



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Elección femenina en *Tenebrio molitor*: Consecuencias
para la progenie

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A
P R E S E N T A :

Alicia Reyes Ramírez



DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Jhony Navat Enríquez Vara
2016

Ciudad de Universitaria, CDMX



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos del alumno

Reyes

Ramírez

Alicia

5549282799

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

10600408-5

2. Datos del tutor

Dr.

Jhony Navat

Enríquez

Vara

3. Datos del sinodal 1

Dr.

Constantino de Jesús

Macías

García

4. Datos del sinodal 2

Dr.

Alejandro

Córdoba

Aguilar

5. Datos del sinodal 3

Dr.

Carlos Rafael

Cordero

Macedo

6. Datos del sinodal 4

Dr.

Jorge Alberto

Contreras

Garduño

7. Datos del trabajo escrito

Elección femenina en *Tenebrio molitor*: Consecuencias para la progenie.

51 p

2016

Agradecimientos

No podría empezar mis agradecimientos de otra manera que no fuera ésta, reconociendo que nada de esto hubiera sido posible sin la parte más fundamental de mi vida, mi familia. Quiero agradecer a mis padres por soportar todo el estrés oxidativo que les ha causado este cuidado parental. A mi hermano por recordarme que no debo de ser tan nerd y por hacerme sonreír a lo largo de la carrera. A Jeremy, porque a veces el ser que más te entiende ni siquiera es de tu misma especie.

Agradecer especialmente a Jhony, mi director de tesis, por sus conocimientos, consejos y paciencia que siempre tuvo incondicionalmente para mí. Por alentarme y darme ánimos durante todo este proceso, sobre todo cuando nos enfrentábamos con dificultades metodológicas.

Otro agradecimiento especial es sin duda alguna para mis sinodales, los doctores Alex, Tino, Carlos y Jorge. Para Alex por confiar en mí desde el primer día que llegué al laboratorio y no sólo preocuparse por mi vida académica, sino también por la personal, he aprendido mucho de usted. A Carlos por el tiempo que me dedicó a lo largo de esta tesis y siempre estar al pendiente. A Jorge por compartir sus conocimientos y su paciencia en la revisión de esta tesis. Y a Tino, por ser una de las primeras personas que hizo que me enamorara de la conducta animal y por estar al pendiente de este proyecto a lo largo del taller.

También a mis compañeros del Laboratorio de Conducta de Artrópodos (David, Aldo, Kari, Ángela, Miguel y Raúl) por haberme recibido de la mejor manera, haciendo que fácilmente me acoplara y brindándome su ayuda en todo momento.

Agradecer a Rose, Sam, Angee y Ricardo por todas las pláticas y risas que hemos compartido. Por estar siempre a través de exámenes, prácticas de campo y finales de semestre conmigo.










A todas las personas, ya sean familiares, amigos, compañeros o profesores, que a lo largo de mi formación fueron un motor que hizo más sencillo poder llegar hasta aquí. Y

finalmente a la UNAM, por permitirme hacer lo que realmente me apasiona y ser un segundo hogar desde hace diez años cuando entré a Iniciación Universitaria.

Parte de mi tesis fue financiada por los proyectos PAPIIT 203115, Biología de la Conservación de las Libélulas Mexicanas, y PAPIME PE206415, como uso de videos como material de apoyo para el curso Ecología de la Conducta.

A todos ustedes, muchas gracias.

ÍNDICE

 Resumen.....	5
 Introducción	
▪ Teoría de la Selección Sexual.....	6
▪ Resistencia a patógenos.....	10
▪ Comunicación química y las feromonas.....	11
▪ Especie de estudio: <i>Tenebrio molitor</i>	12
 Hipótesis.....	15
 Objetivos.....	15
 Metodología	
▪ Cría de <i>Tenebrio molitor</i>	16
▪ Bioensayo con hongo entomopatógeno	
✓ Origen y cultivo del hongo entomopatógeno.....	17
✓ Preparación del inóculo.....	17
✓ Determinación de la CL ₅₀	17
▪ Ensayos de elección	
✓ Pruebas de elección femenina.....	18
▪ Efectos sobre la descendencia	
✓ Determinación de variables morfométricas y fisiológicas de los huevos.....	21
✓ Determinación de proteínas y lípidos totales en los huevos.....	23
 Resultados	
▪ Pruebas de elección femenina y tiempos en la elección.....	26
▪ Efectos sobre la descendencia	
✓ Número de huevos.....	28
✓ Número de huevos que eclosionaron.....	29
✓ Volumen de los huevos.....	30
✓ Proteínas y lípidos totales en los huevos.....	30
 Discusión.....	33
 Conclusión.....	39
 Referencias.....	41

RESUMEN

Se ha propuesto que los caracteres sexuales secundarios son señales honestas mediante las cuales las hembras reconocen la condición de los machos con los cuales van a aparearse. La resistencia a patógenos forma parte de la condición y por ello las hembras prefieren aparearse con machos que tienen bajos niveles de patógenos o que no están infectados. Las feromonas sexuales se consideran señales que reflejan la inmunocompetencia que presentan los machos, ya que son costosas de producir, se secretan en bajas concentraciones y cambian cuantitativamente en períodos cortos de tiempo. Se cree que la producción de feromonas y las funciones inmunes son dependientes entre sí, por lo cual al exponer a los machos ante un reto inmune ocurrirá una disyuntiva entre invertir recursos hacia la síntesis de feromonas o atacar al patógeno. En el escarabajo *Tenebrio molitor*, se sabe que los machos producen feromonas para atraer a las hembras y de acuerdo con la hipótesis del handicap se esperaría que éstos al enfrentarse con un reto inmune no sean tan atractivos para las hembras en comparación con los machos sanos. En este estudio se puso a prueba la elección femenina en *T. molitor* entre machos de buena condición y machos con un reto inmune (dos tratamientos: retados con implantes de nylon y retados con un hongo entomopatógeno, *M. robertsii*). Se esperaba que la elección de las hembras tuviera un efecto sobre su progenie a nivel de número de huevos puestos, volumen y porcentaje de eclosión de los huevos, así como concentración de proteínas y lípidos totales. Se encontró que: 1) Las hembras eligieron más a machos infectados por el entomopatógeno, 2) no hubo diferencia en el número de huevos entre tratamientos, 3) los huevos de tratamientos con retos inmunes presentaron una menor eclosión, 4) los huevos del tratamiento de machos retados con el hongo fueron de menor volumen, 5) no se encontraron diferencias en cuanto a la concentración de proteínas totales y 6) la concentración de lípidos totales fue menor en los tratamientos manipulados. Una interpretación de estos es que los machos están recurriendo a la inversión terminal para aumentar su atractivo en lugar de combatir contra el reto inmune, ya que la elección de las hembras no parece ser benéfica para su progenie.

INTRODUCCIÓN

Teoría de la Selección Sexual

Darwin desarrolló en “El origen de las Especies” (1859) y más ampliamente en “El Origen del Hombre y la Selección en Relación al Sexo” (1871), un tipo de selección natural, al que nombró selección sexual. Este proceso fue una explicación para entender por qué se mantenían ciertos rasgos que no estaban involucrados con la supervivencia, sino que más bien la reducían y por lo tanto no concordaban con la forma de actuar de la selección natural. Darwin definió a la selección sexual como la ventaja que tienen ciertos individuos sobre otros del mismo sexo y especie, en relación exclusiva para la reproducción. A estos rasgos sobre los cuales actúa la selección sexual los denominó como caracteres sexuales secundarios y ejemplos de ellos son los cuernos, coloraciones llamativas y cantos elaborados (Darwin 1871).

La selección sexual a su vez puede separarse en dos en dos rubros: la selección intrasexual en la que los individuos de un mismo sexo, generalmente los machos, compiten entre ellos para tener acceso a la cópula. Por ejemplo, los machos del borrego cimarrón y alces, utilizan sus largas astas para pelear con otros machos, y son los machos con astas más largas que tienen más éxito de copular con las hembras, que los machos de astas más cortas (Miller y Somjee 2014). La segunda es la selección intersexual en la que los individuos de un sexo, generalmente las hembras, son las que eligen con quien aparearse. Por ejemplo, las hembras del ave estornino *Sturnus vulgaris*, eligen a los machos que presentan cantos muy elaborados, mientras que en el caso del pavo real *Pavo cristatus*, las hembras prefieren a los machos con los plumajes más vistosos (Petrie *et al.*, 1991; Martín-Vivaldi y Cabrero, 2002).

Dentro de la selección sexual también vamos a encontrar el conflicto entre sexos, que de acuerdo con Macías (2002) puede definirse como toda aquella manifestación de las diferencias en los intereses genéticos de machos y hembras relacionadas con la formación de parejas reproductivas. Para entender no solo el conflicto entre sexos, sino también el origen de la reproducción sexual, así como el dimorfismo sexual, debemos de tener

presente el papel que tiene la anisogamia. La reconstrucción de la historia de la selección sexual, parte del supuesto de que la isogamia (misma forma de los gametos) fue la condición originaria y primitiva, mientras que la anisogamia (dimorfismo gamético) es la forma derivada, producto de la selección natural (Bjork y Pitnick, 2006). Para que la formación del cigoto sea exitosa, se requiere que los gametos cuenten con los recursos necesarios y por otro lado la movilidad para encontrarse. La selección natural por lo tanto estaría favoreciendo dos estrategias alternativas: a) la máxima movilidad sacrificando la cantidad de reservas y b) la máxima acumulación de recursos para el desarrollo, sacrificando la movilidad. Es por ello que uno de los tipos de selección natural, la selección disruptiva, puede explicar el surgimiento de un gameto grande, con muchos nutrientes y costoso como lo es el óvulo, y un gameto pequeño, móvil pero con pocos recursos, como el espermatozoide (Kokko *et al.*, 2006).

En 1948, Bateman encontró en *Drosophila melanogaster* que en los machos la relación entre el éxito del apareamiento y la fertilidad parece lineal, de tal manera que su éxito se ve limitado por el número de veces que pueden aparearse. Por el contrario en las hembras observó que la relación era muy diferente y sus limitaciones se encontraban en su capacidad para producir los huevos y ganar muy poco (en términos del número de descendientes) al copular con varios machos. Esto se conoce como el Principio de Bateman, en donde queda expuesto el conflicto de intereses entre los machos y las hembras, al ser los óvulos energéticamente costosos y por ende escasos, se convierten en el recurso limitado por el que compiten los espermatozoides que son abundantes por ser más baratos. Promoviendo que la selección favorezca la capacidad competitiva por parte de los machos y la selectividad por parte de las hembras (Jones *et al.*, 2000).

Existen diversas hipótesis para explicar la evolución de la elección femenina. En los años treinta, Fisher propone el concepto de proceso desbocado para referirse al hecho de que una característica que originalmente se encontraba en los machos de una población por motivos adaptativos, puede cambiar si las hembras prefieren aparearse con los machos que poseen este carácter más desarrollado (Macías 1993). Tanto la señalización por los machos como la preferencia de las hembras, derivan en un proceso de retroalimentación positiva, conocido

como selección desbocada o “runaway selection” (Fisher 1930). Este proceso requiere de un gen que codifique para la expresión del ornamento en los machos y un gen responsable de la preferencia de las hembras por tal ornamento. Como consecuencia ambos genes se heredarán juntos mediante el desequilibrio gamético. Sin embargo, la presión que están ejerciendo las hembras sobre los ornamentos, provocaría que cada vez éstos fueran más conspicuos, hasta tal punto que empezarían a ser castigados por la selección natural, ya que, por ejemplo, al ser tan llamativos estarían también atrayendo con mayor facilidad a los depredadores y por lo tanto disminuyendo sus probabilidades de sobrevivir. Posteriormente Weatherhead y Robertson propusieron la hipótesis del hijo sexy, la cual predice que los caracteres sexuales secundarios en los machos, representan sólo mayor atractivo para las hembras, por lo cual éstas compensan su éxito reproductivo aumentando el número de descendientes debido a su atractivo (Weatherhead y Robertson, 1979; Contreras *et al.*, 2005; Huk y Winkel, 2008).

Por otra parte, Zahavi en los años setentas, propone la hipótesis del handicap, de los buenos genes o principio de las desventajas, que a diferencia de Fisher, plantea que los ornamentos elaborados son un reflejo o una respuesta honesta de la condición de los individuos. Zahavi llegó a esta conclusión al plantear que producir y mantener estas señales es costoso, y por lo tanto deberían de ser indicadores de que los individuos que los expresan también poseen buenos genes y que indirectamente las hembras estarían eligiéndolos para asegurarse que sus hijos también los tendrán (Zahavi 1977).

En aquellas especies en las cuales los machos únicamente proporcionan gametos, la adecuación de las hembras solo aumentará a través de la adecuación que posea su descendencia (Kokko *et al.*, 2003). Es decir, que las hembras al discriminar entre los machos por la calidad de las señales que despliegan, aumentan su éxito reproductivo al producir crías de alta calidad (Simmons 1987; Andersson y Simmons, 2006). Por ejemplo en algunas especies de aves, las plumas de la cabeza y de la cola, pueden ser buenas indicadoras de la calidad del macho, en las viudas del paraíso de cola larga (*Euplectes progne*), las hembras presentan una coloración marrón con pequeñas manchas oscuras y una cola corta, mientras que los machos son de mayor tamaño, de color negro brillante y

franjas alares rojas, así como una cola de casi medio metro de longitud. Andersson manipuló la longitud de la cola de los machos teniendo tres tratamientos: el control a los cuales se les cortó la cola y se les volvió a pegar, el tratamiento con cola corta y el tratamiento con cola más larga a los cuales se les pegó la cola recortada del tratamiento anterior, y obtuvo que los machos del tratamiento de colas más largas consiguieron atraer a su territorio cuatro veces más hembras en comparación con los otros dos tratamientos (Andersson 1982). Otro ejemplo lo encontramos en los grillos (*Gryllus bimaculatus*), las hembras que se aparean con machos de mayor tamaño, tienen un mayor número de huevos, en comparación con las que se aparean con machos de menor talla (Simmons 1987).

En otro ejemplo, en el pez *Poecilia reticulata* se ha encontrado el mismo patrón que en los insectos, las hembras prefieren aparearse con machos de tallas grandes, colas largas y patrones brillantes de coloración; cuando copulan con éstos la descendencia presenta una mayor tasa de crecimiento, y en particular las crías hembras presentan un mayor rendimiento reproductivo, es decir que el handicap gana por la vía de las hijas, ya que éstas heredan los buenos genes pero no asumen las consecuencias de expresar el ornamento (Reynolds y Gross, 1992). Además de los beneficios de elegir un buen macho, en las palomillas de la especie *Utetheisa ornatrix*, las hembras obtienen tanto beneficios directos como indirectos al aparearse con machos de mayor tamaño, ya que los huevos son menos depredados debido a los alcaloides que el macho da a la hembra junto con el esperma, y por otro lado la progenie tiene mayor éxito en el cortejo y la fecundidad, al heredar la masa corporal (Iyengar y Eisner, 1999).

Al aparearse las hembras también tienen que evaluar otras inversiones, ya sea en su crecimiento y supervivencia o en otros eventos reproductivos (Vincent *et al.*, 1994). De acuerdo con la hipótesis de asignación diferencial, los individuos que se aparean más de una vez deben valorar cuánto van a invertir en la reproducción con su actual pareja, teniendo en cuenta las posibles parejas en un futuro (Kokko y Johnstone, 2002). Es decir, que esta asignación diferencial de los recursos, permite regular la inversión de acuerdo con el atractivo de la pareja actual (Loyau *et al.*, 2007), dado las probabilidades de encontrar una pareja de mayor calidad posteriormente (Burley 1988; Sheldon 2000). Por lo tanto

predice que se asignarán más recursos a la progenie cuando la pareja sea de mayor calidad, y menor cantidad de recursos o incluso evitar aparearse, cuando ésta sea de menor calidad (Braga *et al.*, 2010). Estos recursos adicionales pueden expresarse como un aumento en el tamaño de los huevos (Kolm 2001), el número de huevos (Locatello y Neat, 2005), en anticuerpos (Saino *et al.*, 2003) y nutrientes como lípidos y proteínas (Braga *et al.*, 2010).

Resistencia a patógenos

Una de las propuestas mejor estudiadas de la hipótesis del handicap, fue realizada por Hamilton y Zuk (1982), al estudiar la relación de los caracteres sexuales secundarios y la resistencia a los parásitos. Estos autores sugirieron que las hembras prefieren aparearse con machos que exhiban señales sexuales vistosas por ser los más sanos y resistentes a patógenos. Por ello, las hembras prefieren a machos no infectados o con bajos niveles de parásitos y patógenos, ya que éstas obtienen beneficios directos como regalos nupciales, mayor calidad del esperma y por lo tanto una mejor fecundidad; así como beneficios indirectos, por ejemplo que sus hijos sean más resistentes a los parásitos y una mayor dedicación al cuidado parental (Worden *et al.*, 2000). De tal manera que, al evitar aparearse con machos enfermos, las hembras reducen el riesgo de infectarse, obtienen una mayor inversión por parte del otro sexo y aumentan la resistencia de su progenie hacia los parásitos. La relevancia que tuvo esta versión de la hipótesis del handicap, es que tiene una extensa aplicación, al ser los patógenos agentes de selección ampliamente extendidos. Además la rápida evolución de los patógenos promueve que se genere variación y que por lo tanto la resistencia a éstos siga confiriendo una ventaja para los individuos que la portan (Hamilton y Zuk, 1982).

Pero cuando el sistema inmune se enfrenta contra parásitos y patógenos, es posible que también se altere la percepción de la probabilidad de sobrevivir del organismo, ya que cada infección representa una amenaza en su supervivencia (Sadd *et al.*, 2006). Si esta probabilidad es percibida como muy baja, el organismo decide invertir todos sus recursos hacia la reproducción (Agnew *et al.*, 2000). Esta inversión puede traducirse en el aumento de los caracteres sexuales secundarios que son atractivos para las hembras, con el fin de que

los machos aumenten sus probabilidades de apareamiento, con lo cual las señales que están recibiendo las hembras no son honestas en términos de la condición de salud que presentan sus parejas.

Comunicación química y las feromonas

La comunicación química entre los sexos se produce en muchas especies de los tres dominios. Existe una amplia diversidad en los mecanismos de mediación para esta comunicación, dando como resultado el dimorfismo sexual entre el emisor y el receptor. Por ejemplo las hembras de las lampreas (*Petromyzon marinus*) son atraídas por la testosterona y otros compuestos que se encuentran en la orina de los machos; mientras que en los lagartos como las iguanas (*Iguana iguana*), se observa que los machos liberan feromonas sexuales a través de grandes glándulas femorales, secreciones que permiten informar sus niveles de andrógenos, así como su estatus de dominancia, entre otros atributos (Penn y Potts, 1998). Las señales químicas como las feromonas, no han sido del todo estudiadas, pero éstas también pueden anunciar la salud o condición de los individuos (Penn y Potts, 1998; Martín y López, 2000), de hecho se ha propuesto que son indicadores más eficaces y directos que los rasgos morfológicos (Endler 1993; Penn y Potts, 1998). Ya que las señales químicas proporcionan información acerca de la compatibilidad genética, que tienen los individuos respecto a los *loci* que controlan el reconocimiento inmune de parásitos.

Las feromonas son sustancias que han evolucionado, un individuo las secreta e influyen sobre la conducta de otro individuo de la misma especie, a favor del que las libera (Wyatt 2003). Las feromonas pueden clasificarse según su función, en feromonas sexuales y feromonas de agregación. Por ejemplo, en los ratones (*Mus musculus*) los machos liberan feromonas sexuales que tienen un efecto en las funciones neuroendócrinas de las hembras, como son la aceleración de la pubertad y la inducción del celo, así como desencadenar conductas asociadas con la atracción (Halpern y Martínez-Marcos, 2003). En la mayoría de los lepidópteros, las feromonas sexuales son liberadas por las hembras, para que los machos puedan localizarlas desde grandes distancias (Roelofs y Cardé, 1977). Algunos ejemplos de

feromonas de agregación los encontramos en los machos de varias especies pertenecientes a la subfamilia Cerambycinae (Lacey *et al.*, 2007), o los machos de la langosta del desierto *Schistocerca gregaria*, cuya feromona de agregación cambia cualitativa y cuantitativamente, dependiendo de si se criaron con otros machos o fueron solitarios (Rono *et al.*, 2008). Las feromonas podrían ser un buen indicador de la condición en la que se encuentra el individuo en ese momento, dado que éstas cambian cuantitativamente en períodos de tiempo cortos, además de ser secretadas en pocas cantidades, dado que son costosas si se sintetizan *de novo* (Ahtiainen *et al.*, 2005).

El costo metabólico que implica la producción de feromonas es bajo en comparación con el costo de otras señales, por ejemplo mientras que en el escarabajo *Anthonomus grandis*, los machos únicamente invierten 0.2% de su peso corporal para producir una feromona sexual (Hedin y Mitlin, 1974), los grillos machos gastan más de la mitad de su energía en producir el canto (Prestwich 1994). Sin embargo este bajo costo no es una generalidad, ya que en algunas especies como los ratones las feromonas que liberan en la orina, representan una cantidad enorme de recursos utilizados. Y también se debe tener en consideración los costos en tiempo y energía que se necesitan para recolectar los precursores de feromonas o las misma feromonas, en las especies que no pueden sintetizarlas (Penn y Potts, 1998).

Especie de estudio: *Tenebrio molitor*

El escarabajo *Tenebrio molitor* pertenece a la familia Tenebrionidae y es una plaga de productos almacenados como cereales y granos, de aquí su nombre común: gusano de harina (mealworm). Presenta una distribución cosmopolita pero se encuentra principalmente en las regiones templadas de las latitudes del norte (Bousquet 1990; Hill 2003). Hill (2003) reportó que tras el apareamiento las hembras pueden llegar a ovipositar hasta 500 huevos.

La etapa de huevo es la de menor duración, ya que las larvas eclosionan a partir de los 10 a 12 días, a una temperatura aproximadamente de 20°C. El estadio larval es el que más varía en cuanto a duración (de 1 a 4 meses), por lo cual los individuos pueden pasar por 9 a 20

mudas. En la siguiente etapa del ciclo encontramos la pupa, que es del tipo exarata, es decir que los apéndices son libres y no pegados al cuerpo (Spang 2013). Veinte días después de la pupación, emerge el adulto de 15 mm aproximadamente y que aún es inmaduro. En un principio exhibe una coloración blanquecina que va cambiando hacia una rojiza-marrón hasta llegar a un negro, lo cual indicaría que ya es maduro sexualmente (de 12 a 15 días).

La esperanza de vida como adulto del gusano de la harina va de uno a tres meses, por lo cual el ciclo de vida completo puede ser de 280-630 días (Spang 2013), aunque se debe de tener en consideración que la duración de las diferentes etapas, puede aumentar o disminuir dependiendo de las condiciones ambientales (Connat *et al.*, 1991). Por ejemplo para que el organismo se convierta en una pupa, tanto la temperatura como la humedad son factores determinantes.



Figura 1. Fases del ciclo de vida de *Tenebrio molitor*, mostrando de izquierda a derecha: adulto, pupa, larva y huevo.

El sistema de apareamiento de *T. molitor* es poliginándrico. En esta especie las hembras son atraídas por las feromonas que los machos producen (Happ 1969; 1971; Tanaka *et al.*, 1986). Cuando los machos son expuestos ante un reto inmune, se ha visto que su atractivo

se reduce (Sadd *et al.*, 2006; Vainikka *et al.*, 2007; Worden y Parker, 2005;), es decir, que las hembras ya no los prefieren como pareja, quizá por la posible disminución en la producción de la feromona (Worden *et al.*, 2000), dado que invierten sus recursos para activar el sistema inmune. Estos trabajos parecen concordar con la hipótesis del handicap y más específicamente con la propuesta de Hamilton y Zuk, en donde las hembras evalúan mediante los caracteres sexuales secundarios, la resistencia contra patógenos que presentan sus posibles parejas. En contraste con estos resultados, en 2010 Kivleniece *et al.*, al retar a los machos con implantes de Nylon, obtuvieron en las pruebas de elección, que los machos que solo eran retados una vez eran menos atractivos que el grupo control, a diferencia de los machos que se exponían al reto inmune repetidas veces, los cuales eran más atractivos incluso que los machos sanos.

Sin embargo los retos inmunes que se han utilizado en contra de *Tenebrio molitor*, en su mayoría no son patógenos biológicos, como los implantes de nylon, mientras los que sí son organismos, no son enemigos naturales de este insecto, como la tenia de rata *Hymenolepis diminuta*. Es por ello que en el presente trabajo se quiere poner a prueba la elección femenina en *T. molitor*, entre machos en buena condición y machos infectados por un entomopatógeno, y cómo su decisión tiene un efecto en la progenie.

HIPÓTESIS

- ❖ Las hembras elegirán pareja en función del estado de salud de los machos.
- ❖ La elección femenina en *Tenebrio molitor* por machos en buena condición de salud, repercutirá en la calidad de la progenie.

PREDICCIONES

- ❖ Las hembras de *T. molitor* elegirán con una mayor probabilidad a machos no retados.
- ❖ Las hembras que copulen con machos retados, ovipositarán un número menor de huevos, su número de eclosión será bajo y presentarán menores concentraciones de proteínas y lípidos totales.

OBJETIVOS

- Investigar la preferencia de las hembras de *T. molitor* por machos de buena condición frente a machos de mala condición.
- Comparar el éxito en la preferencia femenina, entre machos de *T. molitor* infectados con un entomopatógeno y retados con implantes de nylon.
- Medir la calidad de los huevos de los distintos tratamientos, mediante el número, la eclosión y las concentraciones de proteínas y lípidos totales.

METODOLOGÍA

Cría de *Tenebrio molitor*

Los escarabajos de *Tenebrio molitor* se obtuvieron de cuatro diferentes centros comerciales: Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la UNAM y Cuautitlán Izcalli del Estado de México; del D.F. se obtuvieron de la Magdalena Mixhuca y Venustiano Carranza. Individuos de las cuatro colonias de insectos se mezclaron para evitar depresión por endogamia (pérdida de variación genética debido a homocigosidad) y se obtuvo una sola colonia, a partir de esta colonia seis meses después se obtuvieron los insectos para los experimentos.

Los insectos fueron criados con salvado de trigo (de la marca comercial Maxilu) y una rebanada de manzana como fuente de agua, cada semana se les proporcionó la rebanada de manzana. Las larvas se incubaron a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) con un fotoperiodo de día y noche (12 horas de luz y 12 horas de oscuridad). Los individuos de la colonia se encontraban separados en grupos de 100 a 200 insectos en cajas circulares de plástico (27 cm de diámetro x 11.3cm de alto). Las pupas fueron colectadas de la colonia y sexadas mediante la inspección morfológica del octavo segmento abdominal (Bhattacharya *et al.*, 1970) (Figura 2).

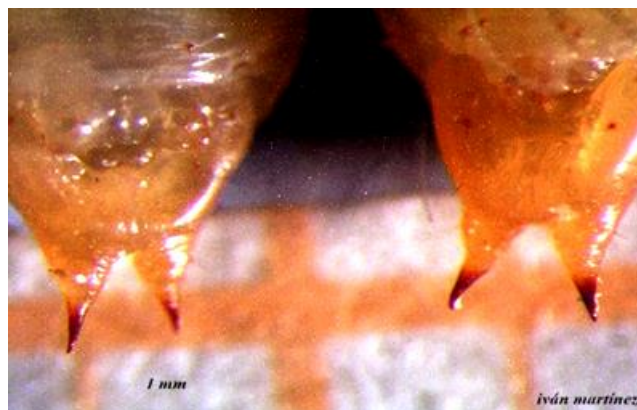


Figura 2. Determinación del sexo en pupas de *Tenebrio molitor*, a partir de las estructuras presentes en el octavo segmento abdominal. A la izquierda se presenta una hembra y a la derecha un macho.

Bioensayo con hongo entomopatógeno

Origen y cultivo del hongo entomopatógeno

El hongo entomopatógeno *Metarhizium robertsii* (ARSEF 2134) se obtuvo de la colección de hongos entomopatógenos del servicio de investigación agrícola del departamento de agricultura de los Estados Unidos (ARSEF-USDA). El aislamiento fue conservado en glicerol al 10 % a -80°C.

Preparación del inoculo

El hongo *M. robertsii* se sembró en placas con medio Agar Dextrosa Sabouraud (ADS) y se incubaron las placas por 15 días a 28°C en oscuridad. Los conidios fueron separados del micelio a los 15 días de cultivo, raspando la superficie de la placa con un bisturí. El micelio y los conidios se mezclaron en una solución de Tween 80 al 0.03%. La mezcla se agitó por 5 minutos en un agitador vórtex y se filtró a través de una malla de algodón (pañalina) para separar el micelio de los conidios. El conteo de conidios se llevó a cabo con una cámara de Neubauer. El porcentaje de viabilidad de los conidios utilizados en el experimento fue estimado usando la técnica de conteo en placas de ADS (Goettel e Inglis, 1997). El porcentaje de viabilidad fue mayor del 95 %.

Determinación de la CL₅₀

Cinco grupos de 15 machos de *Tenebrio molitor* fueron inoculados con cinco concentraciones de *M. robertsii*: 1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 y 1×10^4 conidios/mL y un sexto grupo correspondió al testigo. Las concentraciones de conidios y el testigo se prepararon en un tubo Falcon de 50 mL con 10 mL de Tween 80 al 0.03%. Los insectos fueron inoculados sumergiéndolos en la suspensión de conidios durante cinco segundos y secados en una caja de Petri de 9 cm de diámetro con papel filtro Whatman No. 1 en el fondo. Cada individuo se colocó en una cavidad de una placa de 12 pozos. Las cajas con los insectos se incubaron durante 10 días a 25°C y 90% de humedad. En las cavidades donde se

incubaron los insectos contenían un poco de salvado. Los machos tenían una edad de 12 a 15 días y pesaban entre 0.9 a 0.12 g. La mortalidad se registró cada 24 horas durante diez días. Los insectos muertos se incubaron a 25°C en cajas Petri de 5 cm de diámetro con papel filtro húmedo, para promover la esporulación y confirmar que la muerte se debió al hongo.

Los datos de mortalidad del días 5, se usaron para determinar la concentración letal cincuenta (CL₅₀) mediante el análisis Probit usando el software POLO PLUS (LeOra Software 2002). La CL₅₀, es una estimación de la concentración de una sustancia o un patógeno que produce la muerte del 50% de la población expuesta en un tiempo determinado. La CL₅₀ que se estimó fue de 3.9X10⁵ conidios/mL con un intervalo de confianza al 95 % de 8.11X10⁴-1.43X10⁶ conidios/mL.

Ensayos de elección

Pruebas de elección femenina

Para los ensayos de elección se establecieron cuatro experimentos conformados por los siguientes tratamientos: 1) Control negativo (-) vs. Control positivo (+), 2) Control positivo (+) vs. Retados con implantes, 3) Control positivo (+) vs. Retados con el hongo y 4) Retados con el hongo vs. Retados con implantes. El Control negativo (-) únicamente se comparó con el Control positivo (+) para saber si la manipulación, que no implica un reto inmune, tiene un efecto en la preferencia femenina. Los tratamientos se formaron aleatoriamente con 30 machos de entre 12-15 días de edad, etapa en la que son maduros sexualmente (Gerber 1976).

El tratamiento Control negativo (-) consistió en que a los individuos de este grupo no se les realizó ninguna manipulación, el Control positivo (+) consistió en sumergir a los individuos en Tween 80 al 0.03% y los individuos Retados con el hongo fueron infectados con una concentración aproximada a la CL₅₀ de 3x10⁵ conidios/mL de *M. robertsii*. El procedimiento de infección de los machos de tenebrio fue siguiendo el protocolo que se

utilizó para determinar la CL_{50} . Por otra parte, a los machos de *T. molitor* retados con un reto artificial, se les insertaron tres pedazos cilíndricos de nylon de 2 mm de largo y 0.5 mm de diámetro. Los implantes se insertaron entre el segundo y tercer esternito abdominal de los machos. Los implantes de nylon se encontraban en etanol al 96 % antes de insertarlos en los insectos.

La inserción de implantes de nylon como retos inmunes ha sido utilizada ampliamente en insectos para investigar la respuesta inmune celular (Wiesner y Gotz, 1993; Contreras-Garduño *et al.*, 2006), ya que el implante provoca la agregación de hemocitos y un depósito de melanina que aísla al implante (Gillespie y Kanost, 1997). Los grupos de insectos se retaron con los tratamientos tres días antes de las pruebas de elección, para activar el sistema inmune.

Las pruebas de elección se llevaron a cabo en un cuarto oscuro con luz roja. Se utilizó un olfatómetro con dos brazos (ver Figura 3). Este dispositivo permite que dentro circule un flujo de aire, de tal manera que los insectos pueden elegir entre las dos opciones que se les presentan (Malo y Rojas 2012). Está diseñado sobre todo para la evaluación de volátiles en insectos de pequeño tamaño (Malo y Rojas 2012). Se utilizaron treinta hembras vírgenes por tratamiento, con aproximadamente una edad de 20 días, etapa en la cual ya son totalmente maduras sexualmente (Gerber 1976).

Los machos, uno de cada tratamiento dependiendo el experimento, se colocaron aleatoriamente en los “brazos” del olfatómetro, los cuales a su vez están conectados a una bomba de aire que permitirá el arrastre de los volátiles hacia el tubo en “Y”. Las hembras se colocaron en el puerto de liberación para su aclimatación durante 2 minutos, transcurrido este lapso de tiempo se abrió la compuerta para permitir el acceso al tubo en “Y”, se observó y registró la conducta de la hembra frente a los estímulos durante un máximo de 3 minutos, dando un total de 5 minutos por cada ensayo. Se consideró que la prueba terminaba una vez que la hembra eligió uno de los “brazos” (derecho o izquierdo) del olfatómetro. En cada repetición la hembra fue remplazada, de la misma manera los machos también se sustituyeron y se colocaron de manera aleatoria en los puertos. El puerto de

liberación, el tubo en “Y” y los “brazos” del olfatómetro, fueron lavados con etanol cada 15 repeticiones para evitar posibles sesgos (Ríos-Delgado *et al.*, 2008), dejando que el solvente se evaporara durante 15 minutos con ayuda de un ventilador.

Análisis estadístico

Los resultados entre replicas, es decir, las elecciones hechas antes y después de limpiar el olfatómetro, fueron similares, por lo cual se analizaron y graficaron en conjunto, en lugar de hacerlo por separado. Las frecuencias del número de machos elegidos por las hembras en los diferentes experimentos se analizaron mediante la prueba G (Sokal y Rohlf, 1995) en el programa estadístico R.

Durante las pruebas, también se registró el tiempo que tardaron las hembras en hacer su elección. Estos datos se analizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney.

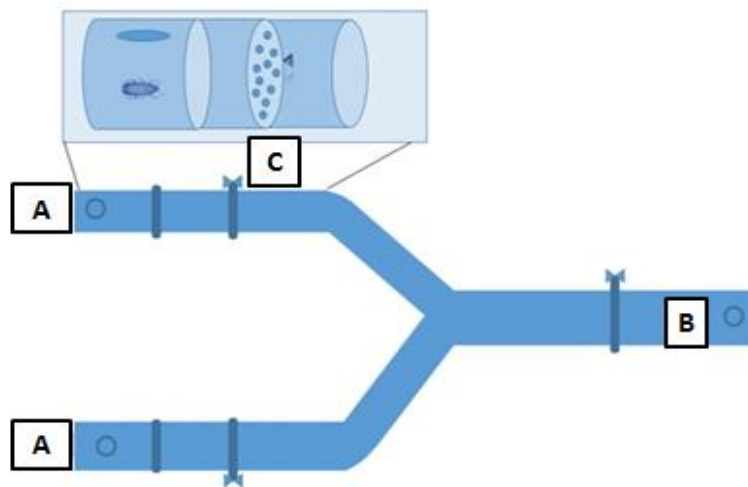


Figura 3. Olfatómetro de una vía con decisión doble en Y. A) Brazos: sitio que alberga a los machos de cada tratamiento. B) Puerto de liberación: sitio en el que se lleva a cabo la aclimatación de las hembras. C) Acercamiento al “brazo” en donde se muestra la compuerta con poros, que separa a los machos de las hembras.

Efectos sobre la descendencia

Pruebas de elección femenina

Para conocer los efectos de la elección de las hembras de *T. molitor* sobre su descendencia, se llevó a cabo un ensayo de elección femenina como anteriormente se describió, con la diferencia de que se aumentó el número de individuos, usando en total 40 machos por tratamiento y 40 hembras por experimento. Por ello, el olfatómetro se lavó con etanol en lugar de cada 15 repeticiones, cada 20 repeticiones. Una vez que la hembra realizaba su elección, se abría la compuerta que la separaba del macho para permitir que interaccionaran y posteriormente se trasladó a la pareja a un recipiente de plástico (4.6 cm de diámetro x 4.6 cm de alto) que contenía 9 gramos de harina de trigo comercial. Transcurrida una semana se retiraron a los adultos para la recolección de los huevos.

Determinación de variables morfométricas y fisiológicas de los huevos

Número de huevos

Por cada tratamiento de cada experimento, se separaron los huevos de la harina de trigo y se depositaron en tubos Eppendorf de 2 mL, con ayuda de pinceles con cerdas finas del número 0 y 5. Se contó el número de huevos de cada pareja y se separaron al azar los huevos de diez parejas de cada tratamiento por cada experimento, para obtener el volumen y la concentración de proteínas y lípidos totales de los huevos (ver más adelante).

Número de huevos eclosionados

Posterior a la separación de los huevos de diez parejas por tratamiento, el total de los huevos restantes se mantuvieron en sus correspondientes tubos Eppendorf de 2 mL. Durante una semana se midió el número de huevos que eclosionaron, mediante la recolecta de las larvas.

Análisis Estadístico

El número total de huevos eclosionados de los tratamientos en los diferentes experimentos, se analizaron mediante la prueba χ^2 . Los datos se analizaron en el programa estadístico R.

Volumen de los huevos

De las cuarenta parejas por tratamiento, se separaron al azar los huevos de diez parejas en todos los experimentos. De estos huevos solo se tomaron aleatoriamente cinco de cada pareja. Los huevos fueron fotografiados (ver Figura 4) y se procesaron mediante el programa ImageJ (Rasband 1997).

En este programa en primera instancia se transformaba la profundidad de color de las imágenes a un formato de 8 bits y posteriormente se convertían en binarias, proceso que permite la reducción en la información de la imagen, ya que solo existen dos valores, 0 y 1 para negro y blanco respectivamente. Se seleccionaron los huevos y con un análisis de partículas, comando mediante el cual se conoce el número y medidas de los objetos de una imagen, se obtuvieron las medidas de largo y ancho. Posteriormente éstas se utilizaron para conocer el volumen de los huevos, de acuerdo a la fórmula reportada por Berrigan (1991): $V=1/6\pi w^2L$, en donde w es el ancho y L el largo.

Análisis estadístico

Los datos de volumen por huevo de los diferentes tratamientos se analizaron mediante un ANOVA anidado, en donde las parejas por cada tratamiento se anidaron al tratamiento. Por otra parte, mediante la prueba de separación de medias de Tukey, se separaron las medias de los tratamientos. Estos análisis estadísticos se realizaron en el programa R.



Figura 4. Huevos de *Tenebrio molitor* con su respectiva escala.

Determinación de proteínas y lípidos totales en los huevos

Como ya se mencionó, por cada tratamiento (Control negativo (-), Control positivo (+), Retados con el hongo y Retados con implantes) de los cuatro experimentos, se tuvieron diez repeticiones, es decir los huevos correspondientes a 10 de las 40 parejas formadas en las pruebas de elección femenina, que se seleccionaron al azar. Cada repetición estaba conformada por cinco huevos. Basándose en la revisión de Foray *et al.*, (2012), para el método de van Handel, se obtuvieron las concentraciones de lípidos y proteínas. Este método permite medir a partir de una muestra, las cantidades de proteínas, carbohidratos, lípidos y glucógeno (Foray *et al.*, 2012).

Proteínas totales

Después de haber conseguido las medidas de largo, ancho y volumen, los huevos se volvieron a depositar en tubos Eppendorf de 2 ml. A éstos se les agregó 200 µl de Buffer fosfato salino (conocido también por sus siglas en inglés como PBS) y se trituraron utilizando micropistilos estériles, hasta obtener una solución hialina. Posteriormente la

solución se centrifugó durante diez minutos a 10 000 revoluciones por minuto a 4°C. Se tomaron alícuotas de 10 µl por duplicado. Estas alícuotas se emplearon para extraer y cuantificar proteínas mediante el Ensayo de Pierce BCA (Pierce, Rockford, IL) (Smith *et al.*, 1985), el cual es un método altamente sensible, que consiste en la reacción de las proteínas hacia el Cu⁺² en un medio alcalino, más un reactivo, el ácido bicinónico (BCA), que es altamente sensible y específico para el ión Cu⁺. La reacción forma un producto de color púrpura, que permite la cuantificación espectrofotométrica de proteínas en solución acuosa (García y Vázquez, 1998). Cada alícuota se puso en una placa de pocillos y se le agregó 40 µl de PBS y 150 µl de los reactivos del kit. La placa se incubó a 37°C durante treinta minutos. Transcurrido este lapso de tiempo, se leyó la absorbancia a 562 nanómetros en un espectrofotómetro.

Se utilizó la proteína seroalbúmina bovina como estándar para realizar la curva de calibración. Para ello después de obtener las absorbancias de los huevos de los distintos tratamientos, éstas se graficaron contra las concentraciones de proteína del estándar, con la finalidad de obtener la pendiente y la ordenada al origen. A partir de estos datos y utilizando la ecuación de la recta, se obtuvo la curva de calibración y se calcularon las concentraciones de proteínas totales presentes en los huevos de los distintos tratamientos con ayuda del programa Excel.

Lípidos totales

La segunda etapa correspondió al método de van Handel (1985b), el cual permite la extracción y cuantificación de lípidos, debido a que el ácido sulfúrico al calentarse reacciona con éstos formando iones carbonio. Estos iones en presencia de fosfovanilina producen una solución rosada, que permite la cuantificación espectrofotométrica, en donde la intensidad del color está relacionada con la concentración de lípidos en la muestra (Foray *et al.*, 2012). A los 180 µl restantes después de tomar las alícuotas para el ensayo de proteínas, se les agregó 1 ml de la solución Metanol:Cloroformo (2:1 v/v) y se agitaron por dos minutos. A continuación se tomó una alícuota de 100 µl, mismos que se colocaron en

otro tubo Eppendorf. Esta nueva alícuota se colocó en una parrilla a 90°C para evaporar el solvente. Una vez que ocurrió la evaporación, se colocaron 10 µl de ácido sulfúrico al 98% y se dejó calentar a 90°C en la parrilla, durante dos minutos. Finalmente se puso a enfriar en hielo, se colocó en una placa de pocillos y se agregaron 190 µl de fosfovanilina, la cual se preparó el mismo día de su utilización, con vanilina y ácido fosfórico al 68%, llegando a una concentración final de 1.2 g/L. Se ha demostrado, que la vanilina es una técnica que proporciona datos muy precisos para la determinación de lípidos en insectos (Williams *et al.*, 2011). La placa se leyó en un espectrofotómetro a 562 nanómetros.

Se utilizó el lípido trioleato de glicerilo como estándar para realizar la curva de calibración. Para ello después de obtener las absorbancias de los huevos de los distintos tratamientos, éstas se graficaron contra las absorbancias de las concentraciones de lípidos del estándar, con la finalidad de obtener la pendiente y la ordenada al origen. A partir de estos datos y utilizando la ecuación de la recta, se obtuvo la curva de calibración y se calcularon las concentraciones de lípidos totales presentes en los huevos de los distintos tratamientos con ayuda del programa Excel.

Análisis estadístico

Los datos de proteína se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis debido a que los datos no presentaron varianzas homogéneas ni una distribución normal. Por su parte los datos de lípidos se tuvieron que transformar al recíproco de la raíz cuadrada, para que cumplieran con los supuestos de varianzas homogéneas y distribución normal. Los datos se analizaron mediante un ANOVA. Se utilizó el software R para hacer los análisis.

RESULTADOS

Pruebas de elección femenina

En los experimentos de elección femenina se encontraron, tanto en el experimento 1 (Control negativo (-) vs. Control positivo (+)) como en el experimento 3 (Control Positivo (+) vs. Retados con el hongo *M. robertsii*), diferencias significativas en el número de machos elegidos (Figura 5). Los machos más atractivos fueron los de los tratamientos Control Positivo (+) y Retados con el hongo respectivamente (N= 30, Prueba de G= 4.937, $P \leq 0.05$). Mientras que en el experimento 2 (Control positivo (+) vs. Retados con implantes) y el experimento 4 (Retados con el hongo vs. Retados con implantes) no se encontraron diferencias significativas en el número de machos elegidos por las hembras (Figura 5).

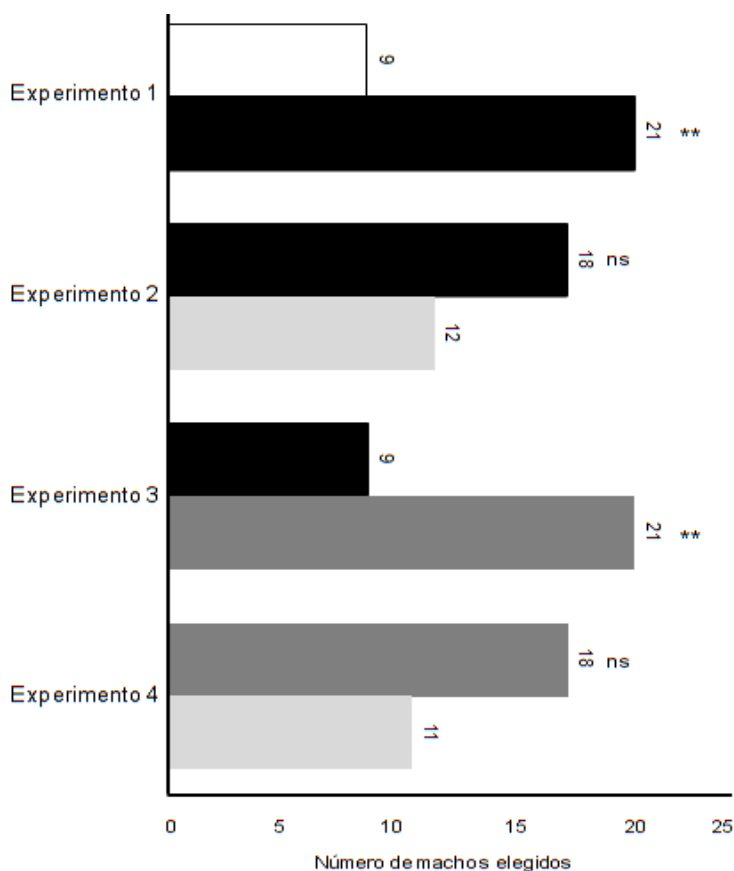


Figura 5. Número de machos elegidos de *Tenebrio molitor* de los tratamientos: Control negativo (-) □, Control positivo (+) ■, Retados con el hongo entomopatógeno *M. robertsii* ▒ y Retados con implantes de nylon □, que fueron elegidos por las hembras durante las prueba de elección en los diferentes experimentos. ns= no significativo, *=0.05 y **=0.001 de acuerdo con la prueba G.

Tiempos en la elección femenina

Las tendencias del tiempo que tardaron las hembras en hacer su elección por los machos de cada tratamiento se presentan en la Figura 6. No se encontraron diferencias significativas en ninguno de los experimentos de acuerdo con la prueba U de Mann-Whitney. Control negativo (-) vs. Control (+) (Mann-Whitney $U=143$, $p>0.05$), Control positivo (+) vs. Retados con implantes (Mann-Whitney $U=140.5$, $p>0.05$), Control positivo (+) vs. Retados con el hongo (Mann-Whitney $U=101$, $p>0.05$) y Retados con el hongo vs. Retados con implantes (Mann-Whitney $U=164$, $p>0.05$).

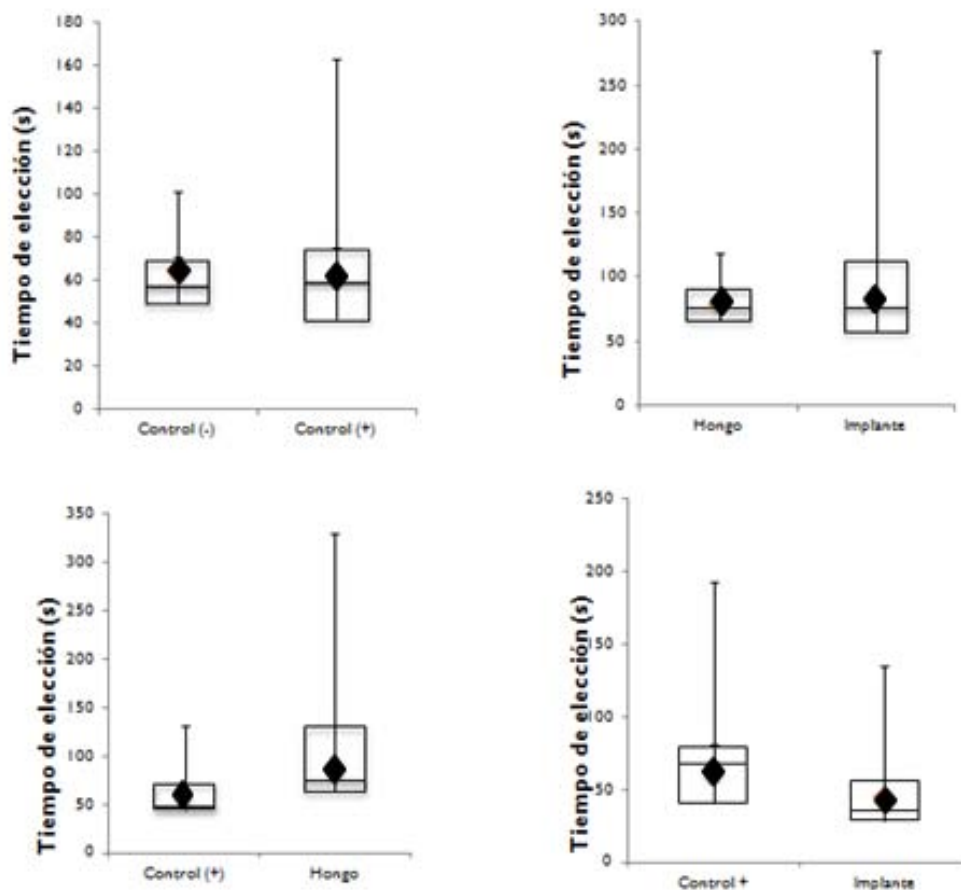


Figura 6. Tiempo en segundos (s) que tardaron las hembras en elegir pareja en los cuatro experimentos. Las barras representan los cuartiles primero (parte alta) y tercero (parte baja) de los datos de los tiempos de elección. La línea central indica la mediana, mientras que el rombo \blacklozenge indica la media. Las barras de error representan los valores máximos y mínimos de los datos.

Efectos sobre la descendencia

Número de huevos

El número de huevos recolectados en los diferentes experimentos, se presentan en la Figura 7. Se puede observar que el tratamiento con mayor número de huevos, fue el de Retados con el hongo *M. robertsii* correspondiente al experimento 3 (Control positivo (+) vs. Retados con el hongo (Mann-Whitney $U=85$, $p>0.05$)). Sin embargo este mismo tratamiento en el experimento 4 en el que se enfrentaba con el tratamiento de Retados con implantes de nylon, tuvo un número de huevos mucho menor (Retados con el hongo vs. Retados con implantes (Mann-Whitney $U=118$, $p>0.05$)). Mientras que los demás tratamientos (Control negativo (-) vs. Control positivo (+) (Mann-Whitney $U=85$, $p>0.05$), Control positivo (+) vs. Retados con implantes (Mann-Whitney $U=114.5$, $p>0.05$)) presentan un número de huevos similar (Figura 7).

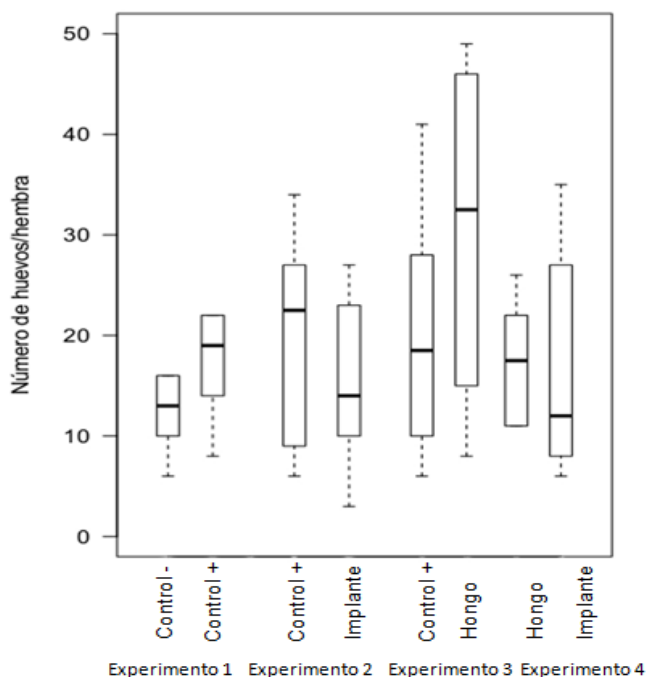


Figura 7. Número de huevos ovipositados por las hembras de cada tratamiento en los cuatro experimentos. Las barras representan los cuartiles primero (parte alta) y tercero (parte baja) de los datos del número de huevos. La línea central indica la mediana. Las barras de error representan los valores máximos y mínimos de los datos.

Número de huevos que eclosionaron

En cuanto al número de huevos que eclosionaron se encontraron diferencias significativas en los experimentos 1 (Control negativo (-) vs. Control positivo (+)) como 3 (Control positivo (+) vs. Retados con el hongo) y 4 (Retados con el hongo vs. Retados con implantes) (Figura 8). En el experimento 1 el Control positivo (+) fue el tratamiento con mayor eclosión. Se observa que el tratamiento de Retados con el hongo del experimento 3, fue el que presenta el mayor número de huevos que eclosionaron, mismo tratamiento en el que se recolectó el mayor número de huevos (ver Figura 7). Así mismo en el experimento 4 el tratamiento de Retados con el hongo, tuvo una mayor cantidad de huevos eclosionados. Mientras que en el experimento 2 que corresponde a los tratamientos de Control positivo (+) vs. Retados con implantes, no se encontraron diferencias significativas (Figura 8).

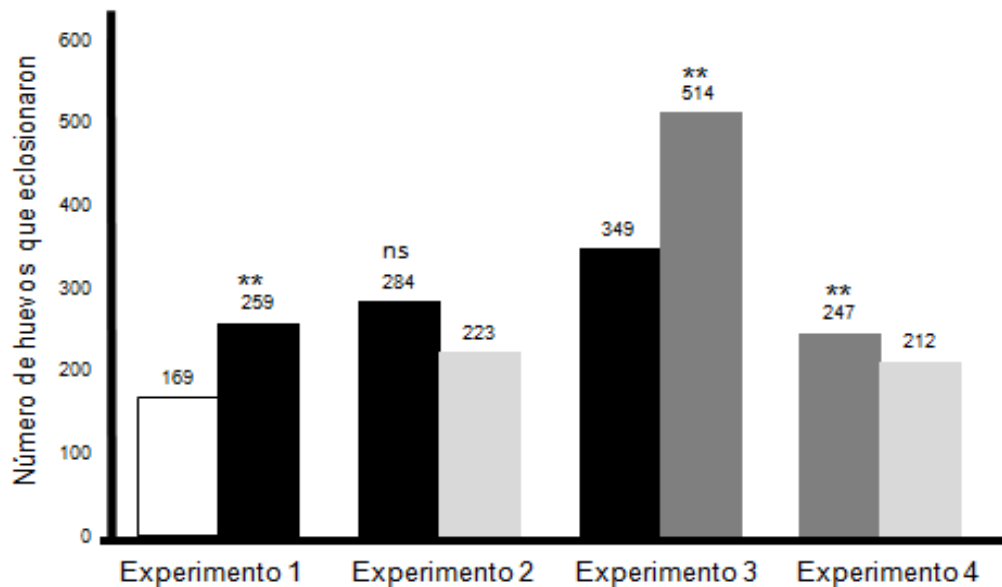


Figura 8. Número de huevos que eclosionaron de los diferentes tratamientos: Control negativo (-) □ , Control positivo (+) ■ , Retados con el hongo *M. robertsii* ▒ y Retados con implantes de nylon □ ns= no significativo, *=0.05 y **=0.001 de acuerdo con la prueba χ^2 .

Volumen de los huevos

El volumen de los huevos muestra que existen diferencias significativas entre los cuatro tratamientos (Control negativo (-), Control positivo (+), Retados con el hongo y Retados con implantes) (ANOVA; $F_{3,160}=8.04$, $P\leq 0.0001$, Figura 9). Se observa que los huevos pertenecientes al tratamiento de los machos infectados por el hongo *M. robertsii*, son los que presentan un menor volumen dentro de los cuatro tratamientos.

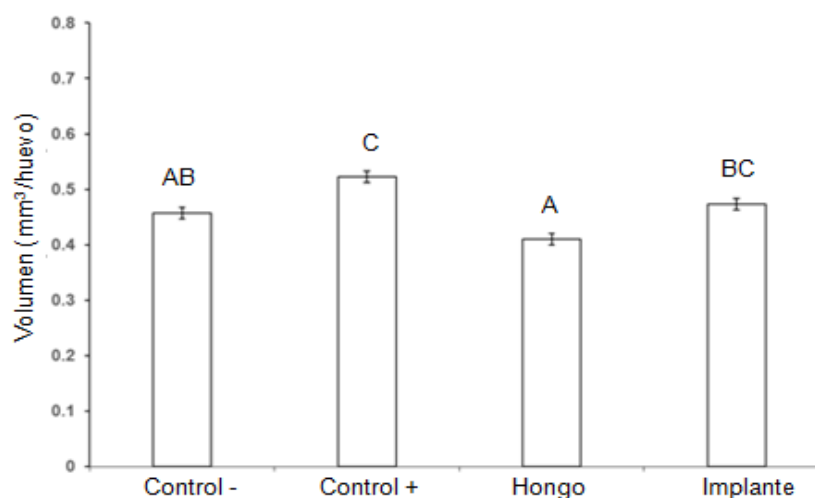


Figura 9. Volumen de los huevos de *T. molitor* en los distintos tratamientos: Control negativo (-), Control positivo (+), Retados con el hongo *M. robertsii* y Retados con implantes de nylon. Letras distintas en las columnas indican diferencias estadísticamente significativas ($p\leq 0.05$) de acuerdo con la prueba de separación de medias de Tukey. Las barras indican el error estándar.

Proteínas y lípidos totales en los huevos

Los huevos de las hembras que eligieron a los machos de los tratamientos Control positivo (+), Control negativo (-), Retados con el hongo *M. robertsii* y Retados con implantes de nylon, presentaron una concentración parecida de proteínas totales (Kruskal-Wallis, $H=4.04$, $P=0.25$, Figura 10).

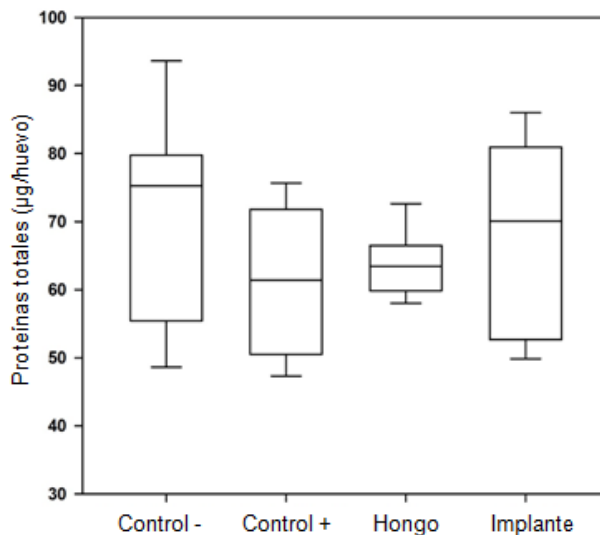


Figura 10. Efecto de la elección de las hembras que eligieron a los machos de los diferentes tratamientos sobre la concentración de proteínas totales en la progenie. Las barras representan los cuartiles primero (parte alta) y tercero (parte baja) de los datos de las proteínas totales. La línea central indica la mediana. Las barras de error representan los valores máximos y mínimos de los datos de proteínas totales. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) de acuerdo con la prueba Kruskal-Wallis.

En la cantidad de lípidos totales en los huevos de las hembras que eligieron a los machos de los diferentes tratamientos, se encontraron diferencias significativas (ANOVA, $F_{3,36}=12.83$, $P \leq 0.05$, Figura 11). Los huevos de las hembras que eligieron a los machos pertenecientes a los tratamientos Retados con hongo y Retados con implantes, tienen una concentración similar de lípidos totales (Figura 11). Por otra parte, los huevos provenientes de las hembras que eligieron a los machos del tratamiento Control negativo (-) fueron los que más lípidos totales contenían en comparación con el del tratamiento Control positivo (+), Retados con el hongo y Retados con implantes de nylon (Figura 11).

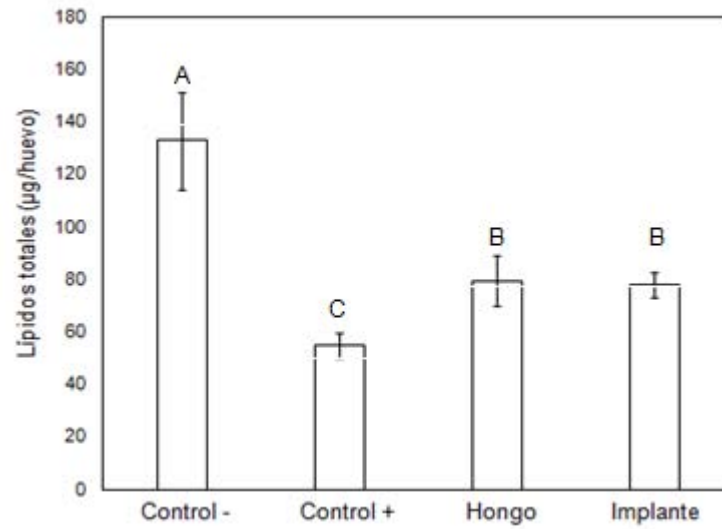


Figura 11. Efecto de la elección de las hembras que eligieron a los machos de los diferentes tratamientos sobre la concentración de lípidos totales en la progenie. Letras distintas en las columnas indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) de acuerdo con la prueba de separación de medias de Tukey. Las barras indican el error estándar.

DISCUSIÓN

Siendo parte de la condición la resistencia a patógenos, es de esperar que las hembras prefieran aparearse con machos que presentan señales sexuales más acentuadas (Hamilton y Zuk, 1982). Las feromonas son consideradas como caracteres sexuales secundarios que dan indicios a las hembras sobre la inmunocompetencia de los machos (Rantala *et al.*, 2003). De acuerdo con Rantala *et al.*, (2002), las hembras del escarabajo *Tenebrio molitor* prefieren las feromonas producidas por machos que presentan alta inmunocompetencia. Por lo tanto diversos estudios han apoyado que las hembras de *T. molitor* eligen con mayor probabilidad a aquellos machos que no se encuentran retados (Worden *et al.*, 2000; Rantala *et al.*, 2003; Worden y Parker, 2005; Vainikka *et al.*, 2007). Sin embargo los resultados obtenidos en este estudio no concuerdan con esta predicción, ya que se encontró que las hembras encontraron más atractivos a los machos retados con el hongo *M. robertsii*.

Otros estudios han encontrado resultados similares, en los cuales los machos que presentaban un reto inmune, eran con mayor probabilidad preferidos por las hembras (Sadd *et al.*, 2006; Kivleniece *et al.*, 2010), pero a diferencia de los trabajos ya mencionados y otros en donde evalúan la elección de las hembras en *T. molitor*, nuestro estudio utiliza un entomopatógeno, el cual ha estado en coevolución con nuestro sujeto de estudio, mientras que los demás trabajos publicados utilizan retos que solo activan la respuesta inmunitaria como por ejemplo implantes u otros patógenos, como la tenia del ratón *Hymenolepis diminuta*, que no necesariamente conviven con esta especie (Worden y Parker, 2005; Beltran-Bech y Richard, 2014).

Una posible explicación de nuestros resultados puede hallarse en la hipótesis de la inversión terminal. Esta hipótesis plantea que cuando los organismos “censan” que sus probabilidades de sobrevivir son muy bajas, deciden en un último esfuerzo apostar sus recursos hacia la reproducción (Clutton-Brock 1984; Bonneaud *et al.*, 2004). Por lo cual, los machos de *T. molitor*, pueden estar invirtiendo sus recursos hacia la producción de feromonas, que son el carácter sexual secundario en esta especie y de esta manera ser más atractivos, en lugar de utilizarlos para combatir el reto inmune. Krams *et al.*, (2014)

encontraron resultados similares, sin embargo solo utilizaron como reto inmune un implante.

Dentro de los experimentos de elección femenina, se encontró también que las hembras prefirieron a los machos pertenecientes al tratamiento de Control positivo (+), en donde los individuos sí se manipulaban pero no se enfrentaban a un reto inmune, frente al Control negativo (-), es decir, aquellos individuos que no presentaron ningún tipo de manipulación. Estos resultados muestran que la manipulación tiene un efecto sobre la elección femenina en *T. molitor*, a pesar de que ésta no implique la activación del sistema inmune. Por otro lado, no se encontraron diferencias entre los tratamientos retados con el hongo y los implantes, lo cual sugiere que el implante también genera una respuesta inmune, sin embargo al enfrentar este tratamiento contra el Control positivo (+), tampoco hubieron diferencias significativas, a diferencia de lo que ya se mencionó que ocurrió con el entomopatógeno. Por lo cual, la infección de los machos de *T. molitor* con el hongo entomopatógeno represente una mayor inversión de recursos en la activación de la respuesta inmune para combatir a los entomopatógenos, que la inserción de un implante en el interior del insecto (Krams *et al.*, 2013). En las pruebas de elección, tampoco se encontraron diferencias significativas, en el tiempo que tardaron las hembras en recorrer en olfatómetro hacia uno de los machos, en los cuatro experimentos. De tal manera que las hembras invierten el mismo tiempo en discernir entre los tratamientos.

La reproducción, es en general, bastante costosa para las hembras y una gran parte de su adecuación va a depender de la calidad de su pareja (Braga *et al.*, 2010). Por ello la elección de pareja femenina debería discriminar a favor de machos de buena condición, con el fin de maximizar la adecuación de su descendencia (Kokko y Johnstone, 2002). Además las hembras pueden alterar su inversión dependiendo del atractivo de su pareja (Cunningham y Russell, 2000). Por ejemplo, las hembras de los pinzones cebrá *Taeniopygia guttata*, alteran la inversión de testosterona en los huevos dependiendo de qué tan atractivos sean los machos, esta decisión va a tener un efecto en su prole, ya que la testosterona aumenta la capacidad competitiva en los polluelos (Balzer y Williams, 1998). Las hembras de grillos *Gryllus bimaculatus* al aparearse con machos de mayor tamaño,

tienen un mayor porcentaje de oviposición, en comparación con las que se aparean con machos de menor talla (Simmons 1987).

En muchos insectos los machos transfieren nutrientes en el apareamiento, mismos que más tarde pueden ser incorporados a los huevos para aumentar su número y calidad, o al cuerpo de las hembras (Wiklund *et al.*, 1993). Dado esto, se propuso que las hembras apareadas con machos en buena condición producirían huevos de mayor calidad. La calidad de los huevos se ve reflejada en las características morfológicas que presentan, así como su composición bioquímica y los niveles de nutrientes específicos (Clarke *et al.*, 1990; Lavens *et al.*, 1991; Watanabe *et al.*, 1991; García-Ulloa *et al.*, 2004).

Las hembras deberían estar invirtiendo más recursos a la progenie de machos de mejor condición (Braga *et al.*, 2010). Lo que se encontró en este estudio es que el número de huevos que eclosionaron, si se vio afectado por la calidad de los machos, ya que los tratamientos de Retados con el hongo y Retados con implantes presentaron una menor eclosión de sus huevos. Sin embargo no se encontraron diferencias en el número de huevos, otro parámetro que se esperaba que estuviera también relacionado con la condición de los padres según lo que indica la teoría (Locatello y Neat, 2005). Pero se debe tener en cuenta que en esta especie las hembras son poliandricas y se ha visto que cuando se aparean más veces y con machos diferentes, éstas ponen un mayor número de huevos a diferencia de las que se aparean una sola vez (Worden y Parker, 2001). Este patrón también se ha visto en algunos lepidópteros como la mariposa blanca verdinervada *Pieris napi*, en donde las hembras a las que se les permitió aparearse con diferentes machos ovipositaron un número mayor de huevos que aquellas que se quedaron como monógamas (Wiklund *et al.*, 1993).

En los resultados de este estudio se encontró que existen diferencias significativas en cuanto al volumen (mm^3) que presentan los huevos de los cuatro tratamientos, siendo los correspondientes al grupo de Retados con el hongo los de menor volumen. Existen diversos estudios en aves que muestran que los huevos con mayor volumen proporciona una mayor cantidad de lípidos y de recursos hídricos (Williams 1994; Kennamer *et al.*, 1997), y también pueden contener una mayor proporción de recursos vitales como proteínas, minerales y anticuerpos (Manson *et al.*, 1993; Williams 1994; Lung *et al.*, 1996). A pesar

de no haber encontrado una baja concentración de proteínas y lípidos totales en los tratamientos retados, estos sí son los menores en cuanto al volumen, por lo cual puede haber otras moléculas que sí se hallen en menor cantidad. Además es sabido que los huevos más grandes tienen mayor probabilidad de eclosionar, presentan un desarrollo más rápido y emergen con un mayor tamaño en comparación con las larvas provenientes de huevos pequeños (Fox 1993).

Las proteínas juegan un papel fundamental como componentes estructurales y bajo ciertas condiciones como fuentes de energía (Stryer 1995; Lemos y Rodríguez, 1997). En la mayoría de los invertebrados acuáticos, especialmente los crustáceos, se conoce que los huevos presentan como componentes principales a las proteínas, seguidas por los lípidos que son la reserva principal de energía (Holland, 1978; Whyte *et al.*, 1990; Clarke, 1992; García-Guerrero *et al.*, 2003). Es más intensa la síntesis de proteínas durante la formación de huevos que por ejemplo en el crecimiento, ya que esta producción se da principalmente durante la vitelogénesis (Abdu *et al.*, 2000).

La predicción que se planteó de que la progenie de hembras apareadas con machos en buena condición, presentaría una mayor concentración de proteínas totales no se cumplió, dado que no existieron diferencias en las concentraciones en ninguno de los tratamientos. Puede que en este caso la dieta haya jugado un papel importante, ya que en insectos y muchos otros animales, la calidad de la dieta es un determinante ambiental clave del tamaño del cuerpo, que a menudo refleja la condición (Blanckenhorn 2000). Por ejemplo en la mosca *Telostylinus angusticollis*, se ha encontrado que hembras con una dieta rica, producen huevos más grandes y con un desarrollo más rápido, en comparación con las hembras que tuvieron una dieta pobre (Bonduriansky y Head, 2007). Además en esta especie también existen efectos paternos, puesto que los machos con una dieta rica tienen descendencia de mayor tamaño (Bonduriansky y Head, 2007). Pero también debe de tenerse en cuenta el papel estructural que tienen las proteínas a lo largo del desarrollo, como las proteínas que son específicas del vitelo (Bownes *et al.*, 1988b). Por lo cual puede que a diferencia de los lípidos, en donde las hembras pueden ajustar las cantidades que

invierten, tal vez no pueden modular las concentraciones de proteínas dada su importancia para el embrión.

Es sabido que los lípidos son un componente determinante y crucial, que afectan la fecundidad, la calidad del huevo, el éxito de eclosión, así como la pigmentación de las larvas (Chapman 2013). Es por ello, que varios estudios apoyan la hipótesis de que la condición de los reproductores es vital para la producción de huevos y larvas de alta calidad, y que el contenido y la composición de lípidos son factores para el éxito en el desarrollo de los embriones y las larvas (Tandler *et al.*, 1995; Izquierdo *et al.*, 2001). Ejemplo de esto lo encontramos en el bacalao del Atlántico *Gadus morhua*, en donde dependiendo de la cantidad de lípidos en la dieta de los progenitores había un mayor rendimiento en la fertilización, mejor simetría y un porcentaje más alto de eclosión, es decir, a mayor cantidad de lípidos, mayor calidad de los huevos (Salze *et al.*, 2005).

Con base en esto, la predicción aquí planteada de que la progenie de aquellas hembras que hayan copulado con machos retados, presentaría una concentración menor de lípidos totales no se cumplió. Los resultados obtenidos muestran que no hubieron diferencias únicamente debido al reto inmune, más bien estas diferencias se presentaron por la manipulación, ya que los huevos del tratamiento Control negativo (-) mostraron una mayor concentración (μg) de lípidos totales, en comparación con los tratamientos manipulados (Control positivo (+), Retados con el hongo y Retados con implantes). Sin embargo dentro de los tratamientos manipulados, se encontró que los huevos pertenecientes al Control positivo (+) fueron los que contenían menos lípidos totales, mientras que en los tratamientos Retados con el hongo y Retados con implantes no se encontraron diferencias.

En parte, el que no se hallaran diferencias entre los tratamientos retados, pudo deberse a que en este estudio no se utilizaron diversas dietas. Al parecer la dieta únicamente a base de salvado, proporciona los nutrientes necesarios para el desarrollo de los individuos de *T. molitor* (Shapiro-Ilan *et al.*, 2012). Por lo cual los resultados podrían ser más evidentes o el *trade-off* actuaría de manera más fuerte, si además de combatir contra un patógeno los recursos también fueran limitados (Rantala *et al.*, 2003). Además de acuerdo con Reany y

Knell (2010) cuando las hembras tienen una mala condición prefieren a machos de buena calidad, en cambio cuando las hembras poseen una buena condición eligen tanto a machos en mala condición como de buena condición. Por ello en un próximo estudio se recomienda tener además de los diferentes tratamientos de machos, tratamientos de hembras con diferente condición. Así como realizar un seguimiento de la progenie de los distintos tratamientos.

CONCLUSIÓN

La predicción que en este estudio se planteó referente a que las hembras de *T. molitor* elegirían con mayor probabilidad a machos no retados no se cumplió, ya que se encontró que las hembras preferían a los machos infectados por el hongo entomopatógeno *M. robertsii*, posiblemente debido a la inversión terminal, en donde los machos al pensar que es su último evento reproductivo prefieren asignar sus recursos a la producción de feromonas en lugar de combatir al patógeno. Por otro lado en las pruebas de elección también se encontró que las hembras preferían a los machos del tratamiento que no fue manipulado, es decir el Control negativo (-), por lo cual a pesar de que no se activó el sistema inmune la manipulación sí influyó.

También se esperaba que el número de huevos ovipositados por hembras que copularon con los machos de los tratamientos retados, tanto por el hongo como por los implantes de nylon, fuera menor que los ovipositados por hembras que copularon con machos en buena condición. Pero esto tampoco se cumplió, ya que el número de huevos fue similar entre los cuatro tratamientos. El que no se encontraran diferencias pudo deberse en parte a que no se les permitió a las hembras copular con otros machos, situación determinante para esta especie en la que las hembras son poliandricas y en donde la competencia espermática juega un papel importante. Sin embargo sí se encontraron diferencias en cuanto al porcentaje de eclosión, otro parámetro afectado por la calidad de los huevos. Como se esperaba los huevos de los tratamientos con retos inmunes fueron los que menos eclosionaron.

Los huevos del tratamiento de machos Retados por el hongo entomopatógeno fueron los que presentaron menor volumen. Por el contrario los huevos provenientes del Control positivo (+) fueron los que tuvieron el mayor volumen. Estos resultados corroboran que los huevos de mayor tamaño tienen una mayor probabilidad de eclosionar, ya que los huevos del tratamiento retados con el hongo, fueron como ya se mencionó los de menor volumen y a su vez los de menor porcentaje de eclosión.

En cuanto a la concentración de proteínas totales no se encontraron diferencias significativas entre los cuatro tratamientos, pero sí en la concentración de lípidos totales, aunque no se cumplió la predicción, ya que los huevos de los tratamientos donde los machos presentaban mejor condición no fueron los que presentaron la mayor concentración. Al parecer más que el reto inmune fue la manipulación la que influyó, dado que los huevos del tratamiento que no se manipuló (Control negativo (-)) fue el que presentó la mayor cantidad de lípidos totales, seguidos por los huevos de los tratamientos retados (con el hongo y con implantes de nylon), y por último los huevos con menos lípidos totales fueron los del tratamiento Control positivo (+).

REFERENCIAS

- Abdu, U., Yehezkel, G. y Sagi, A. 2000. Oocyte development and polypeptide dynamics during ovarian maturation in the red-claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Invertebrates Reproduction and Development*, 37(1): 75-83.
- Agnew, P., Koella, J.C. y Mickalakis, Y. 2000. Host life history responses to parasitism. *Microbes Infect*, 2: 891–896.
- Ahtiainen, J.J., Alatalo, R.V., Korter, R. y Rantala, M.J. 2005. A trade-off between sexual signalling and immune function in a natural population of the drumming wolf spider *Hygrolycosa rubrofasciata*. *Journal of Evolutionary Biology*, 18: 985-991.
- Andersson, M. 1982. Female choice selects for extreme tail length in a widowbird. *Nature*, 299: 818-820.
- Andersson, M. y Simmons, L.W. 2006. Sexual selection and mate choice. *Trends in Ecology and Evolution*, 21: 296-302.
- Balzer, A.L. y Williams, T.D. 1998. Do female zebra finches vary primary reproductive effort in relation to male attractiveness? *Behaviour*, 135: 297-309.
- Bateman, A. J. 1948. Intra-sexual selection in *Drosophila*. *Heredity*, 2: 349-368.
- Beltran-Bech, S. y Richard, F.J. 2014. Impact of infection on mate choice. *Animal Behaviour*, 90: 159-170.
- Berrigan, D. 1991. The allometry of egg size and number in insects. *Oikos*, 60: 313-321.
- Bhattacharya, A.K., Ameel, J.J. y Waldbauer, G.P. 1970. A Method for Sexing Living Pupal and Adult Yellow Mealworms. *Annals of the Entomological Society of America*, 63: 1783.
- Bjork, A. y Pitnick, S. 2006. Intensity of sexual selection along the anisogamy-isogamy continuum. *Nature*, 441: 742-745.
- Blanckenhorn, W.U. 2000. The evolution of body size: what keeps organisms small? *The Quarterly Review of Biology*, 75: 385-407.

- Bonduriansky, R. y Head, M. 2007. Maternal and paternal condition effects on offspring phenotype in *Telostylinus angusticollis* (Diptera: Neriidae). *Journal of Evolutionary Biology*, 20: 2379-2388.
- Bonneaud, C., Mazuc, J., Chastel, O., Westerdahl, H. y Sorci, G. 2004. Terminal investment induced by immune-challenge and fitness traits associated with major histocompatibility complex in the house sparrow. *Evolution*, 58: 2823-2830.
- Bousquet, Y. 1990. Beetles associated with stored products in Canada: An identification guide. Agriculture Canada Publication 1837, Ottawa, Ontario, 220 pp.
- Bownes, M., Shirras, A., Blair, M., Collins, J. y Coulson, A. 1988b. Evidence that insect embryogenesis is regulated by ecdysteroids released from yolk proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85: 1554-1557.
- Braga, I., Mobley, K.B., Ahnesjö, I., Sagebakken, G., Jones, A.G. y Kvarnemo, C. 2010. Reproductive compensation in broad-nosed pipefish females. *Proceedings of the Royal Society B*, 277: 1581-1589.
- Burley, N. 1988. The differential-allocation hypothesis: an experimental test. *American Naturalist*, 132: 611–628.
- Chapman R.F. 2013. *The Insects*. United Kingdom: Cambridge University Press. pp. 1-961.
- Clarke, A., Brown, J.H. y Holmes, L.J. 1990. The biochemical composition of eggs from *Macrobrachium rosenbergii* in relation to embryonic development. *Comparative Biochemistry Physiology*, 96B: 505–511.
- Clarke, A. 1992. Egg size and egg composition in polar shrimps (Caridea: Decapoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 16: 188–203.
- Clutton-Brock, T.H. 1984. Reproductive effort and terminal investment in iteroparous animals. *American Naturalist*, 123: 212-229.
- Connat, J.L., Del Becque, J.P., Glitho, I. y De La Chambre, J. 1991. The onset of metamorphosis in *Tenebrio molitor* larvae (Insecta, Coleoptera) under grouped, isolated and starved conditions. *Journal of Insect Physiology*, 37: 653-662.
- Contreras, J., Córdoba, A. y Peretti, A.V. 2005. La elección femenina. *Ciencias*, 77: 40-47.

- Contreras-Garduño J., Canales-Lazcano J., y Córdoba-Aguilar, A. 2006. Wing Pigmentation, Immune Ability and Fat Reserves in Males of the Rubyspot Damselfly, *Hetaerina americana*. *Journal of Ethology*, 24: 165-173.
- Cunningham, E.J.A. y Russell, A.F. 2000. Egg investment is influenced by male attractiveness in the mallard. *Nature*, 404: 74-77.
- Darwin, C. 1859. *On the origin of species by means of natural selection*. U.S.A: W. W. Norton & Company. pp. 71-78.
- Darwin, C. 1871. *The descent of man, and selection in relation to sex*. U.S.A: Princeton University Press. pp. 253-320.
- Dernevalch, J.M., Barnes, A.I. y Siva-Jothy, M.T. 2002. Immune investment and sperm competition in a beetle. *Physiological Entomology*, 27: 228-234.
- Endler, J.A. 1993. Some general comments on the evolution and design of animal communication systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B.*, 340: 215-225.
- Fisher, R.A. 1930. *The genetical theory of natural selection*. United Kingdom: Oxford University Press.
- Folstad, I. y Skarstein, F. 1997. Is male germ line control creating avenues for female choice? *Behavioral Ecology*, 8: 109–112.
- Foray, V., Pelisson, P.F., Bel-Venner, M.C., Desouhant, E., Venner, S., Menu, F., Giron, D. y Rey, B. 2012. A handbook for uncovering the complete energetic budget in insects: the van Handel's method (1985) revisited. *The Royal Entomological Society. Physiological Entomology*, 37: 295-302.
- Fox, C.W. 1993. The influence of maternal age and mating frequency on egg size and offspring performance in a seed beetle (Coleoptera: Bruchidae). *Oecologia*, 96: 139-146.
- García, H. y Vázquez, R. 1998. Cuantificación de proteínas: una revisión. *Instituto de Biotecnología UNAM*, 3: 77-88.
- García-Ulloa, G.M., Rodríguez, H. y Ogura, T. 2004. Egg quality of two prawn species (Palemonidae) of the genus *Macrobrachium* (*M. rosenbergii*, De Man 1879, y *M. tenellum*, Smith, 1871) varying the brood stock diet: morphometric indexes. *Av. Investigación Agropecuaria*, 8: 17–27.

- Gerber, G.H. 1976. Reproductive behaviour and physiology of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). III. Histogenetic changes in the internal genitalia mesenteron, and cuticle during sexual maturation. *Canadian Journal of Zoology*, 54: 990-1002.
- Gillespie, J.P. y Kanost, M.R. 1997. Biological Mediators of Insect Immunity. *Annual Review of Entomology*, 42: 611-643.
- Goettel, M.S. e English, D.G. 1997. Fungi: Hyphomycetes. p. 213-249. *In* Lacey, L.A. (ed.) *Manual of techniques in insect pathology*. Academic Press, London, UK.
- van Handel, E. (1985b) Rapid determination of total lipids in mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 1: 302–304.
- Halpern, M. y Martínez-Marcos, A. 2003. Structure and function of the vomeronasal system: an update. *Progress in Neurobiology*, 70: 245–318.
- Hamilton, W.D. y Zuk, M. 1982. Heritable true fitness and bright birds: A role for parasites? *Science*, 218: 384-387.
- Happ, G.M. 1969. Multiple sex pheromones of the mealworm beetle, *Tenebrio molitor* L. *Nature*, 222: 180 y 181.
- Hedin, P.A. y Mitlin, N. 1974. Biosynthesis of grandlure, the pheromone of the boll weevil, *Anthonomus grandis*, from acetate, mevalonate, and glucose. *Journal of Insect Physiology*, 20: 1825–1831.
- Hill, D.S. 2003. Pests: Class Insecta. En: D.S. Hill, (Ed.) *Pests of stored foodstuffs and their control*. (pp. 135-315). Kluwer Academic Publishers, Secaucus.
- Hillgarth, N., Ramenofsky, M. y Wingfield, J. 1997. Testosterone and sexual selection. *Behavioral Ecology*, 8: 108–109.
- Holland, D. 1978. Lipid reserves and energy metabolism in the larvae of benthic marine invertebrates. Pp. 85–123 in D. C. Malins, ed. *Biochemical and Biophysical Perspectives in Marine Biology*. Academic Press, Seattle.
- Huk, T. y Winkel, W. 2008. Testing the sexy son hypothesis- a research framework for empirical approaches. *Behavioral Ecology*, 19(2): 456-461.
- Iyengar, V. K. y Eisner, T. 1999. Heritability of body mass, a sexually selected trait, in an arctiid moth (*Utetheisa ornatrix*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 9169–9171.

- Izquierdo M.S., Fernandez-Palacios H. y Tacon A.G.J. 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture*, 197: 25-42.
- Jones, A.G., Rosenqvist, G., Berglund, A., Arnold, S.J. y Avise, J.C. 2000. The Bateman gradient and the cause of sexual selection in a sex-role-reversed pipefish. *Proceedings of the Royal Society B*, 267: 677-680.
- Kennamer, R.A., Alsum, S.K. y Colwell, S.V. 1997. Composition of wood duck eggs in relation to egg size, laying sequence, and skipped days of laying. *The Auk*, 114: 479–487.
- Kivleniece, I., Krams, I., Daukste, J., Krama, T. y Rantala, M.J. 2010. Sexual attractiveness of immune-challenged male mealworm beetles suggests terminal investment in reproduction. *Animal Behaviour*, 80: 1015-1021.
- Kokko, H. y Johnstone, R.A. 2002. Why is mutual mate choice not the norm? Operational sex ratios, sex roles and the evolution of sexually dimorphic and monomorphic signalling. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, 357: 319–330.
- Kokko, H., Brooks, R., Jennions, M.D. y Morley, J. 2003. The evolution of mate choice of mating biases. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 270: 653-664.
- Kokko, H., Jennions, M.D. y Brooks, R. 2006. Unifying and Testing Models of Sexual Selection. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 37: 43-66.
- Kolm, N. 2001. Females produce larger eggs for large males in a paternal mouthbrooding fish. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 268: 2229–2234.
- Krams, I.A., Daukste, J., Kivleniece, I., Krama, T. y Rantala, M.J. 2013. Previous encapsulation response enhances within individual protection against fungal parasite in the mealworm beetle *Tenebrio molitor*. *Insect Science*, 20: 771–777.
- Krams, I.A., Krama, T., Moore, F.R., Kivleniece, I., Kuusik, A., Freeberg, T.M., Mänd, R., Rantala, M.J., Daukste, J., y Mänd, M. 2014. Male mealworm beetles increase resting metabolic rate under terminal investment. *Journal of Evolutionary Biology*, 27: 541–550.

- Lacey, E.S., Moreira, J.A., Millar, J.G., Ray, A.M. y Hanks, L.M. 2007. Male-produced aggregation pheromone of the cerambycid beetle *Neoclytus mucronatus mucronatus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 122: 171–179.
- Lavens, P., Piyatiratitivorakul, S., Menasveta, P. y Sorgeloos, P., 1991. HUFA levels in eggs of wild and cultured brood stock of *Macrobrachium rosenbergii*. In: Lavens, P., Sorgeloos, P., Jaspers, E., Ollevier, F. (Eds.), *Larvi'91*. EAS Special Publication, vol. 15. European Aquaculture Society, Gent, Belgium. 260–263.
- Lemos, D., y Rodríguez, A. 1997. Nutritional effects on body composition, energy content and trypsin activity of *Penaeus japonicus* during early postlarval development. *Aquaculture*, 160: 103–116.
- LeOra Software. 2002. *Polo Plus, a user's guide to probit and logit analysis*. LeOra Software, Berkeley, CA.
- Locatello, L. y Neat, F.C. 2005 Reproductive allocation in *Aidablennius sphinx* (Teleostei, Blenniidae): females lay more eggs faster when paired with larger males. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 303A: 922–926.
- Loyau, A., Saint Jalme, M., Mauget, R. y Sorci, G. 2007. Male sexual attractiveness affects the investment of maternal resources into the eggs in peafowl (*Pavo cristatus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 61: 1043–1052.
- Lung, N.P., Thompson, J.P., Kollias, G.V., Olsen, J.H., Zdziarski, J.A. y Klein, P.A. 1996. Maternal transfer of IgG antibodies and development of IgG antibody responses by blue and gold macaw chicks (*Ara ararauna*). *American Journal of Veterinary Research*, 57: 1157–1161.
- Macías, C. 1993. Una panorámica sobre selección sexual. En J. Núñez-Farfán y C. Cordero (Eds.), *Tópicos de Biología Evolutiva: Diversidad y adaptación* (pp. 83-93). México: Centro de Ecología, UNAM.
- Macías, C. 2002. ¿Es inevitable el conflicto entre sexos? ¿Cómo ves?, 48: 10-16.
- Malo, E.A. y Rojas, J.C. 2012. Métodos de investigación en semioquímicos. En: J. C. Rojas y E. A. Malo (Eds.). *Temas selectos en Ecología Química de Insectos* (pp. 17-45). México: El Colegio de la Frontera Sur.

- Manson, J.M., Picken, K.J., Draper, M.H. y Thompson, R. 1993. Variation among individual White-Leghorn hens in the concentration of minerals in the albumen and yolk content of their eggs. *British Poultry Science*, 34: 899–909.
- Martín, J. y López, P. 2000. Chemoreception, symmetry and mate choice in lizards. *Proceedings of the Royal Society of London B.*, 267: 1265-1269.
- Martín-Vivaldi, M. y Cabrero, J. Capítulo 13: Selección sexual. En: Soler, M. Ed. 2002. *Evolución. La base de la biología*. Proyecto Sur de ediciones, S.L. España. pp. 236-247.
- Miller, C.W. y Somjee, U. 2014. Male-male competition. En J. Losos (Ed.), *Oxford Bibliographies in Evolutionary Biology* (pp. 641-646). New York: Oxford University Press.
- Parker, G.A. 1970. Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Biological Reviews*, 45: 525–567.
- Penn, D. y Potts, W.K. 1998. Chemical signals and parasite-mediated sexual selection. *Trends in Ecology and Evolution*, 13: 391-396.
- Petrie, M., Halliday, T. y Sanders, C. 1991. Peahens prefer peacocks with elaborate trains. *Animal Behaviour*, 41: 323-331.
- Prestwich, K.N. 1994. The Energetics of Acoustic Signaling in Anurans and Insects. *American Zoologist*, 34: 625-643.
- Rantala, M.J., Jokinen, I., Kortet, R., Vainikka, A. y Suhonen, J. 2002. Do pheromones reveal male immunocompetence? *Proceedings of the Royal Society of London B.*, 269: 1681–1685.
- Rantala, M.J., Kortet, R., Kotiaho, J.S., Vainikka, A. y Suhonen, J. 2003. Condition dependence of pheromones and immune function in the grain beetle *Tenebrio molitor*. *Functional Ecology*, 17: 534-540.
- Rantala, M.J., Vainikka, A. y Kortet, R. 2003. The role of juvenile hormone in immune function and pheromone production trade-offs: a test of the immunocompetence handicap principle. *Proceedings of the Royal Society of London B.*, 270: 2257–2261.
- Rasband, W.S., ImageJ, U. S. 1997. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2015.

- Reaney, L. y Knell, R. 2010. Immune activation but not male quality affects female current reproductive investment in a dung beetle. *Behavioral Ecology* 21: 1367–1372.
- Reynolds, J.D. y Gross, M.R. 1992. Female mate preference enhances offspring growth and reproduction in a fish, *Poecilia reticulata*. *Proceedings of the Royal Society of London B.*, 250: 57–62.
- Rios-Delgado, S., Rodriguez, A., Cruz, L., Escobar, L., Aburto, Ma. de L. y Torres-Estrada, J. 2008. Respuesta de *Anopheles albimanus* a compuestos volátiles de casas del sur de Chiapas, México. *Salud Pública de México*, 50: 367-74.
- Roelofs, W.L. y Cardé, R.T. 1977. Responses of Lepidoptera to Synthetic Sex Pheromone Chemicals and their Analogues. *Annual Review of Entomology*, 22: 377-405.
- Rono, E., Njagi, P.G.N., Bashir, M.O. y Hassanali, A. 2008. Concentration-dependent parsimonious releaser roles of gregarious male pheromone of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Journal of Insect Physiology*, 54: 162–168.
- Sadd, B., Holman, L., Armitage, H., Lock, F., Marland, R. y Siva-Jothy, M.T. 2006. Modulation of sexual signalling by immune challenged male mealworm beetles (*Tenebrio molitor*, L.): evidence for terminal investment and dishonesty. *Journal Compilation European Society for Evolutionary Biology*. 321-325.
- Saino, N., Romano, M., Ferrari, R.P., Martinelli, R. y Moller, A.P. 2003. Maternal antibodies but not carotenoids in barn swallow eggs covary with embryo sex. *Journal of Evolutionary Biology*, 16: 516–522.
- Salze, G., Tocher, D.R., Roy, W.J. y Robertson, D.A. 2005. Egg quality determinants in cod (*Gadus morhua* L.): egg performance and lipids in eggs from farmed and wild broodstock. *Aquaculture*, 36: 1488-1499.
- Shapiro-Ilan, D., Rojas, M.G., Morales-Ramos, J.M. y Tedders, W.L. 2012. Optimization of a Host Diet for in vivo Production of Entomopathogenic Nematodes. *Journal of Nematology*, 44(3): 264–273.
- Sheldon, B.C. 2000. Differential allocation: tests, mechanisms and implications. *Trends in Ecology and Evolution*, 15: 397–402.

- Simmons, L.W. 1987. Female choice contributes to offspring fitness in the field cricket, *Gryllus bimaculatus* (de Gerr). Behavioral Ecology and Sociobiology, 21: 313-321.
- Simmons, L.W. 2001. Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. Princeton (NJ): Princeton University Press.
- Simmons, L.W. 2011. Resource allocation trade-off between sperm quality and immunity in the field cricket, *Teleogryllus oceanicus*. Behavioral Ecology, 23: 1-6.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goetze, N.M., Olson, B.J. y Klenk, D.C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Analytical Biochemistry, 150: 76-85.
- Sokal, R.R. y Rohlf, F.J. 1995. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research/New York.
- Spang, B. 2013. Insects as food: Assessing the food conversion efficiency of the mealworm (*Tenebrio molitor*). The Evergreen State College. 1-76.
- Stryer, L. 1995. Bioquímica, 3rd ed. Reverté, Barcelona, Spain.
- Tanaka, Y., Honda, H., Ohsawa, K. y Yamamoto, I. 1986. A sex attractant of the yellow mealworm, *Tenebrio molitor* L., and its role in mating behavior. Journal of Pesticide Science, 11: 49-55.
- Tandler A., Harel M., Koven W.M. y Kolkovski S. (1995) Broodstock and larvae nutrition in gilthead seabream *Sparus aurata* - new findings on its mode of involvement in improving growth, survival and swimbladder inflation. The Israeli Journal of Aquaculture, 47: 95-111.
- Vainikka, A., Rantala, M.J., Seppälä, O. y Suhonen, J. 2007. Do male mealworm beetles, *Tenebrio molitor*, sustain the honesty of pheromone signals under immune challenge? Acta Ethologica, 10: 63–72.
- Vincent, A., Ahnesjö, I. y Berglund, A. 1994. Operational sex-ratios and behavioral sex differences in a pipefish population. Behavioral Ecology and Sociobiology, 34: 435–442.
- Watanabe, T., Lee, M., Mizutani, J., Yamada, T., Satoh, S., Takeuchi, T., Yoshida, N., Kitada, T., Arakawa, T., 1991. Effective components in cuttlefish meal and raw

krill for improvement of quality of red seabream *Pagrus major* eggs. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57: 681–694.

- Wiesner, A. y Gotz, P. 1993. Silica beads induce celular and humoral immune responses in *Galleria mellonella* larvae and in isolated plasmatocytes, obtained by a newly adapted nylon wool separation metal. *Journal of Insect Physiology*, 39: 865–876.
- Wiklund, C., Kaitala, A., Lindfors, V. y Abenius, J. 1993. Polyandry and its effect on female reproduction in the green-veined white butterfly (*Pieris napi* L.). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 33: 25-33.
- Williams, C.M., Thomas, R.H., MacMillan, H.A. *et al.* 2011. Triacylglyceride measurement in small quantities of homogenised insect tissue: comparisons and caveats. *Journal of Insect Physiology*, 57: 1602–1613.
- Williams, T. D. 1994. Intraspecific variation in egg size and egg composition in birds: effects on offspring fitness. *Biological Reviews*, 68: 35–59.
- Weatherhead, P.J. y Robertson, R.J. 1979. Offspring quality and the polygyny threshold: “the sexy son hypothesis”. *The American Naturalist*, 113: 201-208.
- Whyte, J., Bourne, N. y Ginther, N. 1990. Biochemical and energy changes during embryo genesis in the rock scallop *Crassodoma gigantea*. *Marine Biology*, 106: 239–244.
- Worden, B.D., Parker, P.G. y Pappas, P.W. 2000. Parasites reduce attractiveness and reproductive success in male grain beetles. *Animal Behaviour*, 59: 543-550.
- Worden, B.D. y Parker, P.G. 2001. Polyandry in grain beetles, *Tenebrio molitor*, leads to greater reproductive success: material or genetic benefits? *Behavioral Ecology*, 12 (6): 761-767.
- Worden, B.D. y Parker, P.G. 2005. Females prefer noninfected males as mates in the grain beetle *Tenebrio molitor*: evidence in pre and postcopulatory behaviours. *Animal Behaviour*, 70: 1047-1053.
- Wyatt, T.D. 2003. *Pheromones and Animal Behaviour. Communication by Smell and Taste.* Cambridge University Press.
- Zahavi, A. 1977. The cost of honesty (further remarks on the handicap principle). *Journal of Theoretical Biology*, 67: 603-605.