol Science and Technology*. 15, 763-789.

Schjørring S., Koella J. C. 2003. Sub-lethal effects of pathogens can lead to the evolution of lower virulence in multiple infections. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 270, 189-193.

Schmid-Hempel P., Ebert, D. 2003. On the evolutionary ecology of specific immune defence. *Trends in Ecology and Evolution*. 18, 27-32.

Shelton A. M., J. A. Wyman, N. L. Cushing, K. Apfelbeck, T. J. Dennehy, S. E. R. Mahr, y S. D. Eigenbrode. 1993. Insecticide resistance of diamondback moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) in North America. *Journal of Economic Entomology*. 86, 11-19.

Sih A., Crowley P., McPeck M., Petranka J., Strohmeier. 1985. Predation, competition and Prey Communities: A Review of field experiments. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 16, 269-311.

Söderhall K. 1998. Role of the phenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology*. 10, 23-28.

Staves A. P., Knell R. J. 2010. Virulence and competitiveness: testing the relationship during inter- and intraspecific mixed infections. *Evolution*. 64, 2643-52.

Straub C. S., Finke D. L., Snyder W. E. 2008. Are the conservation of natural enemy biodiversity and biological control compatible goals? *Biological Control*. 45, 225-237.

Talekar N.S., A. M. Shelton. 1993. Biolog, ecology and management of the diamondback moth. *Annual Review of Entomology*. 38, 275-301.

Tanada Y., Kaya H. K. 1993. Insect Pathology. Academic Press, New York. Pp. 666.

Thaxter R. 1888. The Entomophthoreae of the United States. *Memoirs read before the Boston Society of Natural History*. 4, 133-201.

Trenczek T. 1998. Endogenous defense mechanisms of insects. *Zoology*. 101, 298-315.

Thomas B. M., Watson L. E., Valverde-Garcia P. 2003. Mixed infections and insect-pathogen interactions. *Ecology Letters*. 6, 183-188.

van Baalen M., Sabelis M. W. 1995. The dynamics of multiple infection and the evolution of virulence. *The American Naturalist*. 146, 881-910.

Velasco-Silva J. L., Alatorre-Rosas R., Pell J. K., 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.

Vizoso D. B. V., Ebert D. V. 2005. Mixed inoculations of a microsporidian parasite with horizontal and vertical infections. *Oecologia*. 143, 157-166.

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

West S. A., Buckling A. 2003. Cooperation, virulence and siderophore production in bacterial parasites. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 270, 37-44.

Wilding N. 1986. The pathogens of diamondback moth and their potential for its control – a review. In: N. S. Talekar & T. D. Griggs eds. *Diamondback moth management*. Proceedings of the first international workshop, Tainan, Taiwan, 11-15 March, 1985. Taiwan: Asian Vegetable Research and Development Center, 219-232.

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

Zamora-Macorra EJ, Guzmán-Franco AW, Pell JK, Alatorre-Rosas R., Suarez-Espinoza J. Order of inoculation affects the success of co-invading entomopathogenic fungi. *Neotropical Entomology* DOI. 10.1007/s13744-012-0075-3, (In press).

Zhao J. Z., Y. X. Li., H. L. Collins., L. Gusukuma-Minuto., R. F. L. Mau., G. D. Thompson, A. M. Shelton. 2002. Monitoring and characterization of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistant to spinosad. *Journal of Economic Entomology*. 95, 430-436.