



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

LICENCIATURA EN CIENCIAS AMBIENTALES

Escuela Nacional de Estudios Superiores,
Unidad Morelia

EFFECTO DEL MANEJO AGRÍCOLA EN LA ELECCIÓN DE
PAREJA DE *Tenebrio molitor*

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADA EN CIENCIAS AMBIENTALES

P R E S E N T A

ANAID PATIÑO MORALES

DIRECTOR DE TESIS: DR. JORGE CONTRERAS GARDUÑO

MORELIA, MICHOACÁN

FEBRERO, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES, UNIDAD MORELIA
SECRETARÍA GENERAL
SERVICIOS ESCOLARES

MTRA. IVONNE RAMÍREZ WENCE
DIRECTORA
DIRECCIÓN GENERAL DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
PRESENTE


Por medio de la presente me permito informar a usted que en la **sesión ordinaria 13** del **Comité Académico de la Licenciatura en Ciencias Ambientales** de la Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES) Unidad Morelia celebrada el día **12 de noviembre de 2018**, acordó poner a su consideración el siguiente jurado para la presentación del Trabajo Profesional del alumno (a) **Anaid Patiño Morales** de la Licenciatura en **Ciencias Ambientales**, con número de cuenta **414058727**, con el trabajo profesional titulado: "Efecto del manejo agrícola en la elección de pareja de *Tenebrio molitor*" bajo la dirección como **tutor** del Dr. Jorge Contreras Garduño.

El jurado queda integrado de la siguiente manera:

Presidente: Dr. Francisco Javier Espinoza García.
Vocal: Dra. Ek del Val de Gortari.
Secretario: Dr. Jorge Contreras Garduño.
Suplente 1: Dr. Milan Janda.
Suplente 2: Lic. Yolanda Magdalena García Rodríguez.

Sin otro particular, queda de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Morelia, Michoacán a. 01 de febrero de 2019.


DR. VÍCTOR HUGO ANAYA MUÑOZ
SECRETARIO GENERAL

AGRADECIMIENTOS

Quiero hacer un reconocimiento a la Licenciatura en Ciencias Ambientales por la formación que durante 8 semestres se me brindó a través de las enseñanzas de los buenos profesores.

Quiero agradecer al financiamiento brindado por el proyecto: **PAPIME-DEGAPA, UNAM (PE212917)** para la realización de la presente Tesis de Licenciatura.

A Roy Van Driesche por sus comentarios y sugerencias a los experimentos e interpretación de resultados.

A Bibiana Montoya por su aportación en los análisis estadísticos y por la interpretación de resultados.

Por último, agradezco profundamente a los miembros del comité evaluador por sus observaciones y comentarios para la mejora de la Tesis.

Dr. Jorge Contreras Garduño

Dra. Ek del Val de Gortari

Dr. Francisco Javier Espinosa García

Biol. Yolanda Magdalena García Rodríguez

Dr. Milan Janda

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a mi tutor de Tesis, el Dr. Jorge Contreras Garduño por todo el apoyo, compromiso y confianza que me ha brindado a lo largo de la realización de este proyecto. Pero sobre todo quiero agradecerle por brindarme las herramientas necesarias para adquirir nuevos conocimientos y habilidades durante mi estancia en el Laboratorio.

Quiero agradecer enormemente a la Biol. Yolanda Magdalena García Rodríguez por darme toda la confianza, paciencia y tiempo necesario para mi aprendizaje en Cromatografía de Gases, pero sobre todo quiero agradecerle por su gran amistad y por ser una persona tan entusiasta y divertida que siempre te alienta a ver las cosas de la mejor manera.

Agradezco también el apoyo incondicional del Biol. Daniel Ramírez Martínez que durante este proceso me apoyo en la realización de los experimentos, carteles y presentaciones del trabajo. Pero sobre todo quiero agradecerle por todas las enseñanzas y consejos que me brindó durante este tiempo y por su gran amistad.

Agradezco también a mis compañeros del Laboratorio de Ecología Evolutiva por todas las observaciones y consejos que me dieron durante las presentaciones de la tesis para su mejoramiento.

DEDICATORIA

De manera muy especial quiero agradecer a mis padres, Alfredo Patiño Camargo y Diana Morales Hernández por creer siempre en mí, darme los mejores consejos y apoyarme incondicionalmente a cada momento. Pero lo más importante es que quiero agradecerles por todo el cariño que me han dado en la vida y por todo el esfuerzo que han puesto para que culminara una etapa más de mi formación académica, mejores padres no pude tener, los amo. También agradezco a mi hermano Alfredo Patiño Morales por todos sus consejos y enseñanzas, pero sobre todo por estar conmigo en los momentos más importantes de mi vida. A ti, Enrique Orozco Díaz te agradezco todos tus consejos, enseñanzas y sobre todo valoro mucho el que creas siempre en mí y estés conmigo en todo momento.

RESUMEN

PROPÓSITO. El propósito de nuestro estudio fue determinar cómo la exposición al herbicida Paraquat (PQ) o la infección con el hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* afectó (1) la elección de pareja femenina, (2) la composición de los Hidrocarburos Cuticulares (HC) de los machos y (3) el número de larvas producidas por las hembras apareadas con los machos expuestos a los tratamientos (PQ o infección por hongos). El trabajo se realizó en el gusano de la harina (*Tenebrio molitor*), una especie en la cual las hembras evalúan a los machos en función de los olores.

MÉTODOS (1). La elección femenina se registró como el tiempo que las hembras permanecieron con un macho tratado contra un macho control. Los machos infectados se enfrentaron con machos Control (tween) y los machos retados con PQ con los machos tratados con agua (Control). En otra parte del experimento, incluimos un control positivo para la preferencia femenina, en el cual ofrecimos a las hembras la oportunidad de aparearse con "machos altamente preferidos" (siendo el primer macho con el que las hembras se habían apareado en un encuentro previo del experimento, en lo sucesivo, "macho Pareja") o un macho nuevo que se colocó previamente con otra hembra (en lo sucesivo, "macho Nuevo"). (2) La composición de HC de los machos se evaluó mediante cromatografía de gases. Usando este enfoque, comparamos los perfiles de HC de los machos de todos los grupos de tratamiento y control, con la adición de un nuevo grupo (machos vírgenes) que se agregó para controlar el efecto del apareamiento en la modulación de HC de los machos. (3) También registramos el número de descendientes (larvas) de machos tratados en comparación de machos control. Las crías de los machos Pareja o Nuevos, se criaron para registrar la preferencia femenina, y posteriormente se analizaron los HC de los hijos de los machos de todos los tratamientos.

RESULTADOS. (1) Las hembras prefirieron a los machos Pareja y a los machos retados con PQ en comparación con sus respectivos machos Control, pero no se encontraron diferencias entre los grupos de machos infectados y Control. (2) De los 21 Hidrocarburos Cuticulares identificados, solo 12 mostraron diferencias significativas entre los grupos de

prueba. El apareamiento causó cambios en los perfiles de HC de los machos, ya que los machos vírgenes produjeron más compuestos cuticulares relacionados con evitar la desecación en comparación de los machos apareados. Los "machos Pareja" mostraron niveles más altos de Octadecano, Heneicosano y 1-Pentacoseno, y niveles más bajos de Pentacosano en comparación con los machos Nuevos. Los machos tratados con PQ mostraron niveles más altos de 1-Pentacoseno que el grupo Control, mientras que los machos infectados con *M. anisopliae* mostraron niveles más altos de Tetracosano que su grupo Control. La composición de HC de la descendencia de los machos tratados experimentalmente fue similar al de sus padres únicamente para algunos compuestos específicos. (3) No hubo diferencias significativas en el número de descendientes (larvas) entre las hembras apareadas con los machos de los diferentes grupos de tratamiento.

DISCUSIÓN. De nuestro estudio, concluimos (a) que la exposición al Paraquat aumenta el atractivo de los machos hacia las hembras, pero queda por determinar si esta es una estrategia de “Inversión Terminal” por parte de los machos debilitados y si las mutaciones perjudiciales pueden ocurrir en la descendencia. (b) Aún debe determinarse si los efectos de la infección por hongos dependen de la dosis o del tiempo transcurrido desde el inicio de la infección, (c) que el apareamiento de los machos produce cambios en la composición de sus Hidrocarburos Cuticulares, y (d) que la composición de la mezcla de Hidrocarburos Cuticulares de los machos está más fuertemente influenciada por factores ambientales que por la genética, debido a que la descendencia mostró patrones de HC inconsistentes en relación con los de sus padres. Sugerimos que es necesario evitar el uso de Paraquat debido al riesgo potencial de causar daños a las especies no Blanco en los cultivos agrícolas.

ABSTRACT

PURPOSE. The purpose of our study was to determine how exposure to the herbicide Paraquat (PQ) or infection with the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* affected (1) female mate choice, (2) male cuticular hydrocarbon (CH) composition, and (3) the number of larvae produced by females mated to males exposed to treatments (PQ or fungal infection). Work was done in yellow mealworms (*Tenebrio molitor*), a species in which the females assess males based on odors.

METHODS. (1) Female choice was recorded as the time that females spend with a treated vs control male to mate. The infected males were confronted with tweek and the PQ males with males only treated with water. In another run of the experiment we include a positive control for female preference, in which we offered females the opportunity to mate with either “highly preferred males” (being the first male with which the females had mated in a previous run of the experiment, hereafter called “Previous Partners”) or a new, male that mated previously with another female (hereafter called “New Male”). (2) The CH composition of males was assessed using gas chromatography. Using this approach, we compared the CH profiles of males from all treatment and control groups, with the addition of one new group (virgin males) that was added to control for the effect of mating on male CH status. (3) We also recorded the number of offspring (counted as larvae) of males treated versus control males. Offspring produced from all groups were reared to record the female preference between offspring derived from males treated versus control males and the CH of male progeny once they became adults.

RESULTS. (1) Females preferred the previous partner or PQ males over their respective control males, but no differences were found between the infected and control male groups. (2) Of 21 cuticular hydrocarbons identified, only 12 showed significant differences among test groups. Mating caused changes in the CH profiles of males, as virgin males produced more CH compounds related to avoidance of desiccation than did mated males. “Highly preferred males” showed higher levels of Octadecane, Heneicosane and 1-Pentacosene, and lower levels of Pentacosane compared to new, unmated males.

Males treated with PQ showed higher levels of 1-Pentacosene than the control group, while males infected with *M. anisopliae* showed higher levels of Tetracosane than did their control group. The hydrocarbon composition of the male offspring of experimentally treated males resembled that of their male parents only for some specific compounds. (3) There were no significant differences in the number of offspring (scored as larvae) among females mated with males from different treatment groups.

DISCUSSION. From our study, we conclude (a) that exposure to Paraquat increases the sexual attraction of males to females, but it remains to be determined if this is a strategy of “terminal investment” by weakened males and whether damaging mutations might occur in offspring, (b) that it still needs to be determined if the effects of fungal infection are dose-dependent or depended on the time since the start of infection, (c) that mating by males leads to changes in the composition of their cuticular hydrocarbons, and (d) that the composition of the hydrocarbon mix of males is more strongly influenced by environmental factors than by genetics because offspring showed inconsistent CH patterns relative to those of their fathers. We suggest that the use of Paraquat be stopped due to the potential risk to cause damage to non-target species in agricultural fields.

INDICE

| | |
|--|-------|
| INTRODUCCIÓN..... | 1-6 |
| HIPÓTESIS Y PREDICCIONES..... | 7 |
| OBJETIVO GENERAL..... | 8 |
| Objetivos particulares..... | 8 |
| MATERIALES Y MÉTODO..... | 9-14 |
| Cría de <i>Tenebrio molitor</i> | 9 |
| Elección de pareja..... | 10 |
| Cantidad de larvas..... | 11 |
| Elección de pareja de las crías..... | 11 |
| Tratamiento con <i>Metarhizium anisopliae</i> y observación de conducta..... | 12 |
| Cantidad de larvas con respecto a <i>Metarhizium anisopliae</i> | 12 |
| Tratamiento con el herbicida Paraquat y observación de conducta..... | 12 |
| Cantidad de larvas con respecto al Paraquat..... | 13 |
| Extracción de Hidrocarburos Cuticulares..... | 13 |
| Análisis químico por Cromatografía de gases-Espectometría de masas de la cutícula de <i>Tenebrio molitor</i> | 13 |
| Identificación de compuestos químicos..... | 14 |
| Cuantificación de compuestos químicos..... | 14 |
| Análisis estadísticos..... | 14 |
| RESULTADOS..... | 15-43 |
| DISCUSIÓN..... | 44-52 |
| REFERENCIAS..... | 53-59 |

INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia, el humano ha satisfecho sus necesidades con base en los recursos naturales y servicios ambientales que ofrecen los diversos ecosistemas. Sin embargo, con el paso de los años, dichas necesidades han impactado fuertemente sobre los ecosistemas, generando una serie de problemas ambientales que contribuyen al cambio climático y que ponen en riesgo no sólo el bienestar humano sino también, de todas las formas de vida (Duarte *et al.*, 2006). Algunas de las causas son por ejemplo la alta demanda mundial de alimentos, vivienda o tecnología. Se han desmontado alrededor del 20-50% de bosques y selvas y convertido en tierras agrícolas, uso ganadero, construcción de viviendas o industria (Semarnacc, 2007) con lo que se generan altas emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) como dióxido de carbono (CO₂), metano (CO) u óxido nitroso (N₂O), que a su vez producen una mayor concentración de GEI en la atmósfera por lo que aumentan los niveles de contaminación ambiental (Semarnacc, 2007). Particularmente en el caso de México, el desarrollo de las actividades humanas ha provocado que alrededor del 37% de la cubierta forestal haya desaparecido y que aproximadamente el 45% del suelo se encuentre degradado debido a la conversión de bosques a tierras agrícolas (Semarnacc, 2007), ya que la agricultura representa una fuente de trabajo importante para alrededor del 13% los habitantes del país (McMahon *et al.*, 2011).

Dentro de estos problemas, la expansión agrícola ha generado numerosos efectos sobre la adecuación de cientos de especies animales y vegetales, afectando las interacciones bióticas (Valiente-Banuet *et al.*, 2015) ya que la fragmentación de su hábitat los obliga a migrar a diferentes sitios (Semarnacc, 2007). Pero otro grave problema es que la intensificación del manejo agrícola incorpora una serie de prácticas que buscan optimizar y mantener el rendimiento de los cultivos a costa de los efectos dañinos en otras especies que no son Blanco de la optimización agrícola. Dos de estas prácticas van encaminadas al control de plagas y malezas de los cultivos, y entre estas prácticas las más comunes son: el uso de controladores biológicos y de herbicidas (Van Driesche *et al.*, 2009).

En diversas ocasiones, dentro de los cultivos se alojan organismos no deseados (plagas) en la producción agrícola, por lo que se recurre al control biológico. El control biológico se refiere al uso de organismos depredadores, patógenos o parasitoides que la mayoría de las veces son muy específicos, y que logran minimizar el daño de las plagas (Jonsson *et al.*, 2014). Sin embargo, también se recurre al control de plagas por medio del uso de agroquímicos. Por ejemplo, insecticidas, herbicidas y plaguicidas, siendo el Paraquat (PQ) uno de los herbicidas más comúnmente utilizados en el control de plagas en cultivos agrícolas (Koch y Hill, 2017). Este herbicida ha sido ampliamente estudiado y se ha encontrado que puede provocar serias afectaciones sobre la salud humana y sobre los organismos que interactúan en el ecosistema (Koch y Hill, 2017). Por ejemplo, cuando el Paraquat entra al sistema de los animales induce estrés oxidante en las células debido al aumento de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) con respecto a las moléculas antioxidantes, generando daño de biomoléculas clave tales como lípidos, proteínas y ADN (Metcalf y Alvares, 2010). En la actualidad este tema ha despertado interés porque diversas investigaciones buscan entender los efectos del PQ en los ecosistemas y en el ciclo de vida de distintos organismos que cohabitan en el sitio, así como el daño oxidante que genera el uso de PQ en diferentes concentraciones y que podría afectar la adecuación de diversas especies animales (Koch y Hill, 2017).

Aunado al éxito de los insecticidas microbiales derivados de la bacteria *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) se han realizado investigaciones a fin de identificar otros grupos de patógenos que pudieran ser eficaces como agentes de control biológico. Sin embargo, es necesario tomar en cuenta que el patógeno a utilizar en los bioplaguicidas sea de bajo costo e inclusive que pueda ser producido por los agricultores (Van Driesche *et al.*, 2009). Se ha identificado que los hongos entomopatógenos pueden desarrollarse como bioplaguicidas, ya que son especies que pueden actuar contra una o diversas plagas de cultivos dependiendo del grado de especificidad y de las condiciones ambientales del lugar de aplicación del producto (Van Driesche *et al.*, 2009). Un ejemplo de la utilización de un hongo entomopatógeno como bioplaguicida es *Metharizum anisopliae*, el cual se ha utilizado en el control de una plaga de saltamontes en Asia y Sudamérica y ha resultado muy exitoso ya que la tasa de mortalidad de los saltamontes ha sido elevada (Van Driesche *et al.*, 2009).

También se ha utilizado en el control de la plaga del sapo de la caña de azúcar *Aeneolamia varia* Fabricius var. *saccharina*, dónde se encontró que seis meses después de la aplicación del hongo aún existían niveles óptimos de *M. anisopliae* para controlar la plaga (Van Driesche *et al.*, 2009). En otro ejemplo se usaron *M. anisopliae* y *Beauveria bassiana* como alternativa y/o complemento al uso de insecticidas comerciales para el control de mosquitos vectores de malaria (*Anopheles gambiae s.s.*, *Anopheles funestus* y *Anopheles arabiensis*; Farenhorst *et al.*, 2009). Se llevaron a cabo infecciones con *B. bassiana* y la tasa de mortalidad fue del 100% en un periodo de 8-20 días. En otro experimento infectaron mosquitos con *M. anisopliae* o *B. bassiana* para probar su resistencia a DDT y Permetrina. La mortalidad aumentó y ambos hongos disminuyeron la resistencia a los insecticidas en comparación con los control. Esto demuestra que es posible utilizar de manera conjunta a los Hongos entomopatógenos y a los insecticidas como agentes de control biológico, incrementando posiblemente el grado de efectividad sobre el control de plagas (Farenhorst *et al.*, 2009). Sin embargo, los agentes de control biológico podrían tener daños colaterales sobre otros organismos, y es muy probable que estos efectos negativos se vean reflejados en la reproducción. Es muy posible, que esta actividad antropogénica de uso del herbicida PQ y de hongos entomopatógenos como *Metarhizium*, no solamente genere un efecto negativo sobre la salud de los organismos a nivel individual, sino también sobre sus interacciones con otros organismos. En este sentido, una interacción intraespecífica muy importante en la reproducción es la búsqueda, elección y reconocimiento de parejas potenciales, al igual que la lucha por parejas. Por lo tanto, es posible que el uso de PQ y *Metarhizium* afecten la salud de los machos, y en consecuencia la elección de pareja por parte de las hembras (Caja 1. Selección Sexual). Por ejemplo, Thaochan y Ngampongsai (2018) analizaron el efecto de *Metarhizium guizhouense* sobre la competencia entre machos por el acceso a cópula y la elección de pareja en la mosca de la fruta *Bactrocera latifrons* y encontraron que los machos tratados con el hongo y los machos control fueron similarmente competitivos los primeros cuatro días después de la infección. Sin embargo, al quinto día del tratamiento, los machos infectados disminuyeron significativamente su competitividad y murieron rápidamente. Además, las hembras vírgenes se aparearon mayormente con los machos infectados con hongo en comparación con las hembras grávidas a excepción del tercer día del tratamiento. Sin embargo, los machos infectados

transmitieron el patógeno a las hembras durante el apareamiento por lo que murieron rápidamente (Thaochan y Ngampongsai, 2018). En otro estudio, Rosengaus *et al.* (2011), evaluaron el efecto del uso del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* sobre la elección de pareja de la termita *Zootermopsis angusticollis*. Se obtuvo que las hembras no tuvieron preferencia por ningún grupo de machos (sanos o infectados). A pesar de que permanecieron mayor tiempo con los machos infectados, no hubo diferencias significativas. Sin embargo, se observó que las hembras que estuvieron en contacto directo con machos infectados tuvieron costos en la supervivencia en comparación de las hembras sin contacto (Rosengaus *et al.*, 2011).

Caja 1. Teoría de la Selección Sexual.

La Selección Sexual fue propuesta por Darwin en 1871 como concepto clave de la Teoría de Selección Natural. Dicho concepto hace referencia a la capacidad de los organismos de conseguir pareja, reproducirse y tener descendencia viable. En la atracción de pareja, los machos generalmente emplean distintas estructuras como cuernos, astas, olores llamativos, danzas o cantos; atributos denominados Caracteres Sexuales Secundarios (CSS), y su grado de expresión se relaciona positivamente con su éxito reproductivo (Contreras-Garduño *et al.*, 2009). Darwin propuso que las CSS evolucionaban por tres mecanismos: competencia por parejas, elección de pareja y conflicto sexual. La competencia por parejas es protagonizada por machos y explica la evolución de las armas como por ejemplo cuernos, astas y dientes, pero también hay atributos más sutiles como el tamaño en general. Por ejemplo, en el grillo *Gryllus bimaculatus* los machos se enfrentan entre ellos por el acceso a refugios naturales y a las hembras, donde el tamaño corporal, el llamado de atracción “estridulación”, la agresividad, la experiencia previa en combates y la densidad de la población, son factores importantes para atraer a la hembra (Simmons, 1986). La elección de pareja es un proceso importante de la evolución, que consiste en el sesgo de un sexo por aparearse con los miembros del sexo opuesto en función del grado de desarrollo de sus CSS (Edward, 2014). En 1972 Trivers propuso que la elección de pareja era realizada por las hembras porque invierten más recursos en el cuidado de la progenie. Por ejemplo, en el pez colorado *Poecilia reticulata* la hembra elige copular con el macho que se acerca a su depredador y escapa de él. Esta conducta únicamente la realiza el macho en presencia de la hembra y es la manera en que la atrae y accede a la cópula (Contreras-Garduño *et al.*, 2009). Por último, el conflicto ocurre cuando ambos sexos difieren en su óptimo de apareamiento y disminuyen su inversión en las crías a costa de la inversión del sexo opuesto (Contreras-Garduño *et al.*, 2009). Por ejemplo, en los patinadores *Gerris gracilicornis* los machos compiten por tener el mayor número de copulas con distintas hembras y las hembras prefieren aparearse poco, así que en ellas evolucionó un tapón que impide al macho introducir su edeago. Sin embargo, en los machos evolucionó una estrategia de apareamiento intimidante: emitir señales de onda en el agua que atrae a sus depredadores cuando las hembras no acceden a la cópula, por lo que muchas hembras permiten la cópula debido al riesgo de depredación (Han y Jablonski, 2010).

Dentro del efecto antropogénico sobre la selección sexual, el único trabajo al momento es de Arellano y Macías-García (2008) en los peces *Girardinichthys multiradiatus*. En este estudio se demostró que los Caracteres Sexuales Secundarios (CSS) utilizados por los peces machos para atraer hembras (coloración, tamaño de la aleta, rendimiento del cortejo) se vieron afectados desde la etapa embrionaria por el contacto con dosis pequeñas de insecticidas organofosforados. Dichas dosis fueron suministradas en el alimento de las madres y de las crías, y se obtuvo como resultado que varias de las crías murieron espontáneamente antes de convertirse en adultos y que algunos otros sufrieron afectaciones morfológicas, disminución en el tamaño de las aletas o una coloración anormal. También, el insecticida provocó que los peces que llegaron a la etapa adulta tuvieran una menor capacidad para eludir el estrés oxidativo, lo que posiblemente podría repercutir sobre su sistema nervioso. Además, algo sumamente interesante fue que la hembra no copuló con los peces expuestos al insecticida, lo que podría impactar sobre la adecuación del pez (Arellano y Macías-García, 2008). Por lo tanto, como se observa en el ejemplo anterior, el uso de sustancias tóxicas sobre los ecosistemas podría impactar sobre los mecanismos de elección de pareja de diversas especies de vertebrados e invertebrados, ya que muchas especies animales eligen a su pareja por medio de la vista, olfato, tacto, o el olor; siendo poca la información que se tiene de estos mecanismos para invertebrados.

Un buen modelo de estudio para responder esta pregunta es *Tenebrio molitor* porque las hembras eligen copular con machos que producen más feromona que otros dado que la feromona es un indicador honesto de la capacidad de respuesta a desafíos ambientales (Rantala *et al.*, 2003). Además, en *Tenebrio molitor* las hembras tienen la capacidad de memorizar a su pareja hasta 5 días después de haber copulado, y en un segundo encuentro lo vuelve a elegir si este mantiene una óptima condición (Cordero, 2014, 2017). En laboratorio es muy fácil manipular la condición de los machos agregando un análogo (metopreno) de Hormona Juvenil III (HJ), un compuesto que favorece la producción de feromonas en los machos volviéndolos más atractivos para las hembras (Rantala *et al.*, 2003; Cordero, 2014, 2017). Sin embargo, no se sabe cómo las hembras reconocen los aromas de los machos, aunque se presume que las moléculas que podrían ser buenos candidatos son los Hidrocarburos de Cutícula (HC) porque son compuestos volátiles

presentes en la cutícula de los insectos (Calderón, 2009). Además, se sugiere que son responsables de la comunicación y reconocimiento químico entre individuos, en varias especies de insectos (Thomas y Simmons, 2009). Por lo tanto, se utilizó a *Tenebrio molitor* como modelo de estudio para comprender de qué manera la comunicación química entre los animales de una especie, afecta la elaboración de las Caracteres Sexuales Secundarios (CSS) y permite el reconocimiento de los machos por parte de las hembras, así como el efecto de la utilización de agroquímicos (herbicidas) y agentes de control biológico (Hongo) sobre la elección de pareja. Esto no se ha investigado, y por lo tanto no se sabe qué tan confiable era esta relación sobre la elección de pareja, los HC y su relación con los hijos, por lo que el primer objetivo fue analizar los HC de los machos que son más atractivos en la población (las parejas con HJ). Esto permitió conocer la variación de HC en machos sin contaminantes, y compararla con el efecto del Paraquat y *M. anisopliae* sobre los machos. Además, otro control de esta comparación fue la inclusión de machos vírgenes, lo que permitiría conocer si cambian los HC de los machos al enfrentar a las hembras.

HIPOTESIS

El uso de Paraquat y *Metarhizium anisopliae* afectan la elección de pareja y cantidad de larvas en insectos.

PREDICCIONES

Las hembras preferirán a los machos Control en comparación con los machos retados con Paraquat y *Metarhizium anisopliae*.

Las hembras tendrán más larvas con los machos Control que con los machos retados con Paraquat o *Metarhizium anisopliae*.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del manejo agrícola en particular el agente de control biológico *Metarhizium anisopliae* y el herbicida Paraquat, en la elección de pareja de *Tenebrio molitor*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Determinar qué efecto tiene la cópula sobre el perfil de HC de los machos.
- 2) Determinar la elección de pareja, el perfil de HC y la cantidad de larvas de los machos Pareja o Nuevos, así como la elección de pareja y perfil cuticular de sus hijos.
- 3) Determinar el efecto de *Metarhizium anisopliae* y Paraquat sobre la elección de pareja, el perfil de HC y la cantidad de larvas, así como el perfil cuticular de sus hijos.

MATERIALES Y MÉTODO

Crianza de *T. molitor*

Se obtuvieron individuos desde la etapa larvaria del Insectario Maria Sibylla Merian de la Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES) unidad Morelia perteneciente a la UNAM. Los tenebrios se mantuvieron a una temperatura de 27 ± 1 ° C y en completa oscuridad (Márquez-García *et al.*, 2016 y Carazo *et al.*, 2004). Fueron alimentados *ad libitum* con salvado de trigo y harina de maíz (1:1) estéril y un trozo de manzana cada tercer día (Márquez-García *et al.*, 2016; Castro-Vargas *et al.*, 2017). Posteriormente, cada insecto fue separado en la etapa de pupa y se colocó individualmente en cajas de plástico de 12 pozos (Corning) con alimento estéril. El sexado se realizó tomando en cuenta el desarrollo del área genital del lado ventral del último segmento abdominal (Figura 1) (Bhattacharya *et al.*, 1970). Posteriormente se registró la fecha en que los adultos (hembras y machos) emergieron para poder controlar la edad a la cual se inició cada experimento (10 ± 1 día de edad adulta; Márquez-García *et al.*, 2016). Esta edad coincide con el pico reproductivo en hembras y machos y con los niveles máximos de producción de Hormona Juvenil (HJ) III (Cole *et al.*, 2003).

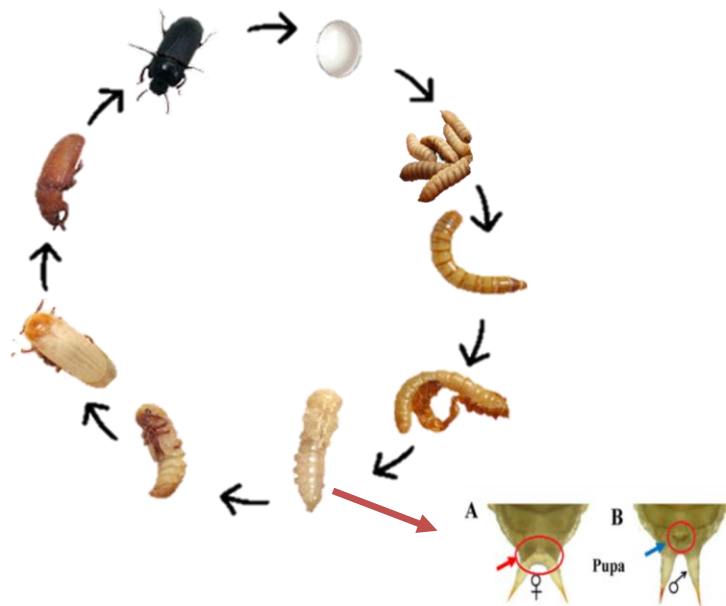


Figura 1. Ciclo de vida de *T. molitor*.

1. Elección de pareja

Los machos adultos de *T. molitor* (10 ± 1 día) recibieron Metropeno (análogo de la HJ III) para favorecer la producción de feromonas. Se tomó en cuenta la talla de los individuos para tener controlada esta variable durante el experimento (Márquez-García *et al.*, 2016). El Metropeno ($1 \mu\text{L}$) fue aplicado con una micropipeta de manera tópica en la región de la cabeza y el pronoto (Cordero, 2017). Siguiendo lo estipulado en Cordero (2017), cada macho fue asignado a una hembra virgen de 10 ± 1 días de edad (sin tratamiento). Posteriormente, la pareja fue depositada en una caja petri de vidrio por 10 minutos con papel filtro estéril en el fondo, registrando los intentos de cópula y la cópula exitosa. Cada insecto se marcó con pintura de agua (marca Baco) para diferenciarse a nivel individual (hembra: anaranjado, macho amarillo). Posteriormente a los 5 días después del primer encuentro entre la hembra y el macho, se realizó un segundo encuentro entre la hembra, el macho Pareja (macho del primer encuentro) y un Nuevo macho sometido al mismo tratamiento que el anterior, pero apareado con una hembra distinta (Figura 2). Cabe señalar que todos los individuos fueron marcados con colores diferentes (sin ningún efecto sobre la elección de pareja) para ser identificados individualmente, hembra: anaranjado, macho Pareja: amarillo y macho Nuevo: verde (Cordero, 2017). Se realizaron pruebas de observación por 10 minutos dónde se registró el número de cópulas, la cópula final y la conducta de los individuos, evaluando si la hembra prefiere de nuevo a su macho Pareja o al macho Nuevo (Cordero, 2017).

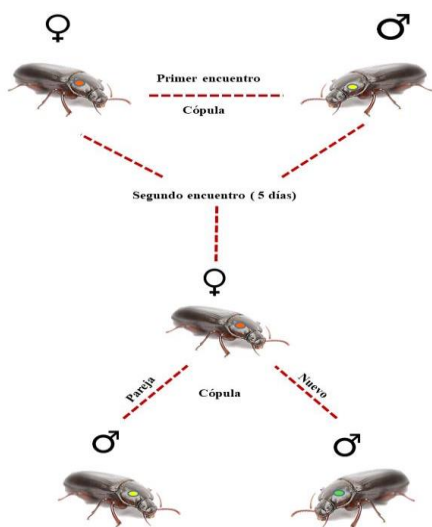


Figura 2. En el primer encuentro las hembras copulan con un macho, a los 5 días después se les ofrece el mismo macho (Pareja) y uno Nuevo para que realice la elección de pareja.

1.1. Cantidad de larvas

Al finalizar la prueba de elección de pareja, la mitad de las hembras fueron colocadas con el macho que eligieron durante las pruebas y la otra mitad fue colocada con un macho impuesto. Ambos individuos se colocaron en un contenedor de plástico con comida *ad libitum* por cinco días (Cordero, 2017), posteriormente se retiró al macho y únicamente la hembra permaneció en el contenedor hasta que los huevos eclosionaron y posteriormente se contabilizó el número de larvas de cada hembra, esto con la finalidad de observar si existe o no compensación por parte de la hembra con respecto a la condición del macho con el que se aparea.

1.2. Elección de pareja de las crías

Se realizaron pruebas de elección de pareja con los hijos ($n = 14$) de machos aceptados o rechazados por las hembras. Cabe resaltar que ningún tratamiento fue aplicado a los hijos, puesto que se observaría si era heredable la elección de pareja de las hembras (madres). Para las pruebas de elección de pareja se colocaron individuos vírgenes en una cámara de conducta: una hembra, un hijo de macho Pareja y a un hijo de macho Nuevo, dónde la hembra (sin ningún tratamiento) fue colocada en la arena central y cada macho fue colocado en los extremos de la arena en contraposición, con papel filtro estéril al fondo (Márquez-García *et al.*, 2016). La prueba tuvo una duración de 10 minutos, con 5 minutos de habituación. Se registró el número de visitas de la hembra a cada uno de los machos, así como el tiempo que permaneció con cada uno, sumándose al final el número de visitas y el tiempo para conocer la preferencia de la hembra (Cordero, 2017).

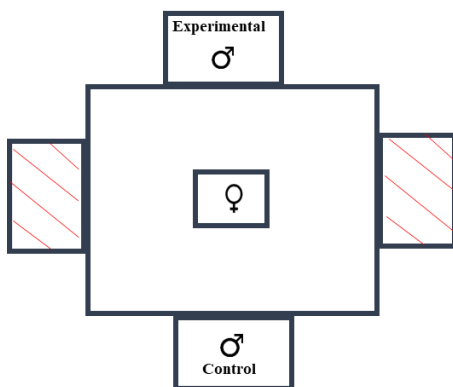


Figura 3. La hembra y cada uno de los machos fueron colocados en la cámara de conducta para realizar las pruebas de elección de pareja.

1.3. Tratamiento con *Metarhizium anisopliae* y observación de conducta

Se realizó otro experimento en el que se retó inmunitariamente a otro grupo de machos vírgenes de la misma edad que los anteriores. Este experimento consistió en inocular con una jeringa de 10 μL , en la región abdominal entre el segundo segmento del par de patas del lado derecho con 1 μL de Tween 80 con 200 conidias/ μL de la cepa MA10 de *M. anisopliae* (Gómez-Medina *et al.*, 2018). Posteriormente a la inyección, se dejó incubar al hongo por 3 horas dentro del insecto, antes de realizar el experimento (Gómez-Medina *et al.*, 2018). Se utilizaron 200 conidias, pues esta es la dosis letal en *T. molitor* (Castro-Vargas *et al.*, 2016; Gómez-Medina *et al.*, 2018). En contraparte, un grupo de machos adultos recibió 1 μL de Tween 80 (Sigma) a una concentración de 0.001%, el cual funciona como solución control del hongo. Posteriormente se realizaron las pruebas de elección de pareja bajo las condiciones estipuladas en Márquez-García *et al.* (2016) y Cordero (2017).

1.4. Cantidad de larvas con respecto a *Metarhizium anisopliae*

Al finalizar las observaciones de elección de pareja, se conformaron parejas con una hembra y un macho inoculado con Hongo o Tween. Se colocaron en contenedores de plástico con comida *ad libitum* por 5 días, para que la hembra depositara los huevos y posteriormente se contabilizaron las larvas emergidas por hembra.

1.5. Tratamiento con Paraquat (40mM) y observación de conducta.

Por último, se realizó el experimento que consistió en inducir estrés oxidante en los machos utilizando al herbicida Paraquat (Martínez-Lendeck *et al.*, 2018; Augustyniak *et al.*, 2015; Bus y Gibson, 1984 y Abdollahi *et al.*, 2004) que es uno de los agroquímicos más utilizados en el control de plagas agrícolas (Koch y Hill, 2017). A un grupo de machos vírgenes (10 ± 1 día de edad) se les administró oralmente con ayuda de una micropipeta 1 μL del herbicida (Paraquat) a una concentración de 40 miliMolar (mM) en agua y a otro grupo de machos (Control) se les dio a beber de manera similar una solución control de agua destilada. Después de las 3 horas de la administración de los tratamientos (Contreras Garduño *et al.*, 2009; Martínez-Lendeck *et al.*, 2018), se realizaron las pruebas de elección de pareja según lo estipulado en Márquez-García *et al.* (2016) y Cordero (2017).

1.6. Cantidad de larvas con respecto al Herbicida Paraquat 40 Mm

Al finalizar las observaciones de elección de pareja, se conformaron parejas con una hembra y un macho tratado con Paraquat o un macho Control (Agua) y se colocaron en contenedores de plástico con comida *ad libitum* por 5 días para que la hembra depositara los huevos. Posteriormente se contabilizaron las larvas depositadas por hembra.

2. Extracción de Hidrocarburos Cuticulares

Para la extracción de Hidrocarburos Cuticulares se utilizaron machos en su etapa adulta ($n = 162$) de *T. molitor*; estos fueron depositados en un frasco ámbar con taparrosca de plástico que contenía 2 mL de hexano grado reactivo (J.T. Baker), durante 10 minutos (Nielsen y Holman, 2012). Posteriormente los insectos fueron retirados de los frascos y se colocaron en cajas de 12 pozos (Corning) y se obtuvo su peso seco. Por otra parte, los frascos ámbar con los 2 mL de hexano se colocaron en refrigeración a 4 °C hasta su análisis químico.

2.1. Análisis químico por Cromatografía de Gases/Espectometría de masas de *T. molitor*

La muestra se concentró a sequedad bajo una corriente suave de nitrógeno, posteriormente se resuspendió en 50 µL de hexano. Se inyectó 2 µL de éste extracto hexánico de *T. molitor* en un cromatógrafo de gases Agilent (HP6890) equipado con un detector de masas (HP5973). El cromatógrafo se operó usando helio como gas acarreador con un flujo de 1 mL/min, con inyección dividida (split 60.3:1) a una temperatura de 250 °C, en una columna capilar no polar HP5MS (30m x 0.25mm x 0.25µm), usando el siguiente programa de temperatura en el horno: una temperatura inicial de 50 °C, seguida de una rampa de 20 °C/min hasta llegar a una temperatura de 200 °C por un tiempo de 1 minuto, otra rampa de 20 °C/min hasta llegar a una temperatura final de 300 °C, durante 3 min. El espectrómetro de masas se operó a una velocidad de flujo de 1 mL/minuto, con un voltaje de ionización a 70eV, a una temperatura de la interfase de 280 °C, en modo SCAN y en un rango de masas de 50-550 *m/z* (García-Rodríguez *et al.*, 2016).

2.2. Identificación de compuestos

Se revisó la pureza de cada uno de los picos de los cromatogramas y la comparación de espectros de masas de los compuestos con los de la biblioteca *National Institute of Standards and Technology* (NIST02). Solo fueron aceptados los picos con pureza de pico de uno y la identificación de espectros con concordancia por arriba del 90 %.

Calculo de índices Kovats. Se inyectó 1.0 µL de una serie de alcanos puros (Sigma Aldrich) C₈-C₄₀ en el cromatógrafo de gases Agilent 6890 acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 5973 (CG-MS), en las mismas condiciones en las que se analizaron las muestras. Estos *Índices Kovats* se compararon con los reportados en la literatura (Adams, 2007) y se reportaron con la lista de compuestos .

2.3. Cuantificación de compuestos

Para calcular la concentración de cada compuesto se usó el método de área obteniendo el porcentaje de los compuestos, eliminando previamente los picos de las impurezas identificadas. Estas concentraciones relativas se reportaron en porcentajes y miligramos.

2.4. Análisis estadísticos

El análisis del número de cópulas se realizó con una prueba de Chi-cuadrada (X^2) con el programa Statistica 7.0 StatSoft, Inc 2004. Para analizar la concentración de los Hidrocarburos Cuticulares (HC) en todos los grupos experimentales, se realizó un Modelo Lineal Generalizado (MLG). La elección de pareja de hijas de machos Pareja y Nuevos y la elección de las hembras entre machos tratados con Paraquat, machos infectados con Hongo y sus Controles; así como la cantidad de larvas de todos los tratamientos, se analizaron con una prueba de *t*-Student, tomando en cuenta el tiempo que pasó la hembra con cada uno de los machos. Se muestran la media \pm error estándar (e.e). Estos análisis fueron realizados en el programa SPSS Statistics, Inc 2013, versión 22.0.0.0. Además, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) en R versión 3.5.2.

RESULTADOS

1. Elección de pareja

Se corroboró la elección de pareja: las hembras prefirieron copular con el primer macho con el que se aparearon 5 (65%; $X^2 = 9.00$, $p < 0.002$, $n = 28$) y 8 (64%; $X^2 = 7.84$, $p < 0.005$, $n = 28$) días después del primer encuentro, en comparación con el macho Nuevo (Figura 4).

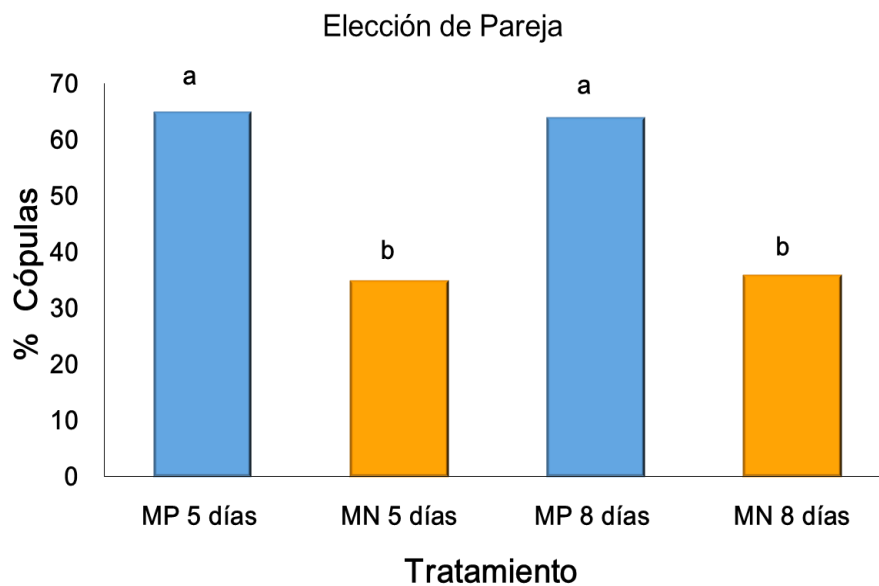


Figura 4. Las hembras tuvieron mayor porcentaje de copulas con machos Pareja (MP) que con machos Nuevos (MN) a los 5 y 8 días después de la primera cópula.

1.1 HC en la elección de pareja

El análisis de componentes principales mostró que los primeros dos componentes fueron válidos con un valor mayor a 1 ($ACP1 = 3.05$ y $ACP2 = 1.93$) tuvieron un mayor porcentaje de varianza explicada.

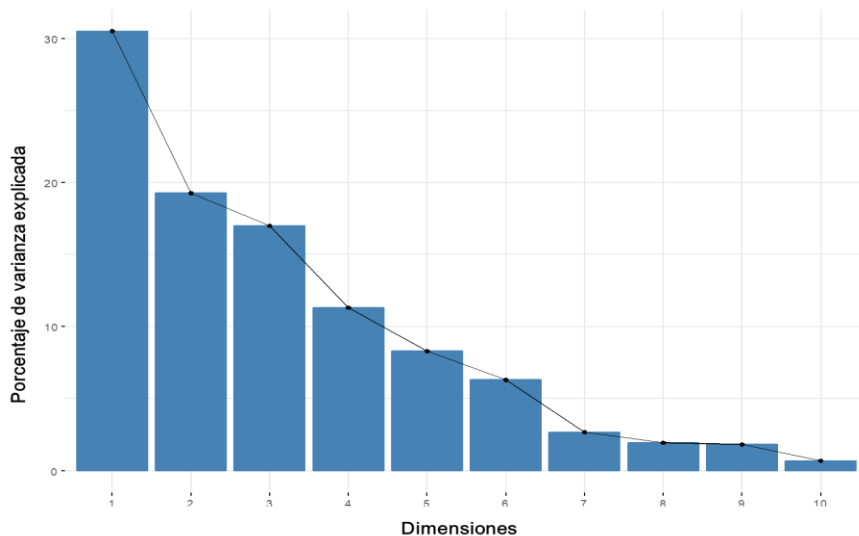


Figura 5. Los primeros dos componentes principales explicaron el 50% de la variación.

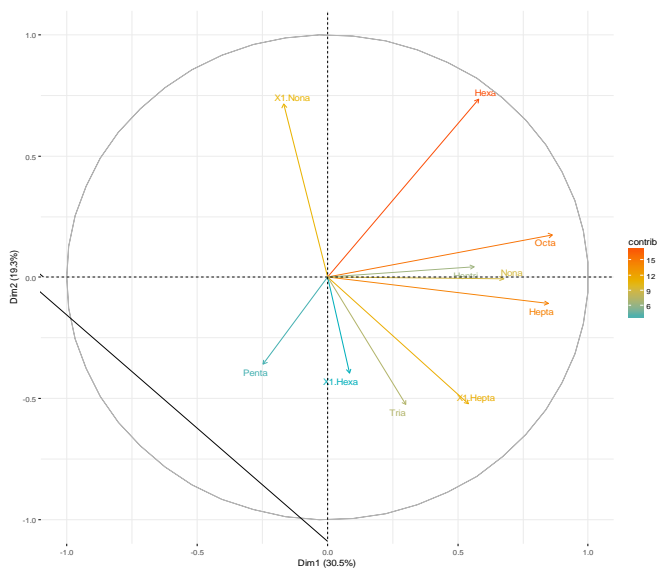


Figura 6. Heptacosano y Octacosano son los compuestos que contribuyen más al CP1, relacionándose positivamente con este componente, mientras que Hexacosano, 1-Nonacoseno, 1-Heptacoseno y Triacontano contribuyen más al CP2, relacionándose positivamente los dos primeros y los últimos de manera negativa.

Tabla 1. Lista de compuestos que contribuyen en mayor porcentaje a los CP1 Y CP2.

| Compuesto | ACP1 | ACP2 |
|---------------|-------|--------|
| Pentacosano | -0.25 | -0.35 |
| 1-Hexacoseno | 0.08 | -0.39 |
| Hexacosano | 0.58 | 0.73 |
| 1-Heptacoseno | 0.54 | -0.52 |
| Heptacosano | 0.84 | 0.11 |
| Octacosano | 0.86 | 0.17 |
| 1-Nonacoseno | -0.16 | 0.71 |
| Nonacosano | 0.67 | -0.005 |
| Triacotano | 0.30 | -0.52 |
| Hentriacotano | 0.56 | 0.04 |

El componente principal 1 (CP1) fue el único que mostró diferencias significativas entre grupos, ya que los machos Control aumentaron el valor de los compuestos químicos (HC) (1.59 ± 0.51) en comparación de los machos Pareja (-1.12 ± 0.51) y Nuevos (-0.47 ± 0.33 ; $X^2 = 15.42$, $p < 0.001$), mientras que el componente principal 2 (CP2) no mostró diferencias significativas entre los grupos: machos Control (0.50 ± 0.50), machos Pareja: (0.34 ± 0.50) y machos Nuevos (-0.84 ± 0.50 , $X^2 = 4.37$, $p < 0.11$).

Se encontraron 17 HC pero solamente 8 mostraron diferencias significativas entre grupos. Los HC que no tuvieron diferencias significativas entre grupos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Lista de compuestos que no mostraron diferencias significativas entre grupos.

| Compuesto | No. Carbonos | Chi-cuadrada de Wald | Significancia (p) |
|--------------------|-----------------------|----------------------|-------------------|
| Tricosano | C ₂₃ | 3.14 | 0.20 |
| 11-Metil Tricosano | 11-me C ₂₃ | 4.10 | 0.12 |
| 1-Tetracoseno | 1-C ₂₄ | 2.14 | 0.34 |
| Tetracosano | C ₂₄ | 0.51 | 0.77 |
| 1-Hexacoseno | 1-C ₂₆ | 2.09 | 0.35 |
| Hexacosano | C ₂₆ | 4.96 | 0.08 |
| 1-Nonacoseno | 1-C ₂₉ | 4.20 | 0.12 |
| Tricotano | C ₃₀ | 5.31 | 0.07 |
| Hentriacotano | C ₃₁ | 0.34 | 0.84 |

Los compuestos que mostraron diferencias significativas fueron separados en 4 grupos. En el primer grupo: Octadecano (1.31 ± 0.06), Heneicosano (1.93 ± 0.22) y 1-Pentacoseno (4.86 ± 0.25) del macho Pareja se encontraron en mayor concentración que en el macho Nuevo (1.0 ± 0.04 , 1.31 ± 0.15 y 4.04 ± 0.21 , respectivamente) y Control (1.0 ± 0.04 , 1.07 ± 0.12 y 4.05 ± 0.21 , respectivamente); sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre Control y Nuevo ($X^2 = 17.89$, $p < 0.0001$, $X^2 = 11.57$, $p < 0.003$, $X^2 = 8.01$, $p = < 0.01$ y; $n = 21$, respectivamente; Figura. 7). Esto sugiere que el Octadecano, Heneicosano y 1-Pentacoseno son compuestos atractivos para las hembras.

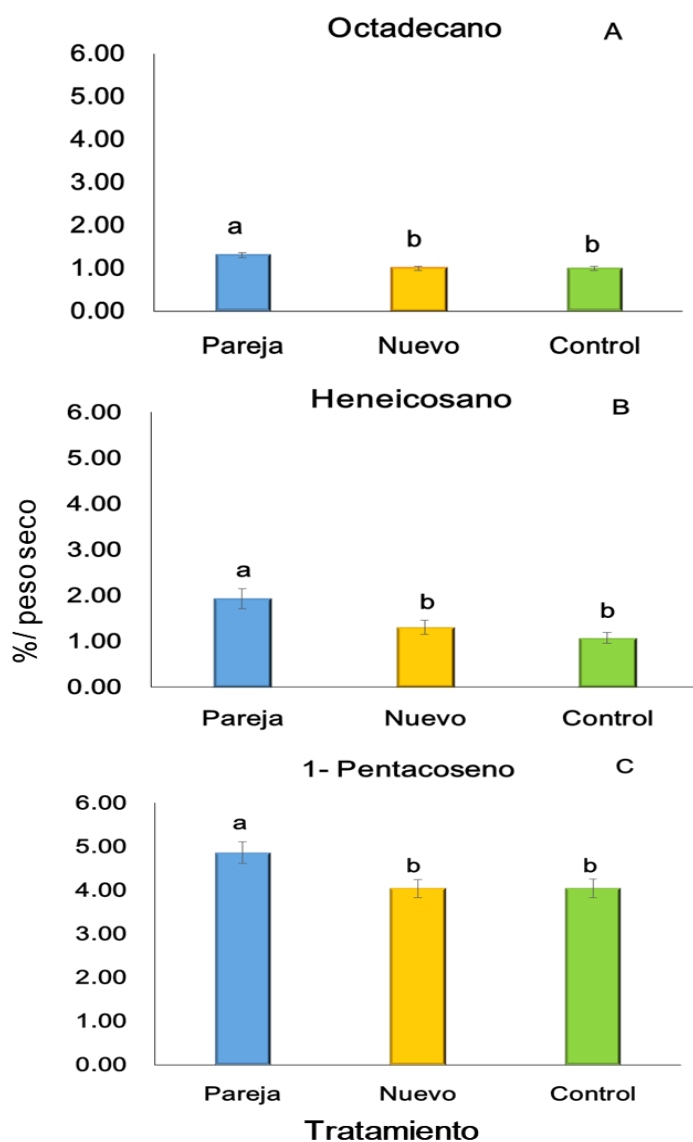


Figura 7. Los machos Pareja tuvieron mayor concentración de %/peso seco (eje “X”) de Octadecano (C_{18}), Heneicosano (C_{21}) y 1-Pentacoseno ($1-C_{25}$) en comparación con machos Nuevos y Control (eje “Y”).

En el segundo grupo de HC, los resultados mostraron diferencias significativas; los machos Control tuvieron mayor concentración de 1-Heptacoseno (2.05 ± 0.15), Heptacosano (2.8 ± 0.30) y Octacosano (1.98 ± 0.18) que los machos Pareja (1.09 ± 0.15 , 1.9 ± 0.21 , 1.0 ± 0.09 , respectivamente) y Nuevos (1.24 ± 0.17 , 1.9 ± 0.21 , 1.15 ± 0.11 , respectivamente) pero no hubo diferencias significativas entre los machos Pareja y Nuevos ($X^2 = 9.46$, $p < 0.009$, $X^2 = 7.04$, $p < 0.03$ y $X^2 = 22.39$, $p < 0.0001$; $n = 21$, respectivamente; Figura 8). Esto sugiere que los tres compuestos no forman parte de la atracción de pareja.

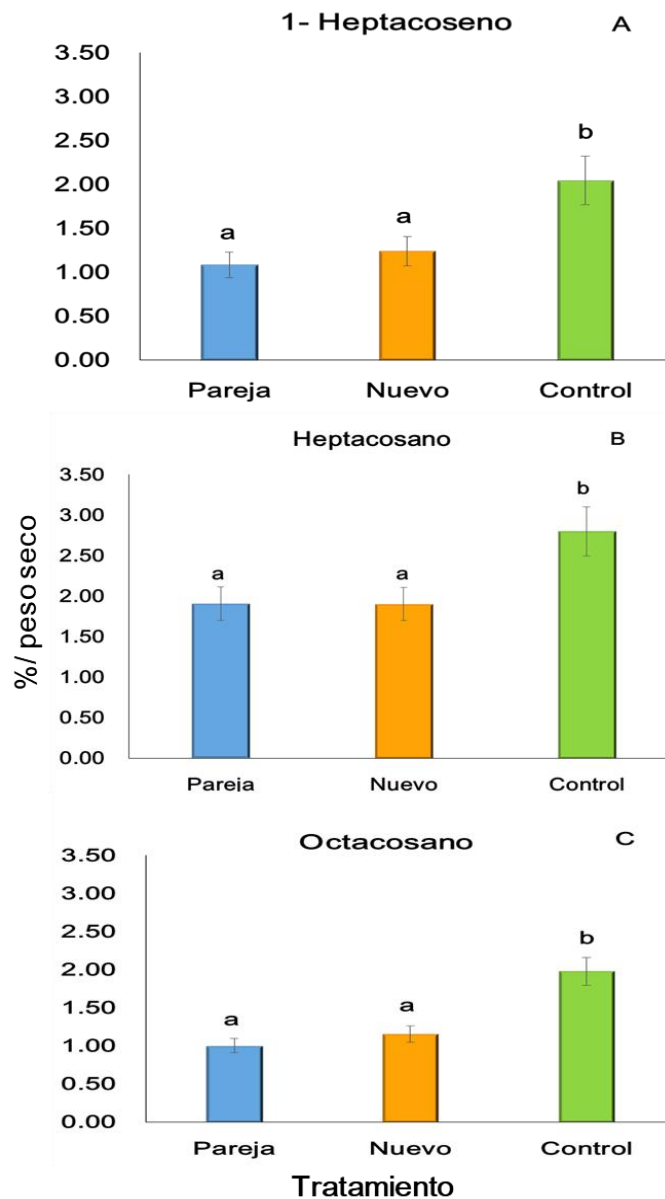


Figura 8. Los machos Control tuvieron mayor concentración de %/peso seco (eje “X”) de 1-Heptacoseno (C_{27}), Heptacosano (C_{27}) y Octacosano (C_{28}) que machos Pareja y machos Nuevos (eje “Y”).

En el tercer grupo, los machos Nuevos (4.63 ± 0.14) tuvieron mayor concentración de Pentacosano que los machos Pareja (4.04 ± 0.12) pero no hubo diferencias con los machos Control (4.22 ± 0.12 ; $X^2 = 10.74$, $p < 0.005$; $n = 21$; Figura 9).

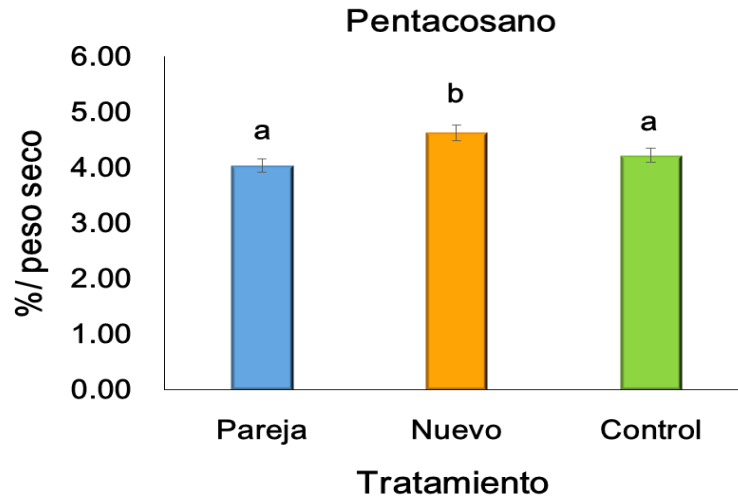


Figura 9. Los machos Nuevos tuvieron mayor concentración de %/peso seco (eje “X”) de Pentacosano (C_{25}) en comparación con los machos Pareja y Control (eje “Y”).

Finalmente, el Nonacosano presentó menor concentración (3.08 ± 0.14) en el grupo de machos Pareja que en los Nuevos (3.55 ± 0.17) y Control (3.95 ± 0.19) pero no hubo diferencias entre Control y Nuevos ($X^2 = 14.05$, $p < 0.001$; $n = 21$; Figura 10).

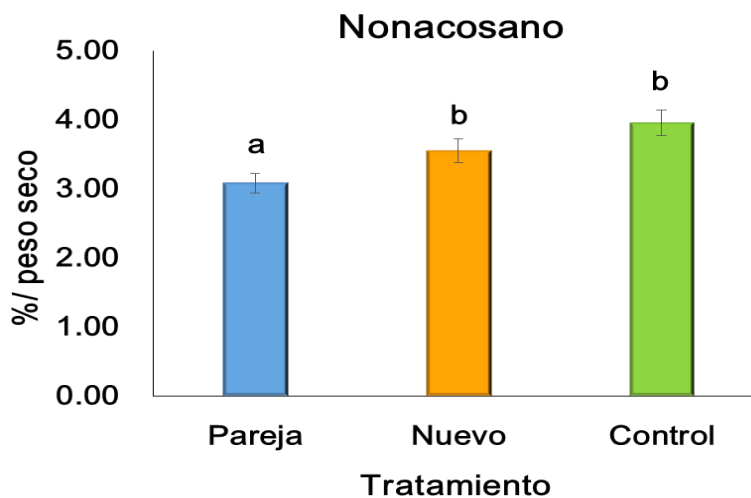


Figura 10. Los machos Control tuvieron mayor concentración de %/peso seco (eje “X”) de Nonacosano (C_{29}) que los machos Pareja. Sin embargo, no hay diferencias significativas con machos Nuevos (eje “Y”).

1.2 Cantidad de larvas

No hubo diferencias significativas en el número de larvas de las hembras que copularon con machos Pareja a los 5 (22.27 ± 4.62) u 8 días (21.33 ± 3.60) en comparación con las que copularon con machos Nuevos (5 días: 20.36 ± 3.18 ; $t = 0.34$, $p < 0.74$, $n = 22$; 8 días: 20.00 ± 4.62 ; $t = 0.28$, $p < 0.78$, $n = 22$).

1.2.1 Elección de pareja de las crías

Las hijas de machos Pareja no mostraron preferencia por los hijos de machos Pareja (222.8 ± 61.01 s) o Nuevos (137.14 ± 33.93 s; $t = 1.23$, $p = 0.24$). Las hijas de machos Nuevos tampoco tuvieron preferencia por los hijos de machos Pareja (180.0 ± 58.55 s) o Nuevos (188.57 ± 53.07 s; $t = 0.11$, $p = 0.91$).

1.2.2 HC de hijos de machos Pareja o Nuevos

El análisis de componentes principales mostró que únicamente el primer componente (CP1) fue válido con un valor mayor a 1 (ACP1= 2.13) y explicó casi el 50% de la variación.

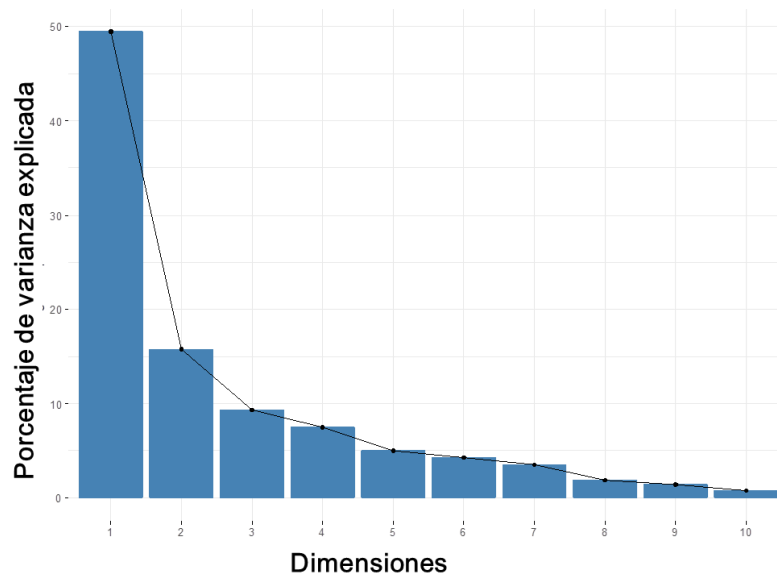


Figura 11. El primer componente principal explica el 50% de la variación.

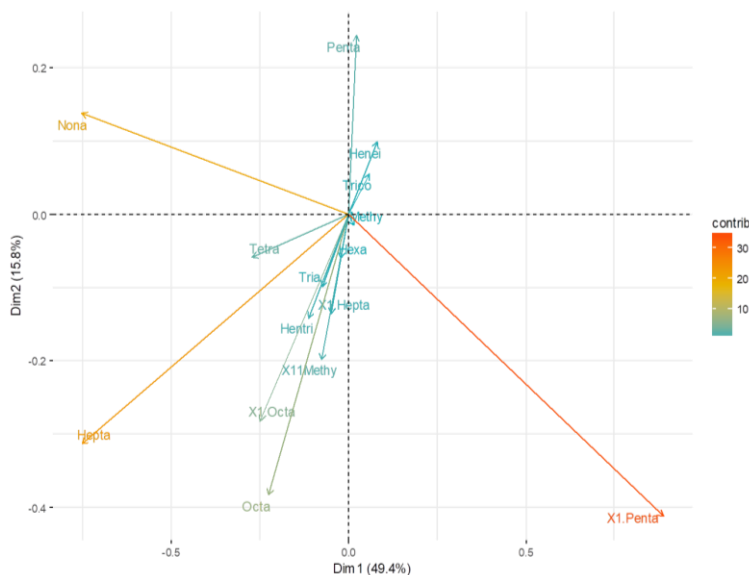


Figura 12. El compuesto 1-Pentacoseno contribuye más al CP1, relacionándose positivamente con este componente, mientras que Heptacosano y Nonacosano también contribuyen pero se relacionan negativamente.

Tabla 3. Lista de compuestos que contribuyen en mayor porcentaje al CP1.

| Compuesto | ACP1 |
|---------------------|-------|
| Heneicosano | 0.08 |
| Estearato de Metilo | 0.01 |
| Tricosano | 0.06 |
| 11-Metil Tricosano | -0.07 |
| Tetracosano | -0.27 |
| 1-Pentacoseno | 0.89 |
| Pentacosano | 0.02 |
| Hexacosano | -0.02 |
| 1-Heptacoseno | -0.05 |
| Heptacosano | -0.75 |
| 1-Octacoseno | -0.25 |
| Octacosano | -0.22 |
| Nonacosano | -0.75 |
| Triacontano | -0.07 |
| Hentriacontano | -0.11 |

El componente principal 1 (CP1) fue el único que mostró diferencias significativas entre grupos, ya que los hijos de machos Pareja aumentaron el valor de los compuestos químicos (HC) (1.34 ± 0.31) en comparación de los hijos de machos Nuevos (0.16 ± 0.31) y Control (-1.49 ± 0.31 ; $X^2 = 22.76$, $p < 0.001$).

Se obtuvieron 15 HC del perfil cuticular de los hijos de machos Pareja o Nuevos, pero solamente 5 mostraron diferencias significativas entre grupos. Los HC que no fueron significativos se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Lista de compuestos no significativos de Hijos de machos Pareja y Nuevos.

| Compuesto | No. Carbonos | Chi-Cuadrada de Wald | Significancia (p) |
|---------------------|-----------------------|----------------------|-------------------|
| Heneicosano | C ₂₁ | 2.35 | 0.30 |
| Estearato de metilo | --- | 2.07 | 0.35 |
| Tricosano | C ₂₃ | 0.35 | 0.83 |
| 11-Metil Tricosano | 11-me C ₂₃ | 1.96 | 0.37 |
| Tetracosano | C ₂₄ | 5.27 | 0.07 |
| Pentacosano | C ₂₅ | 0.76 | 0.68 |
| Hexacosano | C ₂₆ | 2.09 | 0.35 |
| 1-Heptacoseno | 1-C ₂₇ | 2.19 | 0.33 |
| Triacotano | C ₃₀ | 5.47 | 0.06 |
| Hentriacotano | C ₃₁ | 2.24 | 0.32 |

Los compuestos con diferencias significativas fueron separados en 3 grupos. En el primer grupo, los hijos de machos Pareja tuvieron mayor concentración de 1-Pentacoseno (5.16 ± 0.43), en comparación con los machos Control (3.63 ± 0.30). Sin embargo, no existieron diferencias con el grupo de los hijos de machos Nuevos (4.07 ± 0.34 ; $X^2 = 8.40$, $p < 0.01$; $n = 21$; Figura 13). Este resultado y el de los padres refuerzan la idea de que el 1-Pentacoseno es determinante en la elección de pareja.

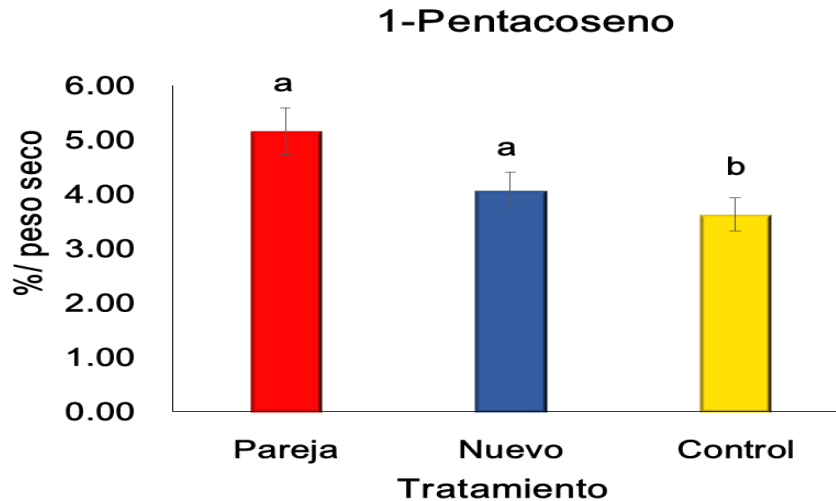


Figura 13. Los hijos de machos Pareja tuvieron mayor concentración de %/peso seco (eje “X”) de 1- Pentacoseno (1-C₂₅) en comparación de los hijos de machos Nuevos y machos Control (eje “Y”).

En el segundo grupo, los machos Control tuvieron mayor concentración de Heptacosano (2.8 ± 0.36), 1- Octacoseno (1.59 ± 0.15) y Octacosano (1.60 ± 0.16), que los machos Pareja (1.26 ± 0.16 , 1.0 ± 0.10 , 1.0 ± 0.10 , respectivamente) y Nuevos (1.50 ± 0.19 , 1.0 ± 0.10 , 1.0 ± 0.10 , respectivamente), pero no hubo diferencias significativas entre los machos Pareja y Nuevos ($X^2 = 16.50$, $p < 0.0001$, $X^2 = 12.31$, $p < 0.002$ y $X^2 = 11.26$, $p < 0.004$, respectivamente; $n = 21$; Figura 14). Estos resultados también confirman que el Heptacosano y Octacosano no se relacionan con la elección de pareja porque se encontró un resultado similar en los padres.

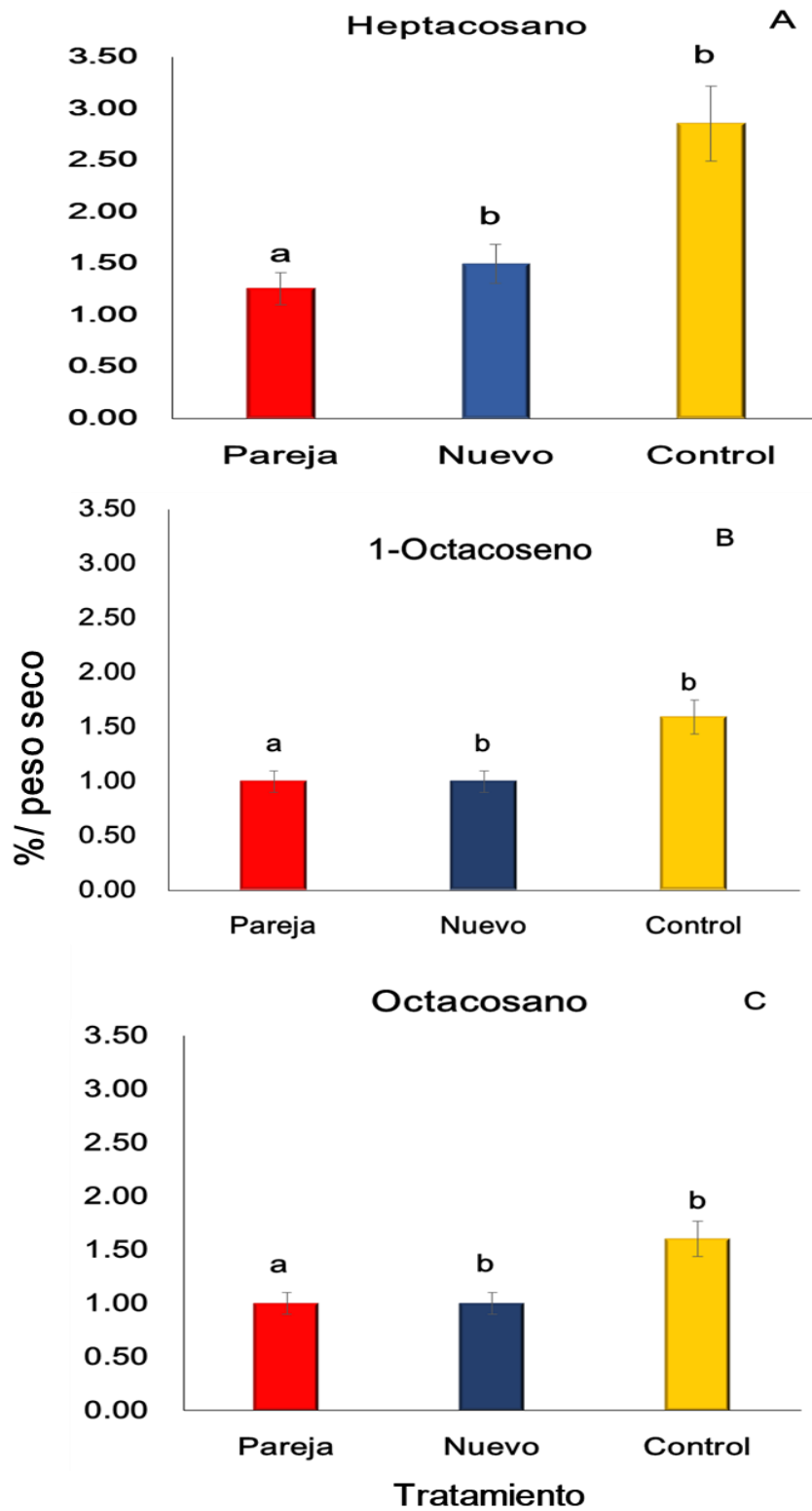


Figura 14. Los machos Control tuvieron mayor concentración de %/peso seco (eje “X”) de Heptacosano (C_{27}), 1-Octacoseno ($1-C_{28}$) y Octacosano (C_{28}) en comparación con los hijos de machos Pareja y machos Nuevos (eje “Y”)

En el tercer grupo, los machos Control tuvieron mayor concentración de Nonacosano (4.02 ± 0.36) que los hijos de machos Pareja (2.56 ± 0.23) pero no tuvieron diferencias con los hijos de machos Nuevos (3.30 ± 0.30 ; $X^2 = 12.27$, $p < 0.002$; $n = 21$; Figura 15). Aquí también cabe resaltar el resultado similar en sus padres.

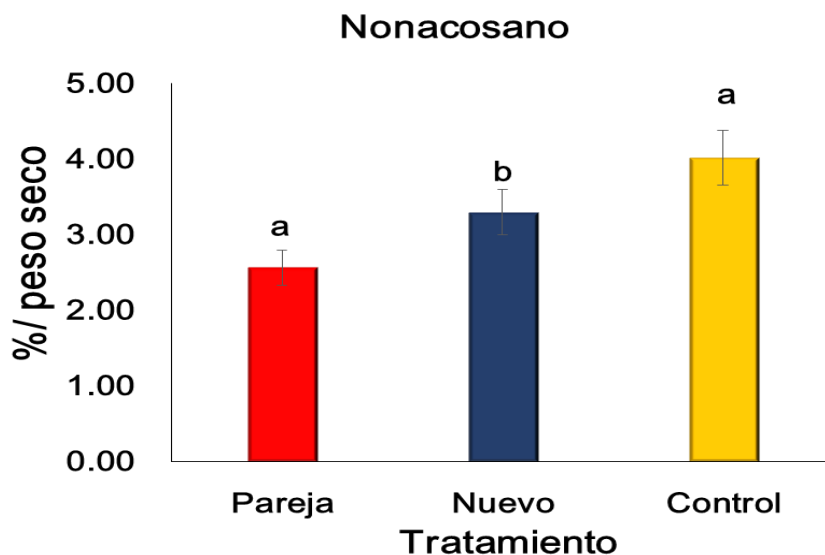


Figura 15. Los machos Control tuvieron mayor concentración de %/peso seco (eje “X”) de Nonacosano (C_{29}) en comparación con los hijos de machos Pareja. Sin embargo, no hubo diferencias con los hijos de machos Nuevos (eje Y”).

2. Elección de pareja con respecto a la infección con hongo

No existieron diferencias significativas en la elección de pareja de las hembras respecto al grupo de machos infectados con Hongo (216.40 ± 19.91 s) y los machos Control (193.40 ± 19.68 s; $t = 0.82$, $p = 0.41$; $n = 60$).

2.1. HC con respecto a la infección con Hongo en machos

El análisis de componentes principales mostró que los primeros dos componentes fueron válidos con un valor mayor a 1 (ACP1= 1.97 y ACP2 = 1.54) y juntos explicaron casi el 55% de la variación.

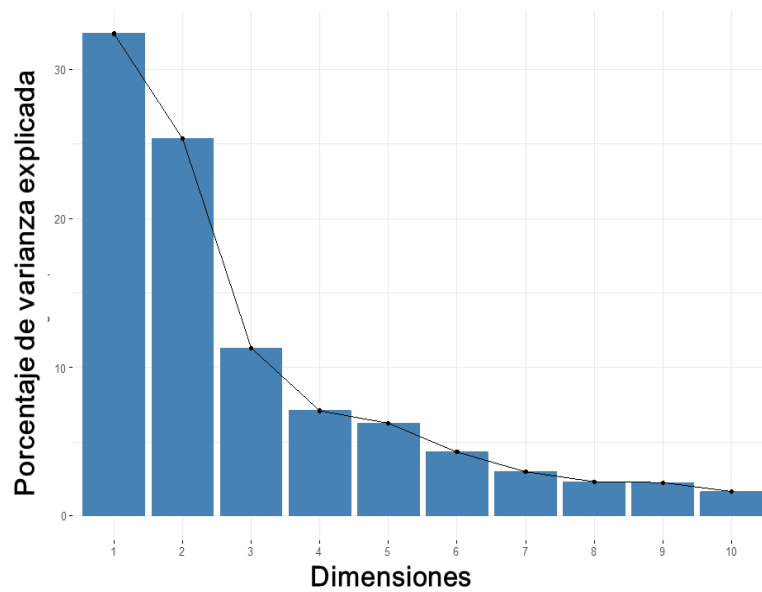


Figura 16. Los primeros dos componentes principales explicaron el 55% de la variación.

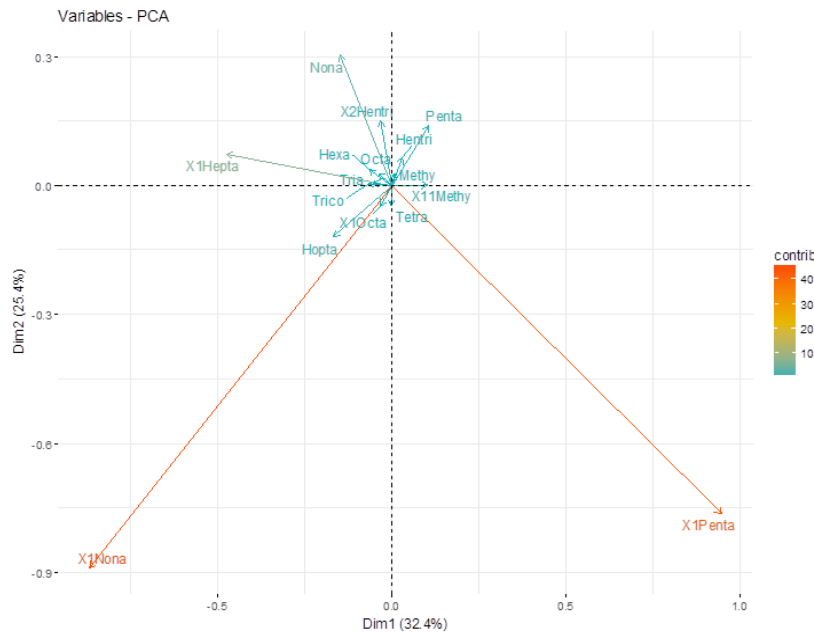


Figura 17. 1-Pentacoseno, 1-Heptacoseno y 1-Nonacoseno son los compuestos que contribuyen más al CP1, relacionándose el primero positivamente y los dos últimos negativamente con el componente 1, mientras que 1- Pentacoseno y 1-Nonacoseno contribuyen más al CP2, relacionándose de manera negativa con el componente.

Tabla 5. Lista de compuestos que contribuyen en mayor porcentaje a los CP1 Y CP2.

| Compuesto | ACP1 | ACP2 |
|---------------------|-------------|-------------|
| Estearato de Metilo | 0.001 | 0.029 |
| Tricosano | -0.07 | 0.003 |
| 11-Metil Tricosano | 0.10 | 0.002 |
| Tetracosano | -0.002 | -0.05 |
| 1-Pentacoseno | 0.95 | -0.76 |
| Pentacosano | 0.10 | 0.14 |
| Hexacosano | -0.06 | 0.04 |
| 1-Heptacoseno | -0.48 | 0.07 |
| Heptacosano | -0.17 | -0.12 |
| 1-Octacoseno | -0.03 | -0.05 |
| Octacosano | -0.04 | 0.03 |
| 1-Nonacoseno | -0.87 | -0.89 |
| Nonacosano | -0.15 | 0.30 |
| Triacotano | -0.05 | 0.007 |
| 2-Hentriaconteno | -0.03 | 0.15 |
| Hentriacontano | 0.03 | 0.07 |

El componente principal 1 (CP1) no mostró diferencias significativas entre grupos, ya que los machos infectados con Hongo (-0.02 ± 0.37) presentaron valores similares de concentración de HC a los de machos Control (0.02 ± 0.37 ; $X^2 = 0.01$, $p < 0.91$). Mientras que el componente principal 2 (CP2) tampoco mostró diferencias significativas entre los grupos: machos infectados con Hongo (-0.10 ± 0.31) y machos Control (0.10 ± 0.31 , $X^2 = 0.21$, $p < 0.64$).

Se encontraron 16 HC pero solamente uno mostró diferencias significativas entre grupos. Los compuestos que no mostraron diferencias significativas se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Lista de compuestos no significativos respecto a machos infectados con Hongo y de machos Control (Tween).

| Compuesto | No. Carbonos | Valor de t | Significancia (p) |
|---------------------|-----------------------|------------|-------------------|
| Estearato de metilo | --- | -0.78 | 0.44 |
| Tricosano | C ₂₃ | -1.07 | 0.29 |
| 11-Metil Tricosano | 11-me C ₂₃ | 0.46 | 0.64 |
| 1-Pentacoseno | 1-C ₂₅ | 0.12 | 0.89 |
| Pentacosano | C ₂₅ | -0.54 | 0.58 |
| Hexacosano | C ₂₆ | 0.28 | 0.77 |
| 1-Heptacoseno | 1-C ₂₇ | -0.78 | 0.44 |
| Heptacosano | C ₂₇ | 1.15 | 0.25 |
| 1-Octacoseno | 1-C ₂₈ | 0.35 | 0.72 |
| Octacosano | C ₂₈ | 1.04 | 0.30 |
| 1-Nonacoseno | 1-C ₂₉ | 0.41 | 0.68 |
| Nonacosano | C ₂₉ | 0.11 | 0.90 |
| Triacontano | C ₃₀ | 1.46 | 0.16 |
| Dos-Hentriaconteno | 2-C ₃₁ | -1.46 | 0.16 |
| Hentriacontano | C ₃₁ | -1.18 | 0.25 |

El Tetracosano (1.44 ± 0.09) del macho infectado fue el único compuesto que presentó diferencias significativas con respecto a los machos Control (1.14 ± 0.06 ; $t = -2.76$, $p < 0.01$; $n = 30$; Figura 18).

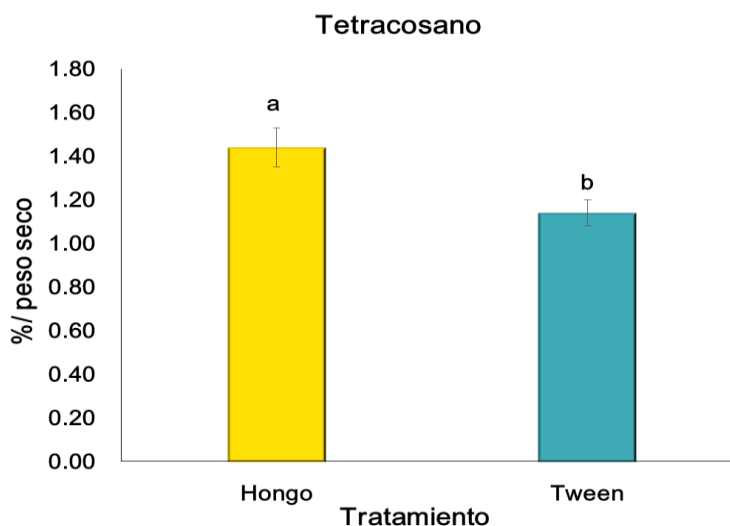


Figura 18. Los machos infectados con Hongo tuvieron mayor concentración de %/peso seco (eje “X”) de Tetracosano que los machos Control (Tween) (eje “Y”).

2.1.2 Cantidad de larvas respecto a la infección con Hongo

No hubo diferencias significativas en el número de larvas que depositaron las hembras que copularon con machos infectados con Hongo (32.93 ± 4.60) en comparación con las que copularon con machos Control (Tween) (31.13 ± 4.61 ; $t = 0.27$, $p < 0.78$, $n = 30$).

2.1.3 HC de hijos provenientes de machos infectados con Hongo

El análisis de componentes principales mostró que únicamente el primer componente fue válido con un valor mayor a 1 ($ACP1 = 1.16$), explicando casi el 30% de la variación.

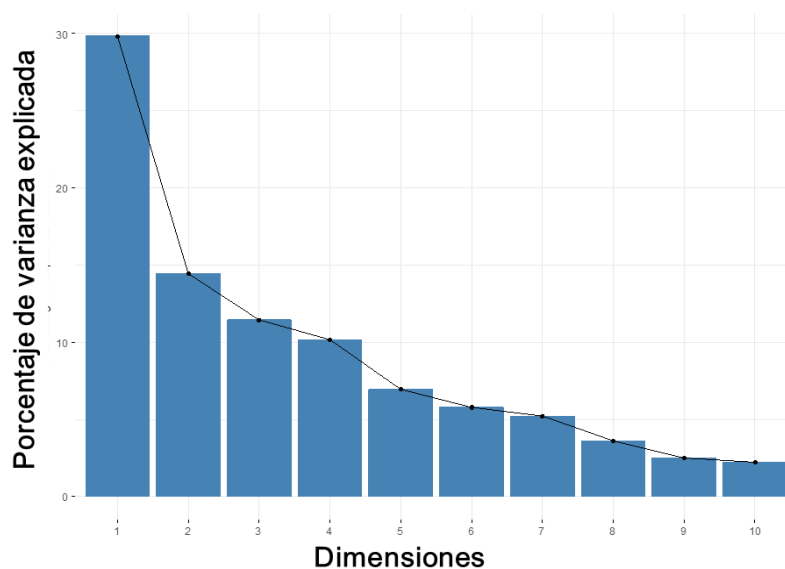


Figura 19. El primer componente principal explica el 30% de la variación.

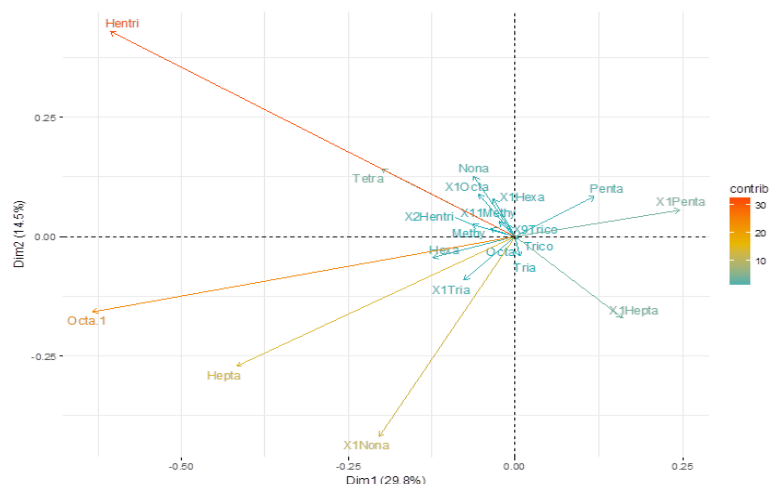


Figura 20. 1-Pentacoseno, Heptacosano y Octacosano son los compuestos que contribuyen más al CP1, relacionándose el primero positivamente y los dos últimos negativamente con el componente.

Tabla 7. Lista de compuestos que contribuyen en mayor porcentaje al CP1.

| Compuesto | ACP1 |
|---------------------|--------|
| Octadecano | -0.005 |
| Estearato de Metilo | -0.04 |
| 9-Tricosano (z) | -0.009 |
| Tricosano | 0.001 |
| 11-Metil Tricosano | -0.02 |
| Tetracosano | -0.20 |
| 1-Pentacoseno | 0.25 |
| Pentacosano | 0.12 |
| 1-Hexacoseno | -0.03 |
| Hexacosano | -0.12 |
| 1-Heptacoseno | 0.16 |
| Heptacosano | -0.42 |
| 1-Octacoseno | -0.05 |
| Octacosano | -0.63 |
| 1-Nonacoseno | -0.20 |
| Nonacosano | -0.06 |
| 1-Triaconteno | -0.08 |
| Triacontano | 0.006 |
| 2-Hentriaconteno | -0.06 |
| Hentriacontano | -0.61 |

El componente principal 1 (CP1) no mostró diferencias significativas entre grupos, ya que los hijos de machos infectados con Hongo (-0.01 ± 0.27) presentaron valores similares de concentración de HC a los de machos Control (0.01 ± 0.27 ; $X^2 = 0.001$, $p < 0.98$).

Se encontraron 20 HC pero solamente uno mostró diferencias significativas entre grupos. Los compuestos que no mostraron diferencias significativas se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Lista de compuestos no significativos respecto a hijos de machos infectados con Hongo y de machos Control (Tween).

| Compuesto | No. Carbonos | Valor de t | Significancia (p) |
|---------------------|-----------------------|------------|-------------------|
| Octadecano | C ₁₈ | -0.99 | 0.33 |
| Estearato de metilo | --- | -0.99 | 0.33 |
| 9-Tricosano (z) | 9-C ₂₃ (z) | 0.27 | 0.78 |
| Tricosano | C ₂₃ | 0.66 | 0.51 |
| 11-Metil Tricosano | 11-me C ₂₃ | 0.99 | 0.33 |
| Tetracosano | C ₂₄ | -1.01 | 0.31 |
| 1-Pentacoseno | 1-C ₂₅ | -0.84 | 0.40 |
| Pentacosano | C ₂₅ | 0.06 | 0.95 |
| 1-Hexacoseno | 1- C ₂₆ | -1.10 | 0.28 |
| Hexacosano | C ₂₆ | 0.80 | 0.43 |
| 1-Heptacoseno | 1-C ₂₇ | 0.89 | 0.37 |
| Heptacosano | C ₂₇ | 0.24 | 0.80 |
| 1-Octacoseno | 1-C ₂₈ | 0.82 | 0.41 |
| Octacosano | C ₂₈ | -0.30 | 0.76 |
| 1-Nonacoseno | 1-C ₂₉ | 0.38 | 0.70 |
| 1-Triaconteno | 1-C ₃₀ | -1.42 | 0.17 |
| Triacontano | C ₃₀ | 0.99 | 0.33 |
| Dos-Hentriaconteno | 2-C ₃₁ | -0.25 | 0.79 |
| Hentriacontano | C ₃₁ | 0.06 | 0.95 |

Los hijos de machos infectados con Hongo tuvieron mayor concentración de Nonacosano (4.33 ± 0.12) en comparación con los machos Control (3.97 ± 0.12 ; $t = 2.07$, $p < 0.04$; $n = 30$; Figura 21).

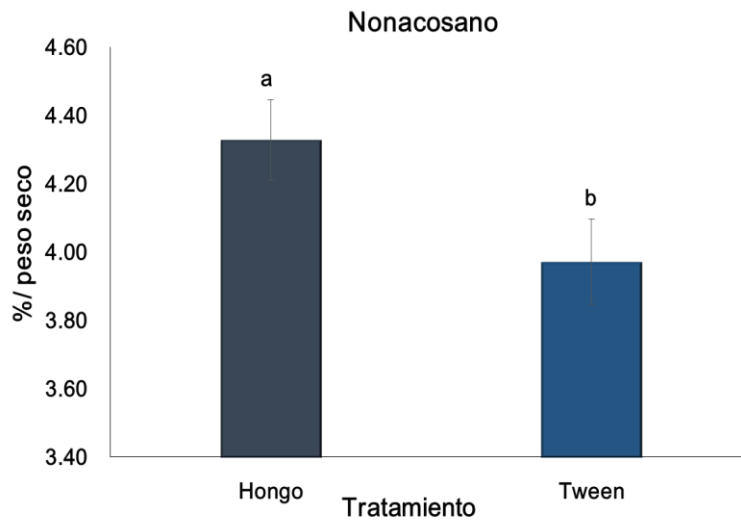


Figura 21. Los hijos de machos infectados con Hongo tuvieron mayor concentración de %/peso seco (eje “X”) de Nonacosano (C_{29}) que los machos Control (eje “Y”).

3. Elección de pareja con respecto al Herbicida (Paraquat)

Las hembras eligieron a los machos inoculados con Paraquat ya que pasaron mayor tiempo con ellos (252.0 ± 30.16 s), en comparación de los machos Control (130.7 ± 26.99 s; $t = -3.00$, $p < 0.004$; $n = 30$; Figura 22).

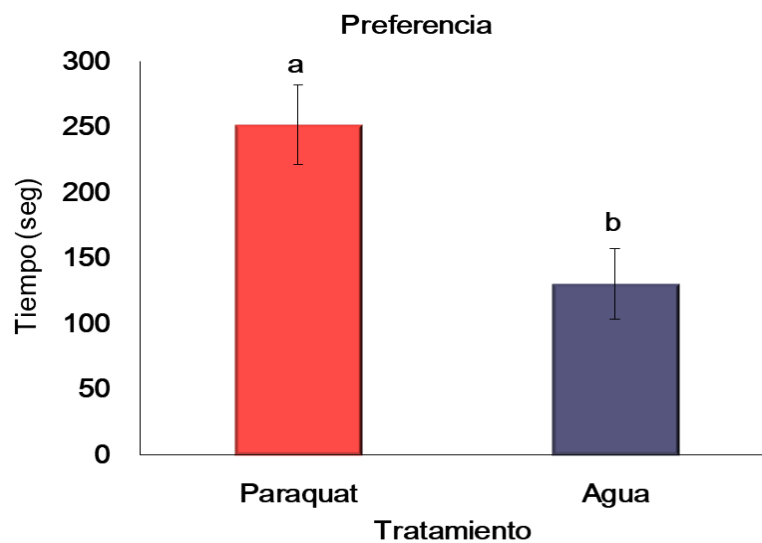


Figura 22. Las hembras pasaron mayor tiempo con los machos inoculados con Paraquat que con los machos control (Agua).

3.1. HC respecto a la inoculación con Herbicida (Paraquat) en machos

El análisis de componentes principales mostró que únicamente el primer componente fue válidos con un valor mayor a 1 (ACP1 = 1.04), explicando casi el 30% de variación.

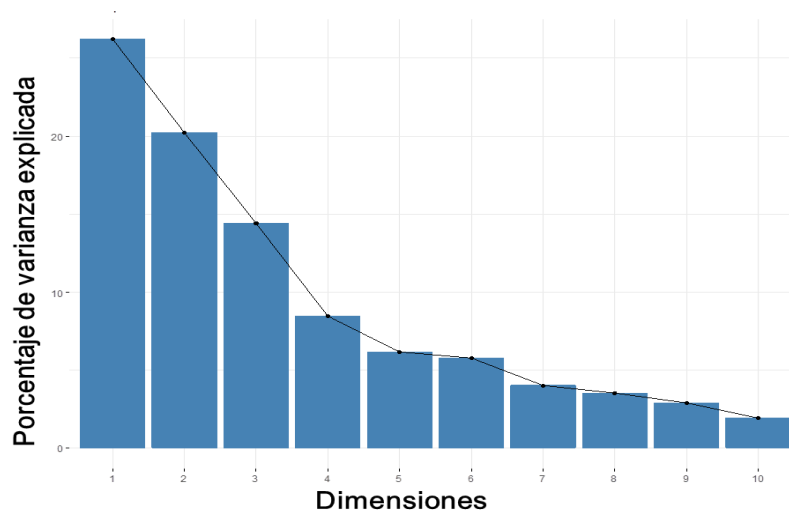


Figura 23. El primer componente principal representa las mayores variaciones en la concentración de los HC.

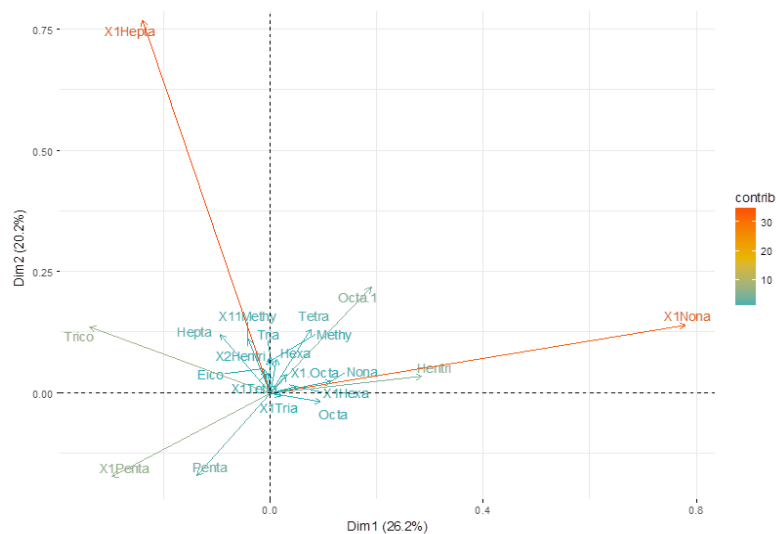


Figura 24. Tricosano, 1-Pentacoseno, 1-Heptacoseno, 1-Nonacoseno y Hentriacontano son los compuestos que contribuyen más al CP1, relacionándose los primeros tres negativamente y los dos últimos dos positivamente con el componente.

Tabla 9. Lista de compuestos que contribuyen en mayor porcentaje al CP1.

| Compuesto | ACP1 |
|---------------------|-------------|
| Octadecano | 0.09 |
| Eicosano | -0.014 |
| Estearato de Metilo | -0.0002 |
| Tricosano | -0.34 |
| 11-Metil Tricosano | -0.04 |
| 1-Tetracoseno | -0.006 |
| Tetracosano | 0.08 |
| 1-Pentacoseno | -0.30 |
| Pentacosano | -0.14 |
| 1-Hexacoseno | 0.05 |
| Hexacosano | 0.01 |
| 1-Heptacoseno | -0.24 |
| Heptacosano | -0.09 |
| 1-Octacoseno | 0.03 |
| Octacosano | 0.19 |
| 1-Nonacoseno | 0.78 |
| Nonacosano | 0.11 |
| 1-Triaconteno | 0.02 |
| Triacontano | -0.001 |
| 2-Hentriaconteno | -0.002 |
| Hentriacontano | 0.28 |

El componente principal 1 (CP1) fue el único que mostró diferencias significativas entre grupos, ya que los machos Control aumentaron el valor de los compuestos químicos (HC) (0.34 ± 0.25) en comparación de los machos tratados con Paraquat (-0.34 ± 0.25 , $X^2 = 3.74$, $p < 0.04$).

Se encontraron 21 HC pero solamente uno mostró diferencias significativas entre grupos. Los compuestos que no mostraron diferencias significativas se muestran en la Tabla 8.

Tabla 10. Lista de compuestos no significativos respecto a machos inoculados con Herbicida y de machos Control (Agua).

| Compuesto | No. Carbonos | Valor de t | Significancia (p) |
|---------------------|-----------------------|------------|-------------------|
| Octadecano | C ₁₈ | 1.75 | 0.09 |
| Eicosano | C ₂₀ | -1.20 | 0.21 |
| Estearato de metilo | --- | -0.76 | 0.45 |
| Tricosano | C ₂₃ | 0.66 | 0.51 |
| 11-Metil Tricosano | 11-me C ₂₃ | 0.99 | 0.33 |
| 1-Tetracoseno | 1-C ₂₄ | 1.38 | 0.18 |
| Tetracosano | C ₂₃ | -0.82 | 0.41 |
| Pentacosano | C ₂₅ | 1.20 | 0.23 |
| 1-Hexacoseno | 1-C ₂₆ | -1.27 | 0.21 |
| Hexacosano | C ₂₆ | -0.66 | 0.51 |
| 1-Heptacoseno | 1-C ₂₇ | 0.30 | 0.76 |
| Heptacosano | C ₂₇ | -1.05 | 0.30 |
| 1-Octacoseno | 1-C ₂₈ | -0.99 | 0.33 |
| Octacosano | C ₂₈ | 0.44 | 0.66 |
| 1-Nonacoseno | 1-C ₂₉ | -1.78 | 0.08 |
| Nonacosano | C ₂₉ | -0.88 | 0.38 |
| 1-Triaconteno | 1-C ₃₀ | -0.99 | 0.33 |
| Triacontano | C ₃₀ | 0.69 | 0.49 |
| Dos-Hentriaconteno | 2-C ₃₁ | 0.60 | 0.55 |
| Hentriacontano | C ₃₁ | -0.13 | 0.89 |

El 1-Pentacoseno (4.31 ± 0.09) de los machos tratados con Paraquat fue el único compuesto que presentó diferencias significativas con respecto a los machos Control (3.75 ± 0.13 ; $t = 3.58$, $p < 0.001$; $n = 30$; Figura 25) y cabe recordar que también fue el compuesto con mayor cantidad en los machos Pareja, lo que denota su importancia en la elección de pareja.

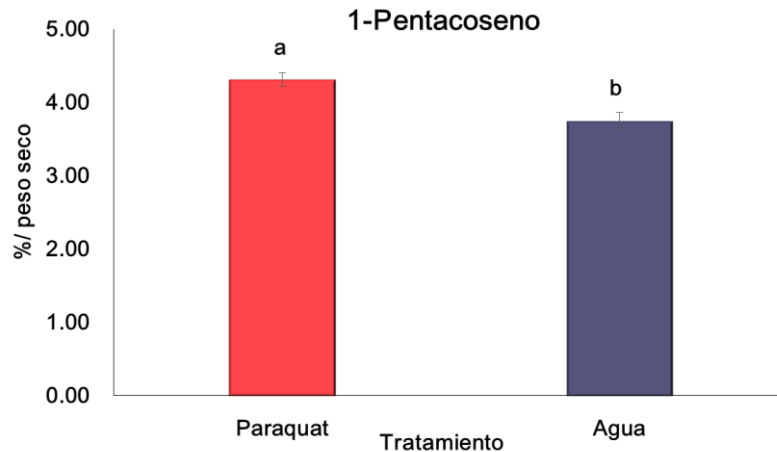


Figura 25. Los machos inoculados con el herbicida (Paraquat) tuvieron mayor concentración de %/peso seco (eje “X”) de 1- Pentacoseno (1-C₂₅) en comparación con los machos Control (Agua; eje “Y”).

3.1.2 Cantidad de larvas respecto al Herbicida (Paraquat)

No hubo diferencias significativas en el número de larvas que depositaron las hembras que copularon con machos inoculados con Paraquat (43.33 ± 4.21) en comparación con las que copularon con los machos Control (Agua) (32.40 ± 4.25 ; $t = 1.65$, $p < 0.12$, $n = 30$).

3.1.3 HC de hijos provenientes de machos inoculados con Herbicida (Paraquat)

El análisis de componentes principales mostró que únicamente el primer componente fue válidos con un valor mayor a 1 (ACP1 = 1.19), explicando casi el 30% de la variación.

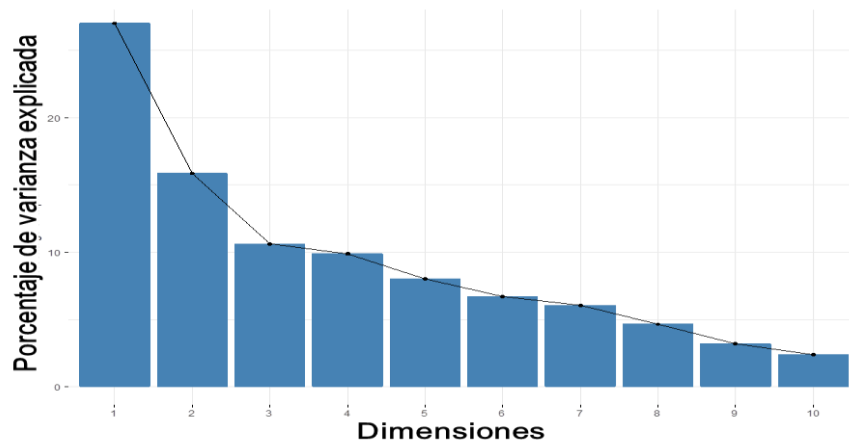


Figura 26. El primer componente principal explica el 30 % de la variación.

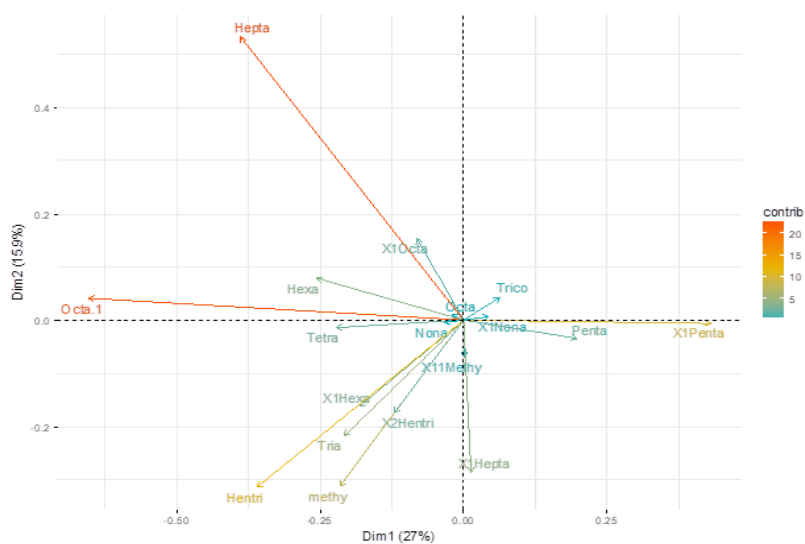


Figura 27. 1-Pentacoseno, Heptacosano, Octacosano y Hentriacontano son los compuestos que contribuyen más al CP1, relacionándose el primero positivamente y los tres últimos negativamente con el componente.

Tabla 11. Lista de compuestos que contribuyen en mayor porcentaje al CP1.

| Compuesto | ACP1 |
|---------------------|-------|
| Octadecano | -0.02 |
| Estearato de Metilo | -0.21 |
| Tricosano | 0.06 |
| 11-Methyl Tricosano | 0.002 |
| Tetracosano | -0.22 |
| 1-Pentacoseno | 0.43 |
| Pentacosano | 0.20 |
| 1-Hexacoseno | -0.18 |
| Hexacosano | -0.26 |
| 1-Heptacoseno | 0.01 |
| Heptacosano | -0.39 |
| 1-Octacoseno | -0.08 |
| Octacosano | -0.65 |
| 1-Nonacoseno | 0.04 |
| Nonacosano | -0.03 |
| Triacantano | -0.21 |
| 2-Hentriaconteno | -0.12 |
| Hentriacontano | -0.36 |

El componente principal 1 (CP1) no mostró diferencias significativas entre los grupos, ya que los hijos de machos tratados con Paraquat (-0.06 ± 0.28) presentaron valores similares de concentración de HC a los de machos Control (0.06 ± 0.28 , $X^2 = 0.10$, $p < 0.75$).

Se encontraron 18 HC pero solamente 3 mostraron diferencias significativas entre grupos. Los compuestos que no mostraron diferencias significativas se muestran en la Tabla 10.

Tabla 12. Lista de compuestos no significativos respecto a machos inoculados con Herbicida y de machos Control (Agua).

| Compuesto | No. Carbonos | Valor de t | Significancia (p) |
|---------------------|-----------------------|------------|-------------------|
| Octadecano | C ₁₈ | -0.99 | 0.33 |
| Estearato de metilo | --- | 0.99 | 0.33 |
| Tricosano | C ₂₃ | 0.08 | 0.93 |
| 11-Metil Tricosano | 11-me C ₂₃ | 0.61 | 0.54 |
| Tetracosano | C ₂₄ | -0.71 | 0.48 |
| 1-Pentacoseno | 1-C ₂₅ | 0.96 | 0.34 |
| Pentacosano | C ₂₅ | -0.32 | 0.74 |
| Hexacosano | C ₂₆ | 0.25 | 0.80 |
| 1-Heptacoseno | 1-C ₂₇ | -1.44 | 0.16 |
| Heptacosano | C ₂₇ | -0.54 | 0.58 |
| 1-Octacoseno | 1-C ₂₈ | 0.67 | 0.51 |
| Octacosano | C ₂₈ | 0.87 | 0.39 |
| Triacotano | C ₃₀ | 1.14 | 0.26 |
| Dos-Hentriaconteno | 2-C ₃₁ | 0.35 | 0.72 |
| Hentriacontano | C ₃₁ | -0.05 | 0.95 |

Los compuestos significativos fueron separados en 2 grupos. En el primer grupo, los hijos de machos inoculados con Paraquat tuvieron mayor concentración de 1-Hexacoseno (1.23 ± 0.11) y 1-Nonacosano (1.29 ± 0.13) en comparación con los machos Control (1.00 ± 0.0001 , 1.00 ± 0.0001 ; $t = 2.07$, $p = < 0.05$ y $t = 2.23$, $p = < 0.04$, respectivamente; $n = 30$; Figura 28).

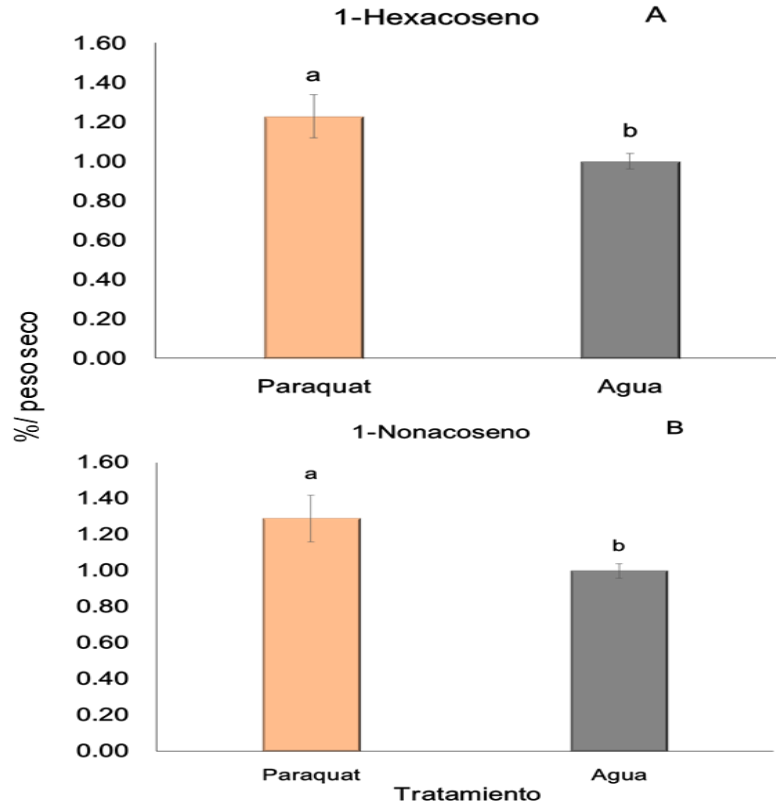


Figura 28. Los hijos de machos inoculados con Paraquat tuvieron mayor concentración de %/peso seco (eje “X”) de 1- Hexacoseno (1-C₂₆) y 1- Nonacoseno (1-C₂₉) que los machos Control (eje “Y”).

Por último, en el segundo grupo los machos Control tuvieron mayor concentración de Nonacosano (4.35 ± 0.12) en comparación con el grupo de hijos de machos Paraquat (4.05 ± 0.06 ; $t = -2.26$, $p = < 0.03$; $n = 30$; Figura 29).

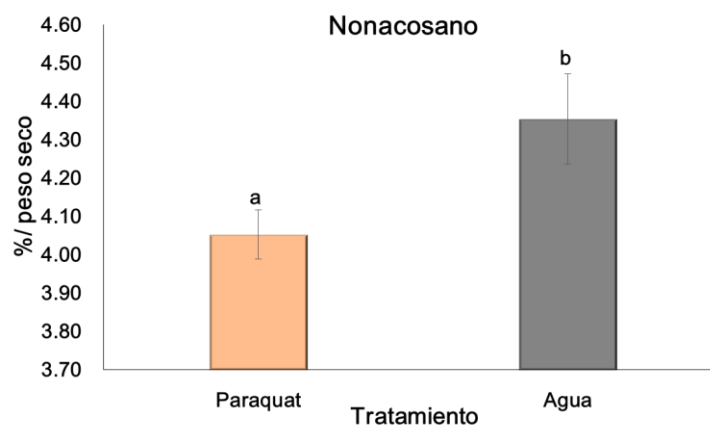


Figura 29. Los machos Control tuvieron mayor concentración de %/peso seco (eje “X”) de Nonacosano (C₂₉) en comparación de los hijos de machos inoculados con Paraquat (eje “Y”).

Tabla 13. Lista de compuestos encontrados en *T. molitor* con su número de pico e Índices Kovats Experimental e Índice Kovats Teórico.

| Pico | Compuesto | No. Carbonos | Índice Kovats Experimental | Índice Kovats Teórico |
|-------------|---------------------|-----------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| 1 | Octadecano | C ₁₈ | 1801 | 1800 |
| 2 | Eicosano | C ₂₀ | 2001 | 2000 |
| 3 | Heneicosano | C ₂₁ | 2101 | 2100 |
| 4 | Estearato de metilo | ... | 2127 | 2128 |
| 5 | 9-Tricosano (z) | 9-C ₂₃ (z) | 2242 | |
| 6 | Tricosano | C ₂₃ | 2305 | 2300 |
| 7 | 11-Methyl Tricosano | 11-me C ₂₃ | 2340 | 2338 |
| 8 | 1-Tetracosano | 1-C ₂₄ | 2392 | 2394 |
| 9 | Tetracosano | C ₂₄ | 2419 | 2400 |
| 10 | 1-Pentacosano | 1-C ₂₅ | 2482 | 2484 |
| 11 | Pentacosano | C ₂₅ | 2505 | 2500 |
| 12 | 1-Hexacosano | 1-C ₂₆ | 2578 | 2596 |
| 13 | Hexacosano | C ₂₆ | 2618 | 2600 |
| 14 | 1-Heptacosano | 1-C ₂₇ | 2683 | 2694 |
| 15 | Heptacosano | C ₂₇ | 2706 | 2700 |
| 16 | 1-Octacosano | 1-C ₂₈ | 2776 | 2797 |
| 17 | Octacosano | C ₂₈ | 2806 | 2800 |
| 18 | 1-Nonacosano | 1-C ₂₉ | 2865 | 2885 |
| 19 | Nonacosano | C ₂₉ | 2905 | 2900 |
| 20 | 1-Triacontano | 1-C ₃₀ | 2995 | 2998 |
| 21 | Triacontano | C ₃₀ | 3027 | 3000 |
| 22 | Dos-Hentriacontano | 2-C ₃₁ | 3092 | --- |
| 23 | Hentriacontano | C ₃₁ | 3100 | 3100 |

Tabla 14. Compuestos químicos encontrados en *T. molitor*. La tabla muestra la función sugerida de estos compuestos en otras especies de insectos.

| Experimento | Generación | Compuesto | Función | Referencia |
|--|--|---------------------------------------|--|---|
| Elección de pareja | Machos atractivos (Pareja) | Octadecano (C ₁₈) | Compuesto principal de feromonas sexuales. | Minaeimoghadam <i>et al.</i> , (2017). |
| Elección de pareja | Machos atractivos (Pareja) | Heneicosano (C ₂₁) | Reconocimiento en individuos sociales. | Funaro <i>et al.</i> , (2018). |
| Infeción con Hongo | Machos infectados | Tetracosano (C ₂₄) | Atracción de parasitoides y mimetismo químico en un primer encuentro entre parásito y su hospedero. | Rani <i>et al.</i> , (2007). |
| Elección de pareja Herbicida | Machos atractivos (Pareja) Hijos de machos Pareja Machos inoculados con Paraquat | 1-Pentacosano (1-C ₂₅) | Agresión entre machos para acceder a la cópula. | De la Paz Fernández <i>et al.</i> , (2010). |
| Elección de Pareja | Machos Nuevos | Pentacosano (C ₂₅) | Parasitismo en huevos del hospederos. Atrayente de parásitos en hospederos adultos. | Rani <i>et al.</i> , (2007). |
| Herbicida | Hijos de machos inoculados con Paraquat | 1-Hexacosano (1-C ₂₆) | Reconocimiento entre individuos y el rol de cada uno. | Poiani <i>et al.</i> , (2014). |
| Elección de Pareja | Machos Control | 1-Heptacosano (1-C ₂₇) | Estado reproductivo de insectos. | Wittwer <i>et al.</i> , (2017). |
| Elección de Pareja | Machos Control | Heptacosano (C ₂₇) | Feromona masculina. | Zito <i>et al.</i> , (2010). |
| Elección de Pareja | Machos Control | 1-Octacosano (1-C ₂₈) | Posiblemente es feromona masculina. | ----- |
| Elección de Pareja | Machos Control | Octacosano (C ₂₈) | Reconocimiento de compañeros en insectos eusociales. | Poiani, <i>et al.</i> , (2014). |
| Herbicida | Hijos de machos inoculados con Paraquat | 1-Nonacosano (1-C ₂₉) | No se encontró función pero el 9-Nonacosano permite el reconocimiento entre individuos de una población. | Funaro <i>et al.</i> , (2018). |
| Elección de Pareja Infeción con Hongo | Machos Control Hijos de machos infectados con Hongo | Nonacosano (C ₂₉) | Evita la desecación en artrópodos. | Gefen <i>et al.</i> , (2015). |
| Herbicida | Machos Control (Agua) | | | |

Tabla 15. Compuestos diferenciales en machos apareados y machos vírgenes.

| HC de Machos Apareados | HC de machos Vírgenes (Control) | HC que comparten Machos Control y machos apareados. |
|-------------------------------|--|--|
| Octadecano | 1-Heptacoseno | Nonacosano |
| Heneicosano | Heptacosano | |
| Tetracosano | 1-Octacoseno | |
| 1-Pentacosano | Octacosano | |
| Pentacosano | Nonacosano | |

DISCUSIÓN

Los resultados muestran la compleja interacción química en la comunicación de *T. molitor* con respecto a la elección de pareja. En primer lugar, se encontró que el contacto con la hembra y los machos competidores induce cambios en los HC de los machos: disminuyen la producción de HC de cadena media que protegen de la desecación, y aumentan los de cadena larga que se relacionan con la atracción de pareja y la competencia entre machos. Además, se observa que los machos atractivos generan HC diferenciales respecto a los machos rechazados, sin que al parecer afecte a la progenie. El reto inmune que se probó no afectó la elección de pareja, aunque sí generó cambios en los HC en la misma generación pero no en su descendencia. Por último, con el herbicida los machos probablemente realizaron inversión terminal (IT) y simulaban su olor con el de machos atractivos; es decir que los individuos al percibir su supervivencia comprometida por el daño que les generó el herbicida invirtieron en la reproducción a costa de la supervivencia (Krams *et al.*, 2011). Finalmente, estos cambios en HC no generaron diferencias a largo plazo en la progenie.

Se corroboró que las hembras de *T. molitor* prefieren copular con su pareja y que esta preferencia se mantiene con el tiempo, es decir que las hembras prefieren copular con el macho con el que copularon la primera vez en comparación de un macho Nuevo (Cordero 2014, 2017). Esto es relevante debido a que anteriormente se probó que las hembras a los 5 días de haber copulado con un macho lo volvían a elegir en un segundo encuentro debido a que los machos mantenían un nivel alto de feromonas. Por lo tanto, memorizar a la pareja es una estrategia femenina que permite evaluar y comparar el nivel de feromonas de los machos en un segundo encuentro y así evitar la cópula con posibles machos deshonestos, es decir aquellos que pudieran realizar Inversión Terminal (Cordero, 2017). Sin embargo, existe la posibilidad de que la memorización de la condición del macho del primer encuentro (Pareja) persista en el cerebro de la hembra y aunque esta condición no sea la óptima, este arresto fisiológico de memoria en las hembras no les permitiría elegir a machos nuevos que pudieran tener una mejor condición en un segundo encuentro (Flatt y Heyland, 2011 y Cordero, 2017). La otra posibilidad era que la diferencia en olores mediados por HC entre estos machos fuera tan sutil que las hembras no detectaran las

diferencias, y esto parece tener sustento porque los análisis de componentes principales no revelaron diferencias significativas entre machos Pareja y Nuevos con respecto a la modulación de HC ni su tipo de combinación. Por lo tanto, se debe estudiar con más detalle porque algunas hembras parecen preferir a los machos Nuevos y otros a sus Parejas. Además se encontró que las hembras prefirieron a su Pareja 8 días después del primer encuentro. La importancia y novedad de este resultado es que en el segundo encuentro los machos no poseían niveles experimentalmente elevados de feromona y aun así, las hembras siguieron prefiriendo a su Pareja, lo que sugiere que la memoria de pareja en estos trabajos no es un efecto derivado de la manipulación experimental, sino que también ocurre de manera natural con los niveles basales de feromonas de los machos.

En cuanto a la cantidad de larvas depositadas por las hembras (es decir su adecuación) apareadas con machos Pareja o Nuevos, así como la elección de pareja de los hijos, no se encontraron diferencias significativas. Dado que controlamos el trasfondo genético de los machos porque eran hermanos, la manipulación experimental sugiere que **(a)** la elección de pareja que realiza la madre no es heredable a la hija. Por lo tanto, tal vez a lo largo de las generaciones se selecciona la plasticidad de elegir pareja dependiendo del contexto en el que se encuentran las hembras (Andersson, 1994); además, **(b)** no existe una compensación reproductiva femenina en la progenie respecto a la calidad de los machos de *T. molitor*, ya que la cantidad de larvas no difirió entre hembras que copularon con el macho Pareja o con el macho Nuevo. Esto difiere con lo encontrado por Saino y Moller (1995) teniendo como modelo de estudio a la golondrina (*Hirundo rustica*), ya que las hembras cuidan más a la progenie cuando se aparean con machos con altos niveles de testosterona (andrógeno involucrado en el comportamiento sexual y parental de las aves) en comparación con machos Control, siendo la tasa de alimentación al nido la variable principal que se relaciona con el cuidado parental. Esta inversión diferencial podría deberse a que los machos con altos niveles de testosterona invierten menos en la alimentación de las crías en comparación con machos Control (Saino y Moller, 1995). Hunt y Simmons (2002) realizaron un análisis conductual en el escarabajo pelotero *Onthophagus taurus* con el objetivo de determinar si alguno de los sexos invertía más recursos en la crianza de los hijos. Se analizaron conductas de provisión, recolecta, transporte y eliminación de estiércol, así como la cantidad de crías

y el peso de cada una. Las hembras apareadas con machos no cooperativos pasaron mayor tiempo cuidando a la progenie en comparación de las hembras apareadas con machos cooperadores. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en la cantidad de masa de las crías y su peso (Hunt y Simmons, 2002). Dado que tenebrio no provee recursos a sus crías, es posible que esto explique porque las hembras no invierten más recursos en la producción de hijos. Sin embargo, sería interesante saber si el peso o tamaño de los hijos es diferencial y por lo tanto invierte más en algunos, igual que ocurre en otras especies (Firman *et al.*, 2017).

En cuanto a la elección de pareja de machos retados inmunitariamente con el hongo entomopatógeno no se obtuvieron diferencias significativas con respecto al grupo Control (Tween), y esto difiere con el trabajo de Nielsen y Holman (2012) porque las hembras de *T. molitor* prefirieron a los machos retados con lipopolisacáridos (sustancia no patógena derivada de bacterias Gram-negativas) en comparación con los machos sanos. Lo que podría deberse a que los machos realizaron Inversión Terminal (Inversión de recursos para la reproducción a costa de la supervivencia) y produjeron sustancias volátiles (olores) de corto o mediano alcance que fueron rápidamente percibidas por las hembras como señales atractivas (Nielsen y Holman, 2012). No obstante, en esta tesis, una posible causa por la que no se obtuvieron diferencias en la elección de pareja entre machos infectados con Hongo y machos Control podría ser porque las hembras basan su preferencia con respecto a un umbral de elección (caja 3), y tal vez dependiendo de la cantidad y/o presencia de los Hidrocarburos Cuticulares de los machos, se activen señales en el cerebro de las hembras y ocurra una respuesta de tipo umbral. Esto sugiere que los machos deben estimular óptimamente el cerebro de la hembra para que elija copular con el de mejor condición (Bloch *et al.*, 2018). Con relación a esto, Moore y Moore (1988) observaron que las hembras de diversas especies utilizaron distintas estrategias de evaluación en la elección de pareja, basándose en los recursos que los machos les ofrecían o en su condición. En este caso las hembras realizaron una comparación (umbral de elección) de cada uno de los machos eligiendo al individuo que excediera el umbral de aceptación. En otro estudio realizado por Moore en 1990, se observa que en la cucaracha *Nauphoeta cinerea* el atractivo de los machos está relacionado con el umbral de aceptación de las hembras ya que

ellas evalúan las conductas asociadas con el aumento del atractivo. Por tanto, los machos con mayor cantidad de feromonas (superan el umbral de elección) fueron elegidos y aquellos con menor cantidad fueron rechazados. Comparando el presente trabajo con los ejemplos anteriores, lo más probable es que los machos infectados con Hongo sí realizaron IT pero no fue suficiente para incrementar su atractivo respecto a los machos Control, sino que solamente igualaron su atractivo. Sería importante realizar experimentos en donde se administren diferentes dosis de conidias a los machos y así conocer en qué punto se estimula el umbral de elección femenina, ya que posiblemente un reto inmunitario con 200 conidias fue demasiado y los machos no alcanzaron a recuperarse rápidamente para ser más atractivos que los machos sanos. Sería imprescindible medir la supervivencia de los machos a partir de la dosis suministrada y observar los efectos de las dosis sobre la elección de pareja de las hembras, así como la posibilidad de que los machos pudieran compensar su condición (aumentar nivel de feromonas o HC) en función del tratamiento que reciban durante el experimento. Esto podría tener sustento porque en *T. molitor* la estrategia de IT se basa en una compensación entre gasto metabólico y producción de feromonas que impacta sobre el éxito reproductivo de los machos (Krams *et al.*, 2011), y depende de la disponibilidad de alimento y de la condición en la que se encuentre el macho (Krams *et al.*, 2015). Por lo tanto, debido a que los individuos de *T. molitor* pueden reproducirse varias veces al día, incluso pueden copular cuatro veces al día con la misma pareja (Worden & Parker, 2001), los machos invierten en reproducción a expensas de su supervivencia, aumentando la señal atractiva (olor) por lo que podrían reproducirse rápidamente en lugar de reproducirse en el futuro (Krams *et al.*, 2015). Sin duda un experimento de dosis-respuesta permitirá buscar en qué punto de la infección los machos son más o menos atractivos para las hembras, y al mismo tiempo saber cómo modulan los machos sus HC para atraer a las hembras.

Caja 2. Definición de Umbral de Elección

Umbral de Elección: Estrategia donde los “individuos con valores de rasgo mayores al umbral de aceptación (propiedad fija definida internamente del selector) son preferentemente elegidos en la cópula, mientras que los individuos con valores inferiores al umbral de aceptación son mayormente rechazados (Edward, 2014).

Por otro lado, la elección de pareja con respecto al grupo de machos que enfrentaron Paraquat (40mM) fue más preferido que el grupo Control. Es posible suponer que los machos oxidados realizaron Inversión terminal (IT), es decir que al tener su supervivencia comprometida invirtieron en generar CSS más llamativos (Hidrocarburos Cuticulares) y atraer a la hembra (Nielsen y Holman, 2012). La IT es catalogada por diversos autores como una señal deshonesto debido a que los machos emiten señales engañosas a las hembras (Nielsen y Holman, 2012) y esto podría depender de la condición del macho (Krams *et al.*, 2015). Es importante mencionar que se tienen datos (no publicados) de elección de pareja con distintas dosis de Paraquat en los machos y se observó que con dosis bajas como 5 y 20 mM las hembras prefieren a los machos Control, con 30mM no hubo diferencias con el Control, con 40 mM las hembras prefieren a los machos tratados con Paraquat sobre los del tratamiento Control y con 80 mM las hembras vuelven a preferir a los machos Control. Esto sugiere que los machos realizan IT con la concentración de 40 mM de Paraquat y también que existe un umbral de elección femenina que está determinada por el grado de daño que sufren los machos. Por lo tanto, el experimento de dosis respuesta con la infección que planteamos anteriormente ayudará a saber cómo modulan la señal química los machos en función de su riesgo de morir no solamente ante el estrés oxidante que enfrentan los machos, sino también ante la infección.

En cuanto a los Hidrocarburos Cuticulares (HC), son compuestos orgánicos lineales, que se presentan como monoalquenos, mono y dimetilalcanos generalmente, están presentes en la cutícula de la mayoría de los artrópodos terrestres (Calderón, 2009) y su función principal es la protección de desecación y atracción de pareja (Chung y Carroll, 2015; Menzel *et al.*, 2017). En este trabajo no se corroboró la función de los HC de *T. molitor*, pero en otras especies de insectos el 83.3% permiten la comunicación y reconocimiento químico entre individuos y el 16.7% se relacionaron con la atracción de parasitoides (ver tabla 12) y posiblemente en *T. molitor* los HC cumplen con funciones similares aunque sí se debería demostrar experimentalmente. Además, es importante mencionar que de los 12 HC que mostraron diferencias significativas entre grupos, el 58% corresponden a alcanos y el 42% fueron alquenos de cadena larga. Según Michelutti *et al.* (2017), los alcanos lineales impiden la desecación de insectos, mientras que los alquenos y algunos alcanos ramificados

se relacionan mayormente con la comunicación química. En la abeja *Apis mellifera* los alquenos eran más importantes en la comunicación química que los alcanos (Kather *et al.*, 2014) y en *Drosophila suzukii*, los alquenos estuvieron involucrados en la comunicación química entre individuos, además de que la edad y experiencia previa en cópula cambiaba el perfil cuticular de los machos (Snellings *et al.*, 2018). En este sentido, es importante controlar estas variables al momento de realizar análisis de HC en insectos y así evitar sesgos al momento de obtener los perfiles cuticulares. Por ejemplo, en la polilla *Lobesia botrana* las hembras prefieren copular con un macho virgen en comparación con un macho con experiencia previa en cópula, por lo que se ha propuesto que este reconocimiento se basaba en el perfil cuticular de los machos (Muller *et al.*, 2016). Por esto en el presente trabajo se controló la edad y experiencia en cópula y se decidió incluir un grupo de machos sin experiencia para saber cómo cambiaba la composición de HC con respecto al apareamiento. Los insectos vírgenes produjeron los alcanos Heptacosano (C_{27}), Octacosano (C_{28}) y Nonacosano (C_{29}) y los alquenos 1-Heptacoseno ($C_{27:1}$) y 1-Octacosano ($C_{28:1}$), mientras que los machos apareados produjeron mayor concentración de los alcanos; Octadecano (C_{18}), Heneicosano (C_{21}), Tetracosano (C_{24}) y Pentacosano (C_{25}) y el alqueno 1-Pentacoseno ($C_{25:1}$). Esto muestra que, durante la reproducción, los machos produjeron mayor concentración de compuestos de cadena media y larga, mientras que los machos vírgenes produjeron mayor concentración de compuestos de cadena larga; algo similar se encontró en un trabajo realizado por Everaerts *et al.*, 2010 en *Drosophila melanogaster* donde los machos vírgenes y apareados produjeron diferentes compuestos volátiles y en distinta concentración. Por lo tanto, es posible que los machos vírgenes inviertan en protección contra la desecación y los apareados inviertan en reproducción a expensas de la desecación. Esto sugiere que la producción de HC es costosa y está finamente regulada por los machos en función del contexto en el que se encuentran, y explicaría porque los machos de *T. molitor*, tienen más HC de cadena corta que de cadena larga en comparación con las hembras (Nielsen y Holman, 2012). Así, parece que la modulación de la producción de HC en términos de cantidad y tipo de HC depende de la salud y condición de los machos y quizás por esto evolucionó en el contexto de selección sexual. En resumen, el diagrama 1 muestra la modulación de HC en función del apareamiento.

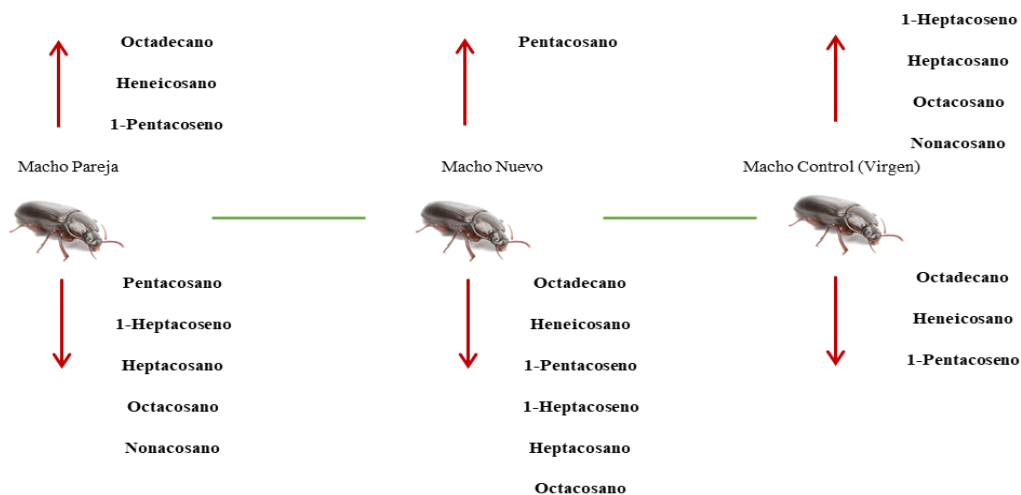


Diagrama 1. HC en la elección de pareja. El diagrama muestra los HC que aumentaron o disminuyeron con respecto al tratamiento del macho.

Por otro lado, los machos infectados con hongo tuvieron más Tetracosano (diagrama 2), y este compuesto permite que los parasitoides ubiquen al huésped (Rani *et al.*, 2007). Esto no concuerda con los HC de los machos infectados con Lipopolisacáridos porque aumentaron su atractivo produciendo los alcanos 11-Methil Tricosano y Nonacosano y el alqueno 1-Pentacoseno (Nielsen y Holman, 2012). Por lo tanto, es posible que el tipo de reto modifique el perfil de HC y sería muy interesante analizar esto.

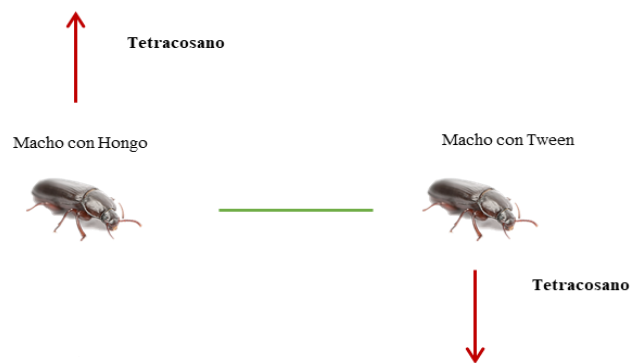


Diagrama 2. HC durante la infección. Este diagrama muestra los HC que aumentaron o disminuyeron con respecto al tratamiento del macho.

Finalmente, los machos Pareja y Paraquat aumentaron el 1-Pentacoseno (diagrama 3). Esto sugiere que los machos con Paraquat imitan la señal de los machos atractivos para atraer hembras y copular aunque el costo sea la muerte de los individuos oxidados. Esta hipótesis deberá probarse evaluando la supervivencia y el perfil cuticular de machos tratados con distintas concentraciones de herbicida.

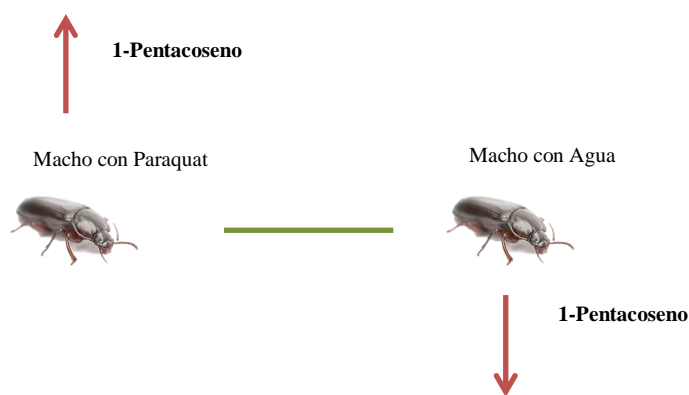


Diagrama 3. HC de machos inoculados Paraquat. Este diagrama muestra los HC que aumentaron↑ o disminuyeron↓ con respecto al tratamiento del macho.

Por último, el perfil cuticular de los hijos de los distintos tratamientos difirió con el de sus padres. Únicamente los hijos de machos Pareja mostraron mayor concentración de 1-Pentacoseno en comparación de los hijos de machos Nuevos. En los hijos de machos tratados con el Herbicida y con el Hongo no se encontraron diferencias en los mismos compuestos pero es importante resaltar que tampoco hubo diferencias significativas en la preferencia. Por lo tanto, es posible que el 1-Pentacoseno sea la molécula clave en la comunicación química de *T. molitor* y sea la más importante en elección de pareja.

Esta tesis sugiere que los HC son importantes en la elección de pareja de *T. molitor*, ya que el perfil cuticular cambió dependiendo de la condición del macho. Con base en los resultados, se propone que las prácticas agrícolas fitosanitarias generan daño colateral en insectos en términos de elección de pareja, y hasta donde sabemos sólo existía un estudio de esto en vertebrados (Arellano-Aguilar y Macías-García, 2008). Aunque pareciera que el

herbicida favorece a los machos haciéndolos más atractivos, lo que probablemente sucede es que los machos están realizando Inversión Terminal (IT), imitando el olor de los machos atractivos atrayendo parejas, aunque mueran posteriormente. El mayor problema de esto es que el Paraquat genera mutaciones heredables y su transmisión podría favorecerse por la elección de pareja en especies que realizan IT. Aunque el Paraquat está prohibido, aún se sigue utilizando en los cultivos y probablemente siga generando daño en otras especies animales y vegetales que no son Blanco de la optimización agrícola. En este trabajo se usó Paraquat y *M. anisopliae* porque se sabe a qué nivel causan daño a los organismos y porque afectan la elaboración de CSS de los machos (Ahtiainen *et al.*, 2006; Martínez-Lendeck *et al.*, 2018). Sin embargo, en este trabajo no se evaluaron otros herbicidas o agentes de control biológico, pero sería interesante saber qué efecto tienen en la selección sexual de organismos que no son Blanco de la optimización agrícola. Finalmente, es importante recalcar que faltan estudios que determinen si el uso de agroquímicos o de agentes de control biológico afectan la elección de pareja (principalmente invertebrados) y si esto interfiere en la adecuación de los organismos en las poblaciones naturales.

REFERENCIAS

Abdollahi, M., Ranjbar, R., Shadnia, S., Nikfar, S., & Rezaie, A. (2004). Pesticides and oxidative stress: A review. *Medical Science Monitor*, 10, 141-147.

Adams, R. P. (2007). Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, Allured Publishing Corporation, Carol Stream.

Ahtiainen, J. J., Alatalo, R. V., Kortet, R., & Rantala, M. J. (2006). Immune function, dominance and mating success in drumming male wolf spiders *Hygrolycosa rubrofasciata*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 60, 826.

Andersson, M. B. (1994). *Sexual selection*. Princeton University Press

Arellano-Aguilar, O., & Macías-García, C. (2008). Exposure to pesticides impairs the expression of fish ornaments reducing the availability of attractive males. *Proceedings of the Royal Society B*, 275, 1343-1351.

Augustyniak, M., Kędzierski, A., Łaszczyca, P., Sawczyn, T., Tarnawska, M., & Zawisza-Raszka, A. (2015). DNA damage in grasshopper *Chorthippus brunneus* (Orthoptera) hatchlings following paraquat exposure. *Chemosphere*, 125, 212-219.

Bhattacharya, A. K., Ameel, J. J., & Waldbauer, G. P. (1970). A method for sexing living pupal and adult yellow mealworms. *Annals of the Entomological Society of America*, 63, 1783-1783.

Bloch, N. I., Corral-López, A., Buechel, S. D., Kotrschal, A., Kolm, N., & Mank, J. E. (2018). Early neurogenomic response associated with variation in guppy female mate preference. *Nature Ecology & Evolution*, 2, 1772-1781.

Bus, J. S., & Gibson, J. E. (1984). Paraquat: Model for oxidant-initiated toxicity. *Environmental Health Perspectives*, 55, 37-46.

Calderón Fernández, G. (2009). Hidrocarburos cuticulares de triatominos: su aplicación como marcadores taxonómicos (Tesis Doctoral). Facultad de Ciencias Naturales y Museo.

Carazo, P., Sanchez, E., Font, E., & Desfilis, E. (2004). Chemosensory cues allow male *Tenebrio molitor* beetles to assess the reproductive status of potential mates. *Animal Behaviour*, 68, 123-129.

Castro-Vargas, C., Linares-López, C., López-Torres, A., Wrobel, K., Torres-Guzmán, J. C., Hernández, G. A., & Contreras-Garduño, J. (2017). Methylation on RNA: a potential mechanism related to immune priming within but not across generations. *Frontiers in Microbiology*, 8, 473.

Cole, T. J., Eggleston, P., & Hurd, H. (2003). Juvenile hormone titre and egg production in *Tenebrio molitor* infected by *Hymenolepis diminuta*: effect of male and/or female infection, male age and mating. *Journal of Insect Physiology*, 49, 583-590.

Contreras-Garduño, J., Córdoba-Aguilar, A., Peretty, A., & Drummond, H. (2009). Selección sexual: Evolución biológica. *Revista Ciencias* 1a edición. Universidad Nacional Autónoma de México. México.

Chung, H. & Carroll, S. B. (2015). Wax, sex and the origin of species: dual roles of insect cuticular hydrocarbons in adaptation and mating. *Bioessays*, 37, 822-830.

Cordero, S. (2014). El papel de la memoria en la elección femenina (tesis de licenciatura). Universidad de Guanajuato. México.

Cordero, S. (2017). Importancia de la memoria femenina en la selección sexual de *Tenebrio molitor* (tesis de maestría). Universidad de Guanajuato. México.

de la Paz Fernández, M., Chan, Y. B., Yew, J. Y., Billeter, J. C., Dreisewerd, K., Levine, J. D., & Kravitz, E. A. (2010). Pheromonal and behavioral cues trigger male-to-female aggression in *Drosophila*. *PLoS biology*, 8.

Duarte, C. M., Alonso, S., Benito, G., Dachs, J., Montes, C., Pardo Buendía, M., & Valladares, F. (2006). Cambio Global. Impacto de la actividad humana sobre el sistema Tierra. CSIC. Consejo superior de investigaciones científicas.

Edward, D. A. (2014). The description of mate choice. *Behavioral Ecology*, 26, 301-310

Farenhorst, M., Mouatcho, J. C., Kikankie, C. K., Brooke, B. D., Hunt, R. H., Thomas, M. B., & Coetzee, M. (2009). Fungal infection counters insecticide resistance in African malaria mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 17443-17447.

Everaerts, C., Farine, J. P., Cobb, M., & Ferveur, J. F. (2010). *Drosophila* cuticular hydrocarbons revisited: mating status alters cuticular profiles. *PloS one*, 5.

Flatt, T., & A. Heyland (Editors). (2011). *Mechanisms of Life History Evolution. The Genetics and Physiology of Life History Traits and Trade-Offs*. Oxford University Press, Oxford, UK.

Firman, R. C., Gasparini, C., Manier, M. K., & Pizzari, T. (2017). Postmating female control: 20 years of cryptic female choice. *Trends in Ecology & Evolution*, 32, 368-382.

Funaro, C. F., Böröczky, K., Vargo, E. L., & Schal, C. (2018). Identification of a queen and king recognition pheromone in the subterranean termite *Reticulitermes flavipes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201721419.

García-Rodríguez, Y. M., Torres-Gurrola, G., Meléndez-González, C., & Espinosa-García, F. J. (2016). Phenotypic variations in the foliar chemical profile of *Persea americana* Mill. cv. Hass. *Chemistry & Biodiversity*, 13, 1767-1775.

Gefen, E., Talal, S., Brendzel, O., Dror, A., & Fishman, A. (2015). Variation in quantity and composition of cuticular hydrocarbons in the scorpion *Buthus occitanus* (Buthidae) in response to acute exposure to desiccation stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 182, 58-63.

Gómez-Medina, H. M., Rivas, G. A., Hernández-Quintero, A., Hernández, A. G., Guzmán, J. C. T., Mendoza, H. L., & Contreras-Garduño, J. (2018). The occurrence of immune priming can be species-specific in entomopathogens. *Microbial Pathogenesis*, 118, 361-364.

Han, C. S., & Jablonski, P. G. (2010). Male water striders attract predators to intimidate females into copulation. *Nature Communications*, 1, 52.

Hunt, J., & Simmons, L. W. (2002). Behavioural dynamics of biparental care in the dung beetle *Onthophagus taurus*. *Animal Behaviour*, 64, 65-75.

Jonsson, M., Bommarco, R., Ekbom, B., Smith, H. G., Bengtsson, J., Caballero-Lopez, B., Winqvist, C., & Olsson, O. (2014). Ecological production functions for biological control services in agricultural landscapes. *Methods in Ecology and Evolution*, 5, 243-252.

Kather, R., Drijfhout, F. P., & Martin, S. J. (2011). Task group differences in cuticular lipids in the honey bee *Apis mellifera*. *Journal of Chemical Ecology*, 37, 205-212.

Koch, R. E., & Hill, G. E. (2017). An assessment of techniques to manipulate oxidative stress in animals. *Functional Ecology*, 31, 9-21.

Krams, I., Daukšte, J., Kivleniece, I., Krama, T., Rantala, M. J., Ramey, G., & Šauša, L. (2011). Female choice reveals terminal investment in male mealworm beetles, *Tenebrio molitor*, after a repeated activation of the immune system. *Journal of Insect Science*, 11, 56.

Krams, I. A., Krama, T., Moore, F. R., Rantala, M. J., Mänd, R., Mierauskas, P., & Mänd, M. (2015). Resource availability as a proxy for terminal investment in a beetle. *Oecologia*, 178, 339-345.

Márquez-García, A., Canales-Lazcano, J., Rantala, M. J., & Contreras-Garduño, J. (2016). Is Juvenile Hormone a potential mechanism that underlay the “branched Y-model”? *General and Comparative Endocrinology*, 230, 170-176.

Martínez-Lendeck, N., Golab, M. J., Osorio-Beristain, M., & Contreras-Garduño, J. (2018). Sexual signals reveal males' oxidative stress defences: Testing this hypothesis in an invertebrate. *Functional Ecology*, 32, 937-947.

McMahon, M., Valdés, A., Cahill, C., & Jankowska, A. (2011). Análisis del extensionismo Agrícola en México. *París: Organismo para la Cooperación y el Desarrollo*, 1-73.

Menzel, F., Blaimer, B. B., & Schmitt, T. (2017). How do cuticular hydrocarbons evolve? Physiological constraints and climatic and biotic selection pressures act on a complex functional trait. *Proceedings of the Royal Society B*, 284, 20161727.

Metcalf, N. B., & Alonso-Alvarez, C. (2010). Oxidative stress as a life-history constraint: the role of reactive oxygen species in shaping phenotypes from conception to death. *Functional Ecology*, 24, 984-996.

Michelutti, K. B., Soares, E. R. P., Sguarizi-Antonio, D., Piva, R. C., Suárez, Y. R., Cardoso, C. A. L., & Antonialli-Junior, W. F. (2017). Influence of temperature on survival and cuticular chemical profile of social wasps. *Journal of Thermal Biology*, 71, 221-231.

Minaeimoghadam, M., Askarianzadeh, A., Imani, S., Shojaei, M., Larijani, K., & Abbasipour, H. (2017). Identification of chemical compounds of the pheromone in different ages of female adults of the clearwing moth, *Paranthrene diaphana* Dalla Torre & Strand. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 50, 1019-1033.

Moore, A. J., & Moore, P. J. (1988). Female strategy during mate choice: threshold assessment. *Evolution*, 42, 387-391.

Moore, A. J. (1990). The inheritance of social dominance, mating behaviour and attractiveness to mates in male *Nauphoeta cinerea*. *Animal Behaviour*, 39, 388-397.

Muller, K., Arenas, L., Thiéry, D., & Moreau, J. (2016). Direct benefits from choosing a virgin male in the European grapevine moth, *Lobesia botrana*. *Animal Behaviour*, 114, 165-172.

Nielsen, M. L., & Holman, L. (2012). Terminal investment in multiple sexual signals: immune-challenged males produce more attractive pheromones. *Functional Ecology*, 26, 20-28.

Poiani, S. B., Morgan, E. D., Drijfhout, F. P., & Da Cruz-Landim, C. (2014). Separation of *Scaptotrigona postica* workers into defined task groups by the chemical profile on their epicuticle wax layer. *Journal of Chemical Ecology*, 40, 331-340.

- Rani, P. U., Kumari, S. I., Sriramakrishna, T., & Sudhakar, T. R. (2007). Kairomones extracted from rice yellow stem borer and their influence on egg parasitization by *Trichogramma japonicum* Ashmead. *Journal of Chemical Ecology*, 33, 59-73.
- Rantala, M. J., Kortet, R., Kotiaho, J. S., Vainikka, A., & Suhonen, J. (2003). Condition dependence of pheromones and immune function in the grain beetle *Tenebrio molitor*. *Functional Ecology*, 17, 534-540.
- Rosengaus, R. B., James, L. T., Hartke, T. R., & Brent, C. S. (2011). Mate preference and disease risk in *Zootermopsis angusticollis* (Isoptera: Termopsidae). *Environmental Entomology*, 40, 1554-1565.
- Saino, N., & Møller, A. P. (1995). Testosterone-induced depression of male parental behavior in the barn swallow: female compensation and effects on seasonal fitness. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 36, 151-157.
- Snellings, Y., Herrera, B., Wildemann, B., Beelen, M., Zwarts, L., Wenseleers, T., & Callaerts, P. (2018). The role of cuticular hydrocarbons in mate recognition in *Drosophila suzukii*. *Scientific Reports*, 8, 4996.
- Semarnacc, S. (2007). ¿Y el medio ambiente? Problemas en México y el Mundo.
- Simmons, L. W. (1986). Inter-male competition and mating success in the field cricket, *Gryllus bimaculatus* (De Geer). *Animal Behaviour*, 34, 567-579.
- Thaochan, N., & Ngampongsai, A. (2018). Effect of *Metarhizium guizhouense* infection on mating competition and mate choice of *Bactrocera latifrons* (Diptera: Tephritidae). *Phytoparasitica*, 46, 459-469.
- Thomas, M. L., & Simmons, L. W. (2009). Sexual selection on cuticular hydrocarbons in the Australian field cricket, *Teleogryllus oceanicus*. *BMC Evolutionary Biology*, 9, 162.
- Van Driesche, R., & Hoddle, M. (2009). Control of pests and weeds by natural enemies: an introduction to biological control. John Wiley & Sons.

Valiente-Banuet, A., Aizen, M. A., Alcántara, J. M., Arroyo, J., Cocucci, A., Galetti, M., García, M. B., García, D., Gómez, J. M., Jordano, P., Medel, R., Navarro, L., Obeso, J. R., Oviedo, R., Ramírez, N., Rey, P. J., Traveset, A., Verdú, M., & Zamora, R. (2015). Beyond species loss: the extinction of ecological interactions in a changing world. *Functional Ecology*, 29, 299-307.

Worden, B. D., & Parker, P. G. (2001). Polyandry in grain beetles, *Tenebrio molitor*, leads to greater reproductive success: material or genetic benefits?. *Behavioral Ecology*, 12, 761-767.

Wittwer, B., Hefetz, A., Simon, T., Murphy, L. E., Elgar, M. A., Pierce, N. E., & Kocher, S. D. (2017). Solitary bees reduce investment in communication compared with their social relatives. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114, 6569-6574.

Zito, P., Sajeve, M., Bruno, M., Maggio, A., Rosselli, S., Formisano, C., & Senatore, F. (2010). Essential oil composition of stems and fruits of *Caralluma europaea* NE Br. (Apocynaceae). *Molecules*, 15, 627-638.