

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE ECOLOGÍA

RESPUESTAS INMUNES Y SELECCIÓN SEXUAL
EN LA LIBÉLULA TERRITORIAL *Hetaerina*
americana

TESIS

Que para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA
JORGE ALBERTO CONTRERAS GARDUÑO

DIRECTOR DE TESIS:
ALEJANDRO CÓRDOBA AGUILAR

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE ECOLOGÍA
UNAM

AGRADECIMIENTOS

A mis papás, Jorge y Anita por darme la oportunidad de estudiar. A mis hermanos, José, Jessica, Anita y Gustavo por todo su apoyo durante la carrera y el desarrollo de mi doctorado. A mi abuelita Manuella que siempre recordaré. A La familia López Garduño por acogermme en su casa durante un largo tiempo. Al maestro Pedro Gallardo y mi amigo Rubén por alentarme a seguir estudiando. A Yehudi y Oscar Altamirano por apoyarme siempre que fue necesario.

Durante mi formación como biólogo, los siguientes investigadores me motivaron a iniciar el doctorado y a dedicarme a la investigación científica: Hugh Drummond, Constantino Macías y José Luis Osorno.

A mi amigo y profesor Javier Manjares por brindarme apoyo desde mis estudios de licenciatura y aún en el doctorado, me dio soporte académico y logístico.

Al Dr. Alex Córdoba Aguilár por ser un excelente tutor y por su apoyo incondicional. Con su ejemplo me ha alentado para trabajar duro. A las doctoras Robyn Hudson y Roxana Torres por ser parte de mi comité tutorial y aconsejarme de manera atinada sobre el rumbo que debería tomar mi tesis.

Al CONACyT, el Instituto de Ecología (UNAM) y PAPIIT (proyectos no. IN211506 e IN230603) quienes me proporcionaron el apoyo económico necesario para obtener una beca estudiantil, la compra de equipo y material; además del financiamiento para las salidas de campo y las estancias de investigación.

A los doctores Antonio Luna y Ángel Campa (CIBNOR, La Paz, México) por permitirme realizar una estancia de investigación y enseñarme cómo hacer análisis de las enzimas relacionadas con la respuesta inmune. Al Dr. Humberto Lanz (INSP, Cuernavaca, México) que me enseñó las distintas particularidades del sistema inmune de los insectos y por contagiarme su pasión por incluir los mecanismos fisiológicos en los temas ecológicos y evolutivos. Al Dr. Adolfo Cordero (Universidad de Vigo, Pontevedra, España) quien gentilmente me recibió en su laboratorio y gracias a eso conocí la interesante conducta de *Calopteryx virgo*, *C. splendens* y *C. haemorroidalis*.

A Mónica Azpillcueta Amorín, Raquel Bolaños García y José María de Jesús Almonte por darme hospedaje en sus respectivos departamentos durante mis estancias de investigación en Pontevedra, España, La Paz y Cuernavaca, México, respectivamente.

Las críticas del Dr. Armando Iribasi ayudaron a introducirme en el aspecto fisiológico de la conducta y a tratar de medir de manera cuantitativa la respuesta inmune de las libélulas.

A los coautores de los artículos.

A los doctores y doctoras que amablemente revisaron mi tesis: Julio César Carrero, Robyn Hudson, Margarita Martínez, Rogelio Macías, Eduardo Lamoyi, Humberto Lanz. A Ramón Méndez por revisar la redacción de la introducción.

A los cuates del laboratorio de Ecología de la Conducta de Artrópodos y del CICEI que gentilmente me ayudaron con trámites, registro de datos y discusión de artículos.

A mi amigo Guillermo Jiménez Cortés por enseñarme a revisar una y otra vez las cosas (como él dice, me pegó su paranoia) y por apoyarme cada lo necesitó.

A mi amigo Jorge Canales por su valiosa ayuda en campo (aún cuando él tenía bastante trabajo con su tesis), la discusión de artículos, su ayuda con la interpretación de mis datos y todas las noches de desvelo que pasamos por estudiar o ver películas.

A todas aquellas personas que no mencioné aquí pero que aparecen en los agradecimientos de cada artículo.

ÍNDICE

Introducción	Capítulo I
Contreras-Garduño J., Canales-Lazcano J. & Córdoba-Aguilar A. 2006. Wing pigmentation, immune ability, fat reserves and territorial status in males of the rubyspot damselfly, <i>Hetaerina americana</i> . <i>Journal of Ethology</i> . 24: 185-173.	Capítulo II
Contreras-Garduño J., Lanz-Mendoza H. & Córdoba-Aguilar A. 2007. The expression of a sexually selected trait correlates with different immune defense components and survival in males of the rubyspot damselfly. <i>Journal of Insect Physiology</i> . 53: 612-621.	Capítulo III
Contreras-Garduño J., Buzatto B. A., Serrano-Meneses M. A., Nájera-Cordero K. & Córdoba-Aguilar, A. Enviado a <i>Behavioural Ecology</i> The red wing spot of the American rubyspot as a heightened condition-dependent ornament that reflects male fighting ability.	Capítulo IV
Contreras-Garduño J., Buzatto B. A., Abundis L., Nájera-Cordero, K. & Córdoba-Aguilar, A. En prensa. Wing colour properties do not reflect male condition in the American rubyspot (<i>Hetaerina americana</i>). <i>Ethology</i> .	Capítulo V
Córdoba-Aguilar A., Contreras-Garduño J., Luna A., Campa A. & Asensio F. 2006. Sexual comparisons in immune ability, survival and parasite intensity in two damselfly species. <i>Journal of Insect Physiology</i> . 52: 861-869.	Capítulo VI
Discusión General	Capítulo VII
Córdoba-Aguilar A. & Contreras-Garduño J. 2006. Differences in immune ability in forest habitats of varying quality: dragonflies as study models. En: <i>forests and dragonflies</i> . Cordero, A. (editor). Pensoft Publishers. Sofia, Rusia. Pp. 269-278.	Apéndice I
Contreras-Garduño J., Canales-Lazcano J., Juárez-Valdéz N. & Córdoba-Aguilar A. Differences in immune ability and sexual selection intensity in contrasting environments.	Apéndice II

Capítulo I

INTRODUCCIÓN

Capítulo V

Contreras-Garduño J., Buzatto B. A., Abundis L., Nájera-Cordero, K. & Córdoba-Aguilar, A. En prensa. Wing colour properties do not reflect male condition in the American rubyspot (*Hetaerina americana*). Ethology.

Capítulo VI

Córdoba-Aguilar A., Contreras-Garduño J., Luna A., Campa A. & Ascensio F. 2006. Sexual comparisons in immune ability, survival and parasite Intensity in two damselfly species. *Journal of Insect Physiology*. 52: 861-869.



Sexual comparisons in immune ability, survival and parasite intensity in two damselfly species

A. Córdoba-Aguilar^{a,*}, J. Contreras-Garduño^a, H. Peralta-Vázquez^a, A. Luna-González^b,
A.I. Campa-Córdova^c, F. Ascencio^c

^aInstituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. P. 70-275, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, 04510, Coyoacán, Distrito Federal, Mexico

^bCentro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa (CIIDIR), Km. 1 Carretera a Las Glorias, Guasave, Sinaloa, Mexico

^cCentro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), La Paz, B. C. S., 23000, Mexico

Received 14 September 2005; received in revised form 3 May 2006; accepted 8 May 2006

Abstract

Recent evolutionary studies have suggested that females have a more robust immune system than males. Using two damselfly species (*Hetaerina americana* and *Argia tezpi*), we tested if females produced higher immune responses (as phenoloxidase and hydrolytic enzymes), had a higher survival (using a nylon implant inserted in the abdomen and measuring survival after 24 h) and fewer parasites (gregarines and water mites) than males. We also tested whether immune differences should emerge in different body areas (thorax vs. abdomen) within each sex with the prediction that only females with the abdomen having a higher immune response than their thorax since the former area, for ecological and physiological reasons, may be a target zone for increased immune investment. Animals were adults of approximately the same age. In both species, females were more immunocompetent than males, but only in *H. americana* females were immune responses greater in the abdomen than in the thorax. However, there were no differences in survival and parasite intensity or the probability of being parasitised between the sexes in either of the two species. Thus, this study lends partial support to the principle that females are better at defending than males despite the null difference in parasitism and survival.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Immune sexual dimorphism; Phenoloxidase; Hydrolytic enzymes; Survival; Parasitism; Damselflies

1. Introduction

In vertebrates, the fact that females mount better immune responses than males has been explained as a trading off effect of testosterone on males which increases the expression of courtship traits but suppresses immune ability (Folstad and Karter, 1992). This idea, however, has been strongly debated since the precise role of testosterone on immune responses is unclear (e.g. Roberts et al., 2004). Interestingly, the fact that females mount better immune responses than males is not restricted to vertebrates as this also occurs in invertebrates (reviewed by Rolff, 2002; Zuk

and Stoehr, 2002; Schmid-Hempel, 2003). Given that invertebrates do not use testosterone and, nevertheless, show sexual differences in immunity, three hypotheses explaining this dimorphism have been put forward in which it is assumed that immunity is costly (e.g. Siva-Jothy and Thompson, 2002). The first hypothesis is based on the sexual selection pressure faced by males whose investment in immunity will be reduced as a consequence of investing more on secondary sex traits (Zuk, 1990; Zuk and McKean, 1996). The second hypothesis indicates that selection will operate on increasing female longevity as a way to maximise reproductive success via egg production (Rolff, 2002) giving, therefore, high priority to immunity (Rolff, 2002; Zuk and Stoehr, 2002). A more recent hypothesis suggests that rather than being fixed, immunity

*Corresponding author.

E-mail address: acordoba@ecologia.unam.mx (A. Córdoba-Aguilar).

is flexible attending to resource availability with sex specific changes in relation to reproductive opportunities (McKean and Nunney, 2005).

Some evidence in insects suggests that these cost-based hypotheses of the sexual immune dimorphism may explain male and female differences in immunity. For example, in *Drosophila melanogaster*, males that were housed with one female, mounted better immune responses when challenged with *Escherichia coli* than males housed with three females (McKean and Nunney, 2001). Also, males housed with males mounted better responses than males housed with females. These differences are presumably due to the negative effect of courtship behaviour and male–male competition for females on male immunity (McKean and Nunney, 2001).

Despite these sources of evidence, studies that have compared immune response differences and, furthermore, ability to resist an infection in both sexes have been criticised for a number of reasons. For example, it has been suggested that both components of the immune system (humoral and cellular) ought to be measured before conclusions are drawn, as males may have better immunocompetence than females in some particular immune respects but not in others (Zuk and McKean, 1996; Adamo, 2004; Morales-Montor et al., 2004). Furthermore, differences in survivorship after an immune insult should be measured under similar conditions to control for differences in potential ecological pressures that both sexes experience (predators, food access, among others) (Zuk and McKean, 1996; Adamo, 2004). Another potential source of criticism is that selection for immunity may operate differentially in distinct regions of the body in both sexes in insects. For example, a better immune response in the abdomen compared to thorax is expected in females but not in males. Several explanations can be put forward for this: (a) the female abdomen is more likely to be damaged during mating than other body regions (e.g. Crudginton and Siva-Jothy, 2000; Blackenhorn et al., 2002; Reinhardt et al., 2003); (b) the abdomen is a first target zone for sexually transmitted pathogens (Knell and Weberley, 2004); (c) the abdomen is more frequently attacked by predators during oviposition, especially for terrestrial insects that lay eggs underwater (for example, odonates; Corbet, 1999); (d) the abdomen is the place where eggs are produced and, compared to sperm, eggs occupy a larger area so that immune responses should also be more largely distributed in this region; and (e) eggs should be equipped with a robust immune machinery against parasitoids and pathogens (e.g. Asgari et al., 1998). That there are regional differences in immunity in the body has been already documented in invertebrates and vertebrates (Zielinski and Pörtner, 2000; see also Adamo, 2004). However, to our knowledge, these differences have not been examined using an evolutionary perspective. Finally, another criticism is that age has been a confounding variable in many studies (i.e. variation in parasitic infection with age; e.g. Michalakis and Hochberg, 1994).

In this work we have tested the hypotheses that the female's immune response and her survival after an immune challenge are higher than in the male. We used two species of damselflies, *Hetaerina americana* and *Argia tezpi*, to investigate these implications. We measured two immune parameters which provide a general picture of cellular and humoral response, phenoloxidase (PO) activity and hydrolytic enzymes. Although PO participates in non-immune functions (Cerenius and Söderhäll, 2004), the PO cascade also results in the melanisation and death of pathogens (Tzou et al., 2002; Cerenius and Söderhäll, 2004; Christensen et al., 2005), while hydrolytic enzymes are involved in the killing and degradation of micro-organisms (Cheng, 1992; Tzou et al., 2002; Hetru et al., 2003) or modifications of the molecular conformation surface of pathogens, and therefore favour recognition of phagocytic cells (Cheng, 1992; Cajaraville et al., 1995). Additionally, we also compared the types and quantity of proteases in both sexes as these are involved in the activation of PO cascade (Cerenius and Söderhäll, 2004).

First, we compared the immune response of both sexes. Our prediction is that females will have higher immune responses than males. Assuming potential sex-dependent differences in immunity in body regions in the same organism, we also looked for differences between the abdomen and thorax within each sex. Our expectation was that differences should only be observed in females with the abdomen having a higher immune response. We tested the survival of both sexes under a similar immune challenge in their natural conditions. The consequent prediction for this is that more females than males will survive. We also looked for differences in parasite intensity and occurrence in adults of both sexes controlling for host age. Although parasitism rate or probability of being parasitised are not the best indicators of differences in immunocompetence between the sexes due to different exposure to parasites (Rolff, 2002), we wanted to see whether these parameters showed similar sexual differences to those of immunity. We recorded the number of two endo- and ectoparasitic agents, respectively, protozoan gregarines and water mites. A number of studies have shown that these agents are the most common pathogens in odonate adults (reviewed by Corbet, 1999) causing a large negative impact on male and female fitness (for gregarines see for example Siva-Jothy and Plaistow, 1999 and Córdoba-Aguilar et al., 2003; for mites see for example Forbes, 1991; Forbes and Baker, 1991; Braune and Rolff, 2001, but see Andrés and Cordero, 1998). Our predictions were that males are more likely to be parasitised or that, when both sexes are parasitised, males have more parasites than females.

2. Materials and methods

2.1. Immune assessment

H. americana males and females were obtained from the Tehuixtla river (Morelos, Mexico) in May, 2004. *A. tezpi*

Capítulo VII

DISCUSIÓN GENERAL

En este trabajo se exploraron diferentes preguntas que tienen que ver con la señalización de la condición a través de los caracteres sexuales secundarios (CSS) y en particular con la relación entre CSS y la respuesta inmune en la libélula territorial *H. americana*. A continuación resumiré mis resultados, los discutiré en conjunto y mencionaré algunas de las preguntas que derivan de este trabajo.

Los machos territoriales, en comparación con los machos no territoriales de *H. americana*, mostraron una mejor respuesta inmune expresada como capacidad melanótica, cantidad de fenoloxidasa (PO) y enzimas hidrolíticas (EH). Además, tuvieron manchas alares más grandes, más grasa y vivieron por más tiempo después de un reto inmune.

Encontré un fuerte vínculo entre las reservas de grasa y la melanización, pues existió una correlación positiva entre ambas variables, lo cuál persistió después de una pelea larga por el territorio. Además, en la población con aparentemente más recursos, los machos tuvieron manchas más grandes y produjeron melanina con mayor intensidad y más rápido que los machos de la población con pocos recursos.

En general, mis resultados concuerdan con la teoría, ya que los machos señalan su condición a través de sus CSS y tal señalización aparentemente es honesta (Zahavi, 1975; Andersson, 1994; Cotton *et al.*, 2004a), pero en particular, concuerdan con la hipótesis de Sheldon & Verhulst (1996), pues mis datos muestran que las libélulas más pigmentadas también montaron una buena respuesta inmune en comparación con las menos pigmentadas. Esta relación no es nueva y ha llevado a pensar que en calopterigidos tal relación se originó por elección femenina. De acuerdo con esta idea, en algunas especies en donde las hembras eligen a los machos en función de su cortejo y pigmentación se ha visto que los machos con mayor pigmentación alar expresaron más PO (Siva-Jothy, 1999, 2000) y melanización (Córdoba-Aguilar, 2002) que los no pigmentados. Sin embargo, nosotros proponemos que dicha relación pudo haber evolucionado por competencia masculina, pero de manera indirecta. Me refiero a que, los machos podrían señalar su condición (reservas de grasa) a otros machos a través del tamaño de la mancha, pues en *H. americana*, las hembras aparentemente no eligen de manera directa a los machos de manchas grandes, sino que se aparean con los machos territoriales (Grether, 1996a). Dada la relación entre grasa y respuesta inmune, las hembras apareadas con machos territoriales no solo lo harían con machos que tengan buenas reservas de grasa sino también, con machos que tengan una buena respuesta inmune. Dado que el género *Hetaerina* es el menos derivado en los calopterigidos (Misof *et al.*, 2000; Dumont *et al.*, 2005), es posible que en este grupo la relación: elección femenina-respuesta inmune, sea derivada de la relación: competencia masculina-grasa-respuesta inmune.

Por otro lado, se ha propuesto que para que un atributo sexual secundario sea considerado indicador de condición, este debe ser más sensible a los retos ambientales, en comparación con otros atributos no sexualmente seleccionados (Cotton *et al.*, 2004a). Mis datos en *H. americana* apoyan la idea porque el tamaño de la mancha se redujo al someter a los machos adultos inmaduros a constantes retos

Apéndice II

Contreras-Garduño J., Canales-Lazcano J., Juárez-Valdéz N. & Córdoba-Aguilar A. Differences in immune ability and sexual selection intensity in contrasting environments.

Figure 5. Relative time (mean \pm SE) devoted to prey capture in each habitat. Sample sizes are provided in the text.

