



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD MORELIA**

### **BIOLOGÍA EVOLUTIVA**

**EVOLUCIÓN DE LA VIRULENCIA:**

**¿EVOLUCIÓN COINCIDENTE O EVOLUCIÓN A CORTO PLAZO?**

## **TESIS**

**(POR ARTÍCULO CIENTÍFICO)**

**VIRULENCE EVOLUTION AND IMMUNE EVASION: SHORT-TERM OR  
COINCIDENTAL EVOLUTION?**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:**

**VÍCTOR JOSÉ TREJO MELÉNDEZ**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JORGE ALBERTO CONTRERAS GARDUÑO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES  
(ENES), MORELIA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DR. LUIS MENDOZA CUENCA**

**UNIVERSIDAD MICHOACAN DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO  
(UMNSH)**

**DR. CUAUHTÉMOC JUAN HUMBERTO LANZ  
MENDOZA**

**INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PUBLICA (INSP)**

**CD. MX.**

**ENERO, 2020**



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**

## **POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD MORELIA**

### **BIOLOGÍA EVOLUTIVA**

**EVOLUCIÓN DE LA VIRULENCIA:**

**¿EVOLUCIÓN COINCIDENTE O EVOLUCIÓN A CORTO PLAZO?**

## **TESIS**

**(POR ARTÍCULO CIENTÍFICO)**

**VIRULENCE EVOLUTION AND IMMUNE EVASION: SHORT-TERM OR  
COINCIDENTAL EVOLUTION?**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:**

**VÍCTOR JOSÉ TREJO MELÉNDEZ**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JORGE ALBERTO CONTRERAS GARDUÑO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES  
(ENES), MORELIA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DR. LUIS MENDOZA CUENCA**

**UNIVERSIDAD MICHOACAN DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO  
(UMNSH)**

**DR. CUAUHTÉMOC JUAN HUMBERTO LANZ  
MENDOZA**

**INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PUBLICA (INSP)**

**MÉXICO, CD. MX.**

**ENERO, 2020**

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ENTIDAD ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD MORELIA

OFICIO CPCB/035/2020

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM

Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **30 de septiembre de 2019** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología evolutiva** del alumno **TREJO MELÉNDEZ VÍCTOR JOSÉ** con número de cuenta **302599433** por la modalidad de graduación de **tesis por artículo científico** titulado: **“EVOLUTION OF VIRULENCE AND IMMUNE EVASION: SHORT-TERM OR COINCIDENTAL EVOLUTION?”**, que es producto del proyecto realizado en la maestría que lleva por título: **“Evolución de la virulencia: ¿Evolución Coincidente o Evolución a Corto Plazo?”**, ambos realizados bajo la dirección del **DR. JORGE ALBERTO CONTRERAS GARDUÑO**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: **DRA. ALEJANDRA OCHOA ZARZOSA**  
Vocal: **DRA. EK DEL VAL DE GORTARI**  
Secretario: **DR. CUAUHTÉMOC JUAN HUMBERTO LANZ MENDOZA**  
Suplente: **DR. JESÚS GUILLERMO JIMÉNEZ CORTES**  
Suplente: **DR. JORGE MORALES MONTOR**

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”**  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 09 de enero de 2020

**COORDINADOR DEL PROGRAMA**

  
**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**

c. c. p. Expediente del alumno

## **Agradecimientos Institucionales:**

A) Al Posgrado de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

B) A los apoyos económicos recibidos por CONACyT y DGAPA-PAPIIT (IA205318).

C) A mi Tutor Principal el Dr. Jorge Alberto Contreras Garduño (UNAM) y a los miembros de mi Comité Tutorial: Dr. Cuauhtémoc Juan Humberto Lanz Mendoza (INSP) y Dr. Luis Mendoza Cuenca (UMSNH).

## **Agradecimientos personales**

A) A los miembros del jurado: Dra. Ek del Val de Gortari (UNAM), Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa (UMNSH), Dr. Cuauhtémoc Juan Humberto Lanz-Mendoza (INSP), Dr. Guillermo Jiménez Cortés (UNAM) y el Dr. Jorge Morales Montor (UNAM).

B) A mis compañeros y amigos del laboratorio de Ecología Evolutiva de la ENES, UNAM - Morelia.

C) A la M. en C. Gloria Ruiz Guzmán (UNAM).

D) Al M. en C. Jorge Canales Lazcano (UNAM).

E) Al Laboratorio Nacional de Análisis y Síntesis Ecológica (LANASE) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

F) Al señor Lan y su familia (Jerécuaro, Guanajuato, México).

## Índice

Resumen.....	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
Respuesta inmunitaria de insectos.....	6
Nematodos entomopatógenos.....	7
<i>Rhabditis regina</i> .....	9
Artículo - “Virulence Evolution and Immune evasion: short-term or coincidental evolution?”.....	12
Discusión.....	13
Conclusiones.....	22
Literatura citada.....	23
Anexo 1.....	39



## Resumen

Los parásitos son una presión selectiva importante sobre sus hospederos, pero su virulencia es lábil. Dos hipótesis que explican dicha varianza son: a) la evolución a corto plazo y b) la evolución coincidente de la virulencia. La primera cita que los parásitos pierden virulencia después de infectar un hospedero nuevo y la segunda propone que los parásitos ganan virulencia como un efecto colateral de vivir en entornos fuera de algún hospedero. Para saber si la variación en la virulencia de un parásito es explicada por ambas hipótesis al mismo tiempo, monitoreamos la evolución del nematodo *Rhabditis regina* por 290 generaciones (4 años) en tres ambientes: 1) con su hospedero natural, *Phyllophaga polyphylla*, 2) con un hospedero alterno, *Tenebrio molitor*, y 3) de un medio saprófito (carne cruda de res). Cada cepa se expuso a *P. polyphylla*, *T. molitor* o *Galleria mellonella*. La supervivencia de los hospederos y la dosis de parásitos necesaria para matar al hospedero fue registrada como una medida de la virulencia del parásito, y el rol de la respuesta inmunitaria (proPO, PO y actividad lítica) fue igualmente examinada. De acuerdo con la hipótesis de la evolución a corto plazo, encontramos que la infección del nematodo en hospederos similares (de la misma especie) fue más virulento que aquellos que infectan hospederos de otras especies, y de acuerdo con la hipótesis de la evolución coincidente, los nematodos provenientes de medios saprófitos ganaron virulencia contra *G. mellonella*. Generalmente, los nematodos no activaron la respuesta inmunitaria de los hospederos, lo que sugiere la capacidad inmunomoduladora. Ambas hipótesis pueden explicar la evolución de la virulencia en hospederos nuevos, y la modulación de la respuesta inmunitaria del hospedero es la clave para conocer el mecanismo de ataque del parásito.

## Abstract

Parasites are a strong selective pressure on their host, but its virulence is labile. Two hypotheses that explain such variance are: a) the short-term and b) coincidental evolution of virulence. The former states that parasites lose virulence after jumping to a new host and the second propose that parasites gain virulence as a side effect of living in a non-host environment. To know whether parasite virulence variation is explained by both hypotheses at the same time, we monitored the evolution of the *Rhabditis regina* nematode for 290 generations (4 years) in three environments: 1) with its natural host, *Phyllophaga polyphylla*, 2) with an alternate host, *Tenebrio molitor*, and 3) in a saprophytic medium (beef). Each strain was exposed to *P. polyphylla*, *T. molitor* or *Galleria mellonella*. The survival of the host and the dose of the parasites necessary to kill the host were recorded as a measure of parasite virulence, and the role of the host immune response (proPO, PO and lytic activity) was examined as well. According to the short-term evolution it was found that the nematodes infecting similar hosts (of the same species) were more virulent than those infecting a host of a different species, and according to the coincidental evolution, the saprophyte nematodes gained virulence against *G. mellonella*. The nematodes generally did not activate the immune response of the host, which suggests an immunomodulatory ability. Both hypotheses can explain the evolution of virulence against new hosts, and modulation of the host immune response is key to know the mechanism of parasite attack.

## Introducción

La interacción de coevolución antagonista parásito-hospedero ha revelado estrategias espectaculares de los parásitos, patógenos o parasitoides que les permiten sobrevivir a expensas de otros organismos, a los que se les denomina hospedero, pero los hospederos no son agentes pasivos y también evolucionan extraordinarias defensas contra sus enemigos. Esto ocurre a lo largo de varias generaciones, y deriva en una presión selectiva mutua que favorece la evolución de estrategias en ambos interactuantes (Zimmer & Emlen, 2016). Un componente fundamental en esta interacción parásito-hospedero es la virulencia, definida en un sentido ecológico-evolutivo como la reducción en la adecuación del hospedero (supervivencia y/o reproducción) debido a la infección (Råberg & Stjernman, 2012). De acuerdo con los modelos teóricos evolutivos de Anderson & May (1982), la virulencia es un componente de adecuación de los parásitos al igual que el índice de transmisión y el índice de recuperación del hospedero. Aunque comúnmente la virulencia se considera como un atributo propio del parásito (Ebert & Hamilton, 1996; Day & Burns, 2003; Restif & Koella, 2003; Alizon et al., 2009), la diversidad e intensidad de dicho atributo no solamente depende del parásito o las defensas del hospedero, sino también, del ambiente en el que se desarrolla dicha interacción (Råberg & Stjernman, 2012), y esto deriva en que la virulencia no sea un atributo estático, sino increíblemente lábil, por lo que resulta interesante saber por qué y cómo varía la virulencia.

La labilidad de la virulencia se ha comprobado en diversas ocasiones (Fenner & Fantini, 1999; Read & Mackinnon, 2008; Müller et al., 2009), sin

embargo, las presiones selectivas que influyen en este carácter son desconocidas (Råberg & Stjernman, 2012). Existen tres hipótesis que explican la evolución de la virulencia. La primera, es la hipótesis de la avirulencia, la cual menciona que el potencial virulento de un parásito hacia su hospedero disminuirá al paso de las generaciones hasta llegar a una asociación mutualista donde no hay daño por parte del parásito (Levin & Svanborg Edén, 1990). La segunda, es la evolución coincidente de la virulencia, que establece que la virulencia no siempre será objeto de la selección natural de los hospederos sobre sus parásitos, sino un producto de la influencia de factores bióticos y abióticos del ambiente en el que se desarrolla un parásito, lo que puede provocar respuestas virulentas inesperadas al momento de infectar a un hospedero (Levin, 1996). Un claro ejemplo son las bacterias del género *Clostridium*, que naturalmente son de vida libre pero cuando tienen acceso a un hospedero, algunas de las características (i.e. toxinas) generadas por presiones selectivas presentes en su hábitat natural actúan como factores de virulencia en el hospedero infectado (Levin, 1996). Finalmente, la tercera es la hipótesis de la evolución de la virulencia a corto plazo o dentro del hospedero, que propone que los caracteres que favorecen la supervivencia o replicación de un parásito (p.ej. virulencia) en el microambiente de un hospedero nuevo serán favorecidos por la selección natural y comenzarán a evolucionar en ese momento y tiempo dado (Levin & Bull, 1994). Un escenario de esta hipótesis es que la virulencia de un parásito pueda ser específica contra el hospedero con el que coevoluciona, pero ante un cambio de hospedero la virulencia será más intensa en el hospedero nuevo y atenuada en contra del hospedero ancestral (Caraco et al., 2016; Cressler et al., 2016). De acuerdo a esta hipótesis, el cambio de hospederos puede originar

epidemias devastadoras como: a) el VIH que originalmente se alojaba en primates no humanos y ahora en humanos (Hahn et al., 2000) y b) la cepa de *Escherichia coli* O158:H7 que infecta bovinos, pero ha podido transmitirse también a humanos causando diarrea hemorrágica y falla renal (Kaper & O'Brien, 1998; Woolhouse et al., 2005).

En conjunto, las tres hipótesis explican la evolución y labilidad de la virulencia, pero la primera ha sido desacreditada porque las historias de vida de cada parásito son diferentes y algunos requieren de la explotación eficiente del hospedero para reproducirse y transmitirse, lo cual no siempre evitará la mortalidad del hospedero (May & Anderson, 1983). Actualmente, las hipótesis de la virulencia a corto plazo y la evolución coincidente son las más estudiadas pero usualmente se analizan por separado, y dado que no son excluyentes, es posible que ambas expliquen la labilidad de la virulencia de los parásitos al mismo tiempo. Además, pocas veces se toma en cuenta la respuesta inmunitaria al evaluar las hipótesis de la evolución de la virulencia (Bull, 1994; Adiba et al., 2010) y es necesario analizar dicha respuesta porque es la que detiene o falla ante el ataque de los parásitos. A continuación, se describe la respuesta inmunitaria de los insectos para entender las posibles barreras contra los enemigos.

## RESPUESTA INMUNITARIA DE INSECTOS

En el hospedero, los parásitos se alimentan y compiten con la defensa inmunitaria (Rynkiewicz et al., 2015); de manera que, la interacción del parásito con el sistema inmunitario del hospedero es un momento crítico que determina la interacción de ambos (Schmid-Hempel, 2009). La respuesta inmune innata es una estrategia de resistencia que han evolucionado los animales en contra de la virulencia, lo que les permite responder rápidamente a los desafíos impuestos por distintos parásitos (Gillespie et al. 1997). Específicamente, en los insectos, el sistema de defensa está formado por componentes celulares y humorales (Park & Lee, 2012), siendo el sistema de fenoloxidasa (PO), uno de los principales mecanismos de defensa en contra de los parásitos y un componente sumamente importante de la respuesta inmune innata, pues desencadena la melanización de los enemigos (Cerenius et al., 2008). La activación de la enzima PO se da a partir de su zimógeno (enzima no activada) profenoloxidasa (proPO), y la proPO se activa después del reconocimiento de los enemigos en la hemolinfa (González-Santoyo & Córdoba-Aguilar, 2011; Adamo, 2004). Este sistema es tan importante, que los enemigos de los insectos han evolucionado sistemas de evasión e inactivación de la cascada de la PO y de otros mecanismos de defensa inmunitaria (Castillo et al., 2011; Cooper & Eleftherianos, 2016), así que es probable que la transmisión entre hospederos diferentes genere costos de infección ante hospederos nuevos si sus mecanismos de defensa se especializan contra una especie de hospedero natural (Benmayor et al., 2009; Longdon et al., 2014).

Los organismos pertenecientes al phylum Nematoda representan un modelo magnífico para el estudio de la evolución del parasitismo y de los atributos que conforman el sistema parásito-hospedero, por tener estilos de vida muy diversos: vida libre, depredadores, saprófitos, foréticos, necroménicos, parásitos facultativos o estrictos (Poulin & Randhawa, 2013). A continuación, se describe la biología de los nematodos entomopatógenos porque además de ser buenos modelos para estudiar la evolución de la virulencia (Blaxter & Koutsovoulos, 2014), modulan la respuesta inmunitaria (Castillo et al., 2011), y en conjunto, se podría estudiar cómo la labilidad de la virulencia se relaciona con la modulación de la respuesta inmunitaria del hospedero.

## NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS

Particularmente, los nematodos entomopatógenos presentan una propiedad virulenta única entre sus congéneres pues se asocian con bacterias entomopatógenas que le ayudan a infectar y matar a los hospederos que infectan (Castillo et al., 2011). Las especies más conocidas pertenecen a dos géneros: *Heterorhabditis* (Rhabditidae) y *Steinernema* (Strongyloidoitidae), a su vez tienen un vínculo mutualista específico con bacterias del género *Photorhabdus* y *Xenorhabdus* respectivamente (Chaston et al., 2011). No obstante, existen otras especies de nematodos bacteriófagos de los géneros *Rhabditis* y *Oscheius* que forman asociaciones con más de una bacteria, alojando diferentes especies de

bacterias entomopatógenas que matan a sus hospederos insectos, o inclusive en algunos casos, también a caracoles (Zhang et al., 2009; Park, 2011; Torres-Barragán et al., 2011; Tambong, 2013; Stock, 2015).

Las bacterias asociadas a los nematodos entomopatógenos son un factor de virulencia importante, no obstante, los nematodos poseen sus propias armas en contra del sistema inmune como la secreción de toxinas y/o las propiedades inmunomoduladoras de la cutícula de la larva *dauer* (Lu et al., 2017; Blaxter et al., 1992). La larva *dauer*, (la palabra *dauer* que proviene del alemán que significa “resistente” o “duradero”) se caracteriza por tener una cutícula doble y en consecuencia su boca y ano se encuentran sellados por lo que no necesita alimentarse (O’Riordan & Burnell, 1990). Sus niveles metabólicos reducidos y reservas lipídicas le confieren una resistencia notable al estrés ambiental y por ende una dispersión excepcional en tiempo-espacio (Hu, 2007). Por lo tanto, es la fase que posee características para buscar e infectar al insecto hospedero para completar su ciclo de vida (O’Riordan & Burnell, 1990). Cuando la larva *dauer* ingresa al hemocele del insecto puede provocar respuestas celulares-humorales rápidas y fuertes que pueden encapsularla, melanizarla y matarla (Davis & Engström, 2012; Eleftherianos et al., 2010; Dillman et al., 2012); no obstante, existe evidencia de que la larva *dauer* interfiere sobre el sistema inmunológico celular (p.ej. encapsulación) y/o humoral (p.ej. sistema de la profenoloxidasas) del insecto durante las primeras etapas de la infección, lo que le permite contrarrestar la respuesta inmune y así provocar la enfermedad y muerte del hospedero (Davis et al., 1980; Castillo et al., 2011). Por ejemplo, la larva *dauer* de *Steinernema glaseri* posee una cutícula dotada con proteínas



SCP3a, las cuales evitan que los hemocitos de su hospedero los puedan reconocer (Wang & Gaugler, 1999), también, *S. feltiae* presenta una cutícula que atrae proteínas de la hemolinfa del insecto que inactivan la cascada de la PO, y así evitan la melanización humoral y/o celular (Mastore & Brivio, 2008; Brivio et al., 2010).

### *Rhabditis regina*

El nematodo *Rhabditis regina* (Rhabditidae) es un entomopatógeno natural de larvas de los géneros de coleópteros *Phyllophaga*, *Paranomala* y *Cyclocephala* (Schulte & Poinar, 1991), pero en el laboratorio infecta a especies de insectos distintas a las que infecta naturalmente, como por ejemplo *Tenebrio molitor*, *Ceratitis capitata* o *Galleria mellonella* (Schulte & Poinar, 1991; Jiménez-Cortés et al., 2016). A diferencia de las especies comprendidas en el género *Heterorhabditis* y *Steinernema*, *R. regina* alberga una microbiota compuesta por más de una bacteria de naturaleza entomopatógena (p. ej. *Serratia* sp. y *Klebsiella* sp.), al igual que otros nematodos del género *Rhabditis* y del género *Oscheius* (Zhang et al., 2008; Park, 2011; Torres-Barragán et al., 2011; Tambong, 2013; Stock, 2015), pero algo que también es sumamente interesante, es que *R. regina* puede desarrollarse en medios saprófitos (cultivado en carne de res) al igual que nematodos del género *Pristionchus* (Li et al., 2015; Jiménez-Cortés et al., 2016), lo cual indica su capacidad de desarrollarse en sitios diferentes. Finalmente, algo interesante en *R. regina* es que su microbiota puede cambiar de acuerdo al hospedero que infecte, ya sea *P. polyphylla*, *T. molitor* y/o

un ambiente saprófito (carne de res) y por tanto, es posible que la virulencia de *R. regina* también cambie en función de las condiciones en la cual se mantenga (Jiménez-Cortés et al., 2016). Así que este escenario permite poner a prueba las hipótesis de la evolución de la virulencia para saber porque y de que manera varía.

En la primera parte de la tesis se analizó la importancia de *R. regina* en las poblaciones silvestres de *P. polyphylla* en Jerécuaro, Guanajuato, el área de estudio, donde se aisló el nematodo. Se encontró que la prevalencia de este parásito se mantuvo en dos años consecutivos y fue mayor que la infección con otros entomopatógenos (ver Anexo 1). En la segunda parte de la tesis (*Artículo enviado*) se analizó y comparó la virulencia de poblaciones silvestres de *R. regina* asociadas a su hospedero natural (*P. polyphylla*), contra poblaciones de *R. regina* mantenidas en ambientes alternos: 1) una población mantenida en un hospedero alternativo (*T. molitor*), y 2) otra población mantenida en un medio saprófito (carne cruda). Las variaciones se explicaron en términos de la hipótesis de la evolución coincidente, la hipótesis de la evolución a corto plazo, o si podría explicarse por ambas hipótesis, ya que estas citan la importancia de los hospederos alternos y/o estilos de vida de los parásitos como agentes evolutivos capaces de modificar la virulencia. Así, la evolución de la virulencia del nematodo se observó a través de 290 generaciones (4 años) en el hospedero nuevo (*T. molitor*), y en condiciones saprófitas (carne cruda). Subsecuentemente, cada una de las tres cepas de nematodos fueron utilizados para infectar a tres hospederos: *P. polyphylla*, *T. molitor* y *G. mellonella*. La determinación de la virulencia de *R. regina* se hizo considerando la supervivencia del hospedero (en días), la dosis

del parásito necesaria para provocar mortalidad en los hospederos (uno o 10 nematodos), y la respuesta inmunitaria del hospedero (niveles de proPO, PO y actividad lítica) para entender las estrategias que utilizan los parásitos para manipular las defensas del hospedero y si estas estrategias cambiaban con respecto a la línea de selección.

**ARTICULO**

**VIRULENCE EVOLUTION AND IMMUNE EVASION:  
SHORT-TERM OR COINCIDENTAL EVOLUTION?**



**EVOLUTION OF VIRULENCE AND IMMUNE EVASION:  
SHORT-TERM OR COINCIDENTAL EVOLUTION?**

Journal:	<i>Parasite Immunology</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Trejo, Víctor; Universidad Nacional Autónoma de México Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad Morelia, ecología Mendez, Texca; Universidad Nacional Autónoma de México Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad Morelia, Ecología Contreras Garduño, Jorge; Universidad Nacional Autónoma de México. ENES, Morelia., Ecología
Key Words:	Other < Disease, Arthropod < Host species, Immune modulation < Immunological terms, Flow cytometry < Tools and techniques, ELISA/Enzyme-linked immunosorbent assay < Tools and techniques

1  
2  
3  
4 1           **EVOLUTION OF VIRULENCE:**  
5  
6  
7  
8  
9 2           **SHORT-TERM OR COINCIDENTAL**  
10  
11  
12  
13 3           **EVOLUTION?**  
14  
15  
16  
17  
18 4

19  
20  
21 5           **Víctor José Trejo Meléndez<sup>1,2</sup>, Texca T. Méndez-López<sup>1,2</sup> &**  
22  
23  
24 6                           **Jorge Contreras-Garduño<sup>2\*</sup>**  
25  
26

27  
28 7           <sup>1</sup> Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de  
29  
30 8           México; Av. Ciudad Universitaria 3000, C.P. 04510, Coyoacán, CDMX,  
31  
32  
33 9           México.

34  
35  
36 10           <sup>2</sup> ENES, Unidad Morelia, UNAM. Antigua Carretera a Pátzcuaro  
37  
38  
39 11           No.8701. Col. Ex-Hacienda San José de la Huerta Código Postal  
40  
41  
42 12           58190, Morelia, Michoacán.

43  
44  
45 13           \*Corresponding author: [jcg@enesmorelia.unam.mx](mailto:jcg@enesmorelia.unam.mx)  
46  
47  
48 14

49  
50  
51  
52 15           **Keywords:** Short-term evolution, coincidental evolution, entomopathogenic  
53  
54 16           nematode, virulence, immunomodulation, *Rhabditis regina*.  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 17  
4  
56 18 **Abstract**  
7

8  
9 19 We analyzed the a) short-term and b) coincidental evolution of virulence to assess  
10  
11 20 the evolution of virulence and its lability by monitoring the evolution of the *Rhabditis*  
12  
13 21 *regina* nematode for 290 generations (4 years) in three environments: 1) with its  
14  
15 22 natural host, *Phyllophaga polyphylla*, 2) with an alternate host, *Tenebrio molitor*,  
16  
17 23 and 3) in a saprophytic medium (beef). Each strain was exposed to *P. polyphylla*,  
18  
19 24 *T. molitor* or *Galleria mellonella*. The survival of the host and the dose of the  
20  
21 25 parasites necessary to kill the host were recorded as a measure of parasite  
22  
23 26 virulence, and the role of the host immune response (proPO, PO and lytic activity)  
24  
25 27 was examined as well. According to the short-term evolution it was found that the  
26  
27 28 nematodes infecting similar hosts (of the same species) were more virulent than  
28  
29 29 those infecting a host of a different species, and according to the coincidental  
30  
31 30 evolution, the saprophyte nematodes gained virulence against *G. mellonella*. The  
32  
33 31 nematodes generally did not activate the immune response of the host, which  
34  
35 32 suggests an immunomodulatory ability. Both hypotheses can explain the evolution  
36  
37 33 of virulence against new hosts, and modulation of the host immune response is key  
38  
39 34 to know the mechanism of parasite attack.  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

35

36

37 **INTRODUCTION**

38

39 In the host-parasite interaction, parasites evolve virulence strategies that allow for  
40 the exploitation of the host, and the host simultaneously evolves resistance through  
41 its immune response. This evolutionary arms race can be analyzed at the  
42 molecular and individual level, as well as within or across generations.<sup>1,2</sup> Given that  
43 parasites do not always express a high level of virulence, nor do hosts always  
44 show an exacerbated immune response against parasites, it is interesting to  
45 explore what determines the plasticity of virulence and the host immune response.  
46 <sup>3,4</sup> The scenario of long-term coevolution and its genetic basis have been key  
47 aspects of the host-parasite relation. However, virulence, defined as the reduction  
48 in host survival and/or reproduction in a short period of time<sup>5-7</sup> is labile<sup>8-10</sup> and little  
49 is known about the selective pressures that favor or restrict it in the short run.<sup>11-13</sup>  
50 Two hypotheses have been posed to explain such selective pressures: short-term  
51 and coincidental evolution of virulence. On the one hand, the hypothesis of short-  
52 term evolution holds that virulence in a given microenvironment (the natural host) is  
53 local, and therefore it is more limited when a parasite encounters a new host.<sup>11</sup>  
54 This theory has been validated by several studies finding lower virulence against  
55 new versus natural hosts (natural hosts being those with which the parasite  
56 coevolved).<sup>13,14</sup> Consequently, a higher dose of parasites is predicted to kill new  
57 hosts than natural hosts.<sup>15</sup> On the other hand, the hypothesis of coincidental



1  
2  
3 58 evolution of virulence poses that the selective pressure exercised by the host is not  
4  
5 59 the only factor involved in virulence. Some biotic and abiotic factors present during  
6  
7 60 the development of the pathogen also influence its virulence in a collateral manner.  
8  
9  
10 61 <sup>16</sup> In bacteria of the genus *Clostridium*, for example, its free lifestyle endows it with  
11  
12 62 characteristics (e.g., toxins) that represent virulence upon confronting a new host,  
13  
14 63 such as humans.<sup>16</sup> Thus, the hypothesis of coincidental evolution predicts a greater  
15  
16 64 virulence against new hosts. In conclusion, the lability of virulence depends on  
17  
18  
19 65 whether the lifestyle of a parasite is free, saprophytic or entomopathogenic and  
20  
21 66 against a new host, virulence may be reduced (the short-term virulence  
22  
23 67 hypothesis) or favored (the coincidental evolution hypothesis).  
24  
25  
26  
27 68  
28  
29

30 69 These hypotheses can be analyzed by considering not only host survival  
31  
32 70 and parasite dose as a measure of virulence, but also the host immune response  
33  
34 71 as a hostile environment for parasites.<sup>17</sup> Furthermore, parasites develop strategies  
35  
36 72 to counteract the immune response of natural hosts,<sup>18</sup> which in turn decreases their  
37  
38 73 capacity to confront the immune response of new hosts.<sup>15,19</sup> Parasites may attack  
39  
40 74 the host by manipulation of its immune response, aiming to diminish or evade (not  
41  
42 75 activate) such a response. Making the host immune system ineffective allows for  
43  
44 76 the successful establishment of a parasite.<sup>1,2,18</sup> From the point of view of the short-  
45  
46 77 term evolution hypothesis, a stronger immune response is expected in new versus  
47  
48 78 natural hosts. According to the coincidental evolution hypothesis, parasites are  
49  
50  
51 79 able to attenuate or avoid activating the immune response of new hosts. Hence,  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 80 the immune system of new hosts should be weaker in infected than uninfected  
4  
5 81 insects, and in infected new hosts versus infected natural hosts.  
6  
7  
8  
9 82

10  
11 83 Entomopathogenic nematodes are good models for testing the two  
12  
13 84 aforementioned hypotheses because they have versatile lifestyles, varying from  
14  
15 85 free-living organisms to phoretic, necromenic, saprophytic, facultative and obligate  
16  
17 86 parasites.<sup>20</sup> Moreover, they are known to modulate the immune response of their  
18  
19 87 host,<sup>21,22</sup> whether by evasion or inactivation.<sup>23,24</sup> For instance, *Heterorhabditis* and  
20  
21 88 *Steinernema* evade the phenoloxidase (PO) cascade of insects and kill their host in  
22  
23 89 a matter of days.<sup>25-28</sup> Regarding the innate immune response of insects, the  
24  
25 90 prophenoloxidase system (proPO) is a crucial component involved in triggering the  
26  
27 91 process of melanization. This process begins when the phenoloxidase (PO)  
28  
29 92 enzyme oxidizes phenols of the hemolymph into quinones, which in turn  
30  
31 93 polymerize into melanin and reactive oxygen species (ROS). Either melanin is  
32  
33 94 deposited around the nematode or hemocytes adhere to the parasite and are  
34  
35 95 melanized. In either case, the nematode is encapsulated and isolated from the host  
36  
37 96 body,<sup>29</sup> meaning that PO is the main defense of insects against entomopathogenic  
38  
39 97 nematodes and other parasites.<sup>30</sup>  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47 98

48  
49  
50 99 The nematode *Rhabditis regina* has been found in Guatemala<sup>31</sup> and  
51  
52 100 Mexico.<sup>32</sup> It infects larvae of *Phyllophaga*, *Paranomala* and *Cyclocephala* in its  
53  
54 101 natural environment, but in the lab can infect additional species of insects, such as  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 102 *Tenebrio molitor*, *Ceratitis capitata* and *Galleria mellonella*,<sup>31,32</sup> Like other  
4  
5 103 nematodes of the *Rhabditis* and *Oscheius* genera, this parasite harbors a  
6  
7 104 microbiota composed of entomopathogenic bacteria (e.g., *Serratia* sp. and  
8  
9 105 *Klebsiella* sp.), which makes it an entomopathogenic nematode for some insects.<sup>32-</sup>  
10  
11 106 <sup>37</sup> *R. regina* is also able to develop in a saprophytic medium (e.g., beef), as found  
12  
13 107 with nematodes of the *Pristionchus* genus.<sup>38</sup> Hence, the ability to act as  
14  
15 108 entomopathogens of different species of insects and to survive in saprophytic  
16  
17 109 conditions evidences the versatility of the lifestyle of *R. regina*. For this reason, the  
18  
19 110 aim of the present study was to examine whether the variation in virulence of the  
20  
21 111 *R. regina* nematode (Rhabditidae) is best explained by the hypothesis of  
22  
23 112 coincidental or short-term evolution, or if it can be understood by both. Thus, the  
24  
25 113 evolution of the virulence of the nematode was observed through 290 generations  
26  
27 114 (4 years) in three environments: with a natural host (*P. polyphylla*), with a new host  
28  
29 115 (*T. molitor*), and in saprophytic conditions (beef). Subsequently, the separate  
30  
31 116 groups of the nematodes cultivated under each condition were exposed to one of  
32  
33 117 three hosts: *P. polyphylla*, *T. molitor* or *G. mellonella*. The determination of  
34  
35 118 virulence of *R. regina* was made by considering the survival of the host, the dose of  
36  
37 119 the parasite needed to kill the host, and the immune response was recorded to  
38  
39 120 know how parasites manipulate the immune responses according to its previous  
40  
41 121 host ambient.  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52

## 53 123 **Material and Methods**

54  
55 124  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 125 **Strains of *R. regina***  
4

5 126  
6

7 127 Wild nematodes were obtained from *P. polyphylla* that were gathered in cornfields  
8

9 128 located in Jerécuaro, Guanajuato, Mexico. In the laboratory, the larvae of *P.*  
10

11 129 *polyphylla* were monitored for three months to detect the specimens showing signs  
12

13 130 of sickness. In all experiments we used Dauer larvae obtained from our colony with  
14

15 131 white traps.<sup>39</sup> The Dauer identity was confirmed by submerging the larvae in 1% of  
16

17 132 with Sodium dodecyl sulfate (SDS; Sigma) for one hour: only the Dauer larvae  
18

19 133 survive to this treatment.<sup>40</sup> The strain that infected the natural host in the field (**NS**)  
20

21 134 was collected from *P. polyphylla*. The alternative host strain (**AS**) and the  
22

23 135 saprophytic strain (beef; **SS**) derived from natural conditions but were bred on *T.*  
24

25 136 *molitor* or cow beef, respectively for 4 years, which coincide with about 290  
26

27 137 generations because the life cycle of this nematode last about 5 days.<sup>31</sup> A pilot  
28

29 138 experiment showed changes in virulence between these strains just after 10  
30

31 139 generations (unpubl. data), so, after about 290 generations we ensured a change  
32

33 140 of virulence. We used the **SS** strain to test the Coincidental Evolution of Virulence  
34

35 141 hypothesis to simulate a bred medium not based on insects, avoiding the selective  
36

37 142 pressure due to the immune response. There is evidence that nematodes can live  
38

39 143 in this artificial medium at least for 10 years<sup>41</sup> and we know that under this  
40

41 144 condition the microbiota changes compared with nematodes bred on insects.<sup>32</sup>  
42

43 145  
44

45 146 **Insect hosts**  
46

47 147  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 148 Larvae of 3<sup>th</sup> instar of *P. polyphylla* was collected in the field and used for infections  
4  
5 149 after a period of quarantine (after three months of no visual showing signs of  
6  
7 150 sickness) to avoid any skew in our results derived to previous infections. At this  
8  
9  
10 151 developmental stage the larvae did not feed and were maintained in this conditions  
11  
12 152 during the experimental procedure. Larvae of 12<sup>th</sup> instar<sup>42</sup> of *T. molitor* were used  
13  
14 153 in infections. All larvae were fed *ad libitum* with bran and corn meal (1:1) with fresh  
15  
16  
17 154 apple slices added every other day.<sup>43,44</sup> Finally, we used the 5<sup>th</sup> instar of *G.*  
18  
19 155 *mellonella*, which coincide with the size of 1.8 a 1.9 cm.<sup>45</sup> This species was feed *ad*  
20  
21 156 *libitum* on a homogenized mix of equal proportions of honey, glycerol, beeswax,  
22  
23 157 dried milk, wheat flour, dry yeast and distilled water as well as two servings of  
24  
25  
26 158 corn meal.<sup>46,47</sup>

27  
28 159  
29  
30  
31 160 The food for all insects was sterilized ( $125 \pm 2$  °C for 15 minutes) to avoid  
32  
33 161 infections<sup>44</sup> and previous to inoculate the nematodes, all larvae were topically  
34  
35 162 disinfected with chloride (0.1%). During the experiments, each larva was kept  
36  
37 163 individually in one well of a 6 well-plate (Corning), which was deposited inside an  
38  
39 164 environmental chamber at  $27 \pm 1$ °C and 30% relative humidity in the dark  
40  
41  
42 165 (Lumistell). All experiments of infection were carried out in a Purifier Axiom Class  
43  
44 166 II Type C biological safety cabinet (LABCONCO) to avoid contamination and all  
45  
46  
47 167 material was previously sterilized with UV.

48  
49 168

### 50 51 169 ***General experimental design***

52  
53  
54 170  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 171 To analyze the short-term evolution of virulence we used a split design<sup>3</sup> using two  
4  
5 172 strains of *R. regina*: a) a strain infecting the natural host *P. polyphylla* (**NS**) a strain  
6  
7 173 infecting b) an alternative, new host (*T. molitor*; **AS**). These strains then infected *P.*  
8  
9 174 *polyphylla*, *T. molitor* or *G. mellonella*. In each infection (i.e. **NS** against *P.*  
10  
11 175 *polyphylla*) we established 3 sub-groups: a non-infected host, or insects infected  
12  
13 176 with 1 or 10 dauer larvae (Figure 1A). To test the hypothesis of coincidental  
14  
15 177 evolution of virulence we infected *P. polyphylla*, *T. molitor* or *G. mellonella* with a  
16  
17 178 strain breed in on a saprophytic medium (beef; **SS**). In each infection (i.e. **SS**  
18  
19 179 against *P. polyphylla*) we established 3 sub-groups: a non-infected host, or insects  
20  
21 180 infected with 1 or 10 dauer larvae (Figure 1B). Survival and immune response  
22  
23 181 (proPO, PO and lytic activity) was compared between groups (Figure 2).  
24  
25  
26  
27  
28  
29

182

### 183 **Bioassays of virulence**

184

185 We recorded daily survival in the following groups per host (being *P. polyphylla*, *T.*  
186 *molitor* or *G. mellonella*): The Control group received 5 µL a Ringer solution  
187 (Sigma) because we diluted the nematodes in this reagent, the 1N or 10 N Groups  
188 was injected with 1 or 10 dauer larvae diluted in 5 µL of Ringer. We used micro-  
189 syringes (Hamilton 700) to inject the nematodes or Ringer (30 larvae per group).

190

### 191 **Immune response**

192

1  
2  
3 193 Hemolymph was extracted 8 hours after infection. Insects were chilled on ice and  
4  
5 194 then we made an incision to obtain 4  $\mu\text{L}$  of hemolymph. This hemolymph was  
6  
7 195 obtained with a micropipette (Rainin 10  $\mu\text{L}$ ) and deposited in vials of 1.5 mL  
8  
9  
10 196 (Axigen) previously pre-cooled with 200  $\mu\text{L}$  of PBS. Samples were stored at  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$   
11  
12 197 in a CryoCube® F570 (Eppendorf) freezer until the analyses of immune response.  
13  
14  
15 198

16  
17 199 We measured proPO, PO and Lytic activity according to host (Fig. 2). The  
18  
19 200 PO activity was measured spectrophotometrically by recording the formation of  
20  
21 201 dopachrome from L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA, Sigma<sup>48-52</sup>). In short, 40  
22  
23 202  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  of protein was dose-titre until 150  $\mu\text{L}$  with PBS. This 150  $\mu\text{L}$  were mixed with  
24  
25 203 50  $\mu\text{L}$  of L-Dopa (4 mg/mL). Samples were incubated for 30 min at room  
26  
27 204 temperature inside each well of a 96-well plate (Corning) and subsequently read in  
28  
29 205 a microplate reader at 490 nm every 5 min for one hour in an ELISA reader  
30  
31 206 (Varioskan Flash Multimode Reader, Thermo Scientific). As blanks, in 3 wells we  
32  
33 207 mixed 150  $\mu\text{L}$  of PBS and 50  $\mu\text{L}$  of L-DOPA. The activity of the enzyme was  
34  
35 208 expressed as the rate of change of the optical density in time (modified from <sup>49</sup>). To  
36  
37 209 analyze total PO activity as a proxy of proPO, the procedure was similar, but in this  
38  
39 210 case 5  $\mu\text{L}$  of chymotrypsin (5 mg/mL) were added to the sample (with 40  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  of  
40  
41 211 protein) and then diluted with PBS to 150  $\mu\text{L}$ . Both PO and proPO activities were  
42  
43 212 expressed as Activity  $V_{\text{max}}$  (modify from <sup>49,51,52</sup>).  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50

51 214 Lytic activity was measured in an ELISA plate reader, two wells were used  
52  
53 215 as blanks with 230  $\mu\text{L}$  of PBS. Two other wells received 30  $\mu\text{L}$  of PBS and 200  $\mu\text{L}$   
54  
55 216 of the suspension of *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma). The remainder wells were  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 217 filled with 30  $\mu$ L of sample and 200  $\mu$ L of the *M. lysodeikticus* suspension. The  
4  
5 218 suspension of *M. lysodeikticus* was carried out at a concentration of 320  $\mu$ g/mL,  
6  
7 219 from lyophilized *M. lysodeikticus* powder. The absorbance of the plates was read at  
8  
9 220 540 nm every 5 minutes for 30 minutes after 15 minutes of incubation at room  
10  
11 221 temperature and covered with aluminum foil. The lytic activity was taken into  
12  
13 222 account as the degradation of *M. lysodeikticus* according to the linear slope of the  
14  
15 223 absorbance according to time.<sup>50</sup> The more negative slopes denote more activity  
16  
17 224 than the more positive slopes.  
18  
19  
20  
21  
22

225

## 226 **Statistical analyze**

227

228 The results were analyzed with the IBM SPSS Statistics 22 statistical analysis  
229 software. A plot of survival of Kaplan-Meier was used and this was analyzed with a  
230 Log-Rank test. For each measurement the values were fitted to a generalized  
231 model with a gamma probability distribution and a logarithmic function after  
232 transformation of each original variable  $x$  to  $x+1$ . This transformation was  
233 necessary to use the logarithmic function because of the presence of zeroes in the  
234 original variables. Paired comparisons of the means of each dependent variable  
235 (PO activity, proPO activity, lytic activity) were performed according to the model:  
236 strain, host challenge. The effect of the models was tested with a Wald Chi square  
237 test, with a significance threshold of 0.05, and a Bonferroni correction. Mean  $\pm$   
238 standard errors are reported.

239

## 240 **RESULTS**



241

242 **Virulence of *R. regina* according to doses**

243

244 The log-rank test did not show significant differences between infections with 1 or  
245 10 nematodes of *R. regina* infecting naturally *P. polyphylla* (**NS**;  $X^2 = 0.03$ ,  $df = 1$ ,  $p$   
246  $= 0.85$ ), but they differ in *T. molitor* ( $X^2 = 7.36$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0.007$ ) and *G. mellonella*  
247 ( $X^2 = 50.35$ ,  $df = 1$ ,  $p < 0.0001$ ) because a higher mortality was found with 10 than  
248 1 nematode. The **AS** strain did not revealed significant differences between  
249 infections with 1 or 10 nematodes against *P. polyphylla* ( $X^2 = 2.05$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0.15$ )  
250 or *T. molitor* ( $X^2 = 2.05$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0.15$ ), but 10 nematodes killed *G. mellonella* in  
251 fewer days than 1 nematode ( $X^2 = 22.93$ ,  $df = 1$ ,  $p < 0.0001$ ). Finally the strain **SS**  
252 did not showed differences between 1 or 10 nematodes against *P. polyphylla* ( $X^2 =$   
253  $0.91$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0.33$ ) nor *T. molitor* ( $X^2 = 1.92$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0.16$ ), but *G. mellonella*  
254 in fewer days with 10 nematodes than with only one ( $X^2 = 10.57$ ,  $df = 1$ ,  $p < 0.001$ ).  
255 Due to this result we only used infection with 10 nematodes in the experiments of  
256 immune response.

257

258 **Virulence of *R. regina* according to the host**

259

260 *Tenebrio molitor* did not show differences in survival compared with the Control not  
261 infected group infected with the *P. polyphylla* (natural strain; **NS**;  $X^2 = 0.00$ ,  $d.f. = 1$ ,  
262  $p = 0.99$ ), *G. mellonella* survived less than the Control group ( $X^2 = 19.594$ ,  $d.f. = 2$ ,  
263  $p < 0.01$ ) and *P. polyphylla* survived less than *G. mellonella* ( $X^2 = 50.35$ ,  $d.f. = 1$ ,  $p$

1  
2  
3 264 < 0.01; Figure 3A). This means that *P. polyphylla* was the more susceptible host  
4  
5 265 against the **NS** strain.  
6  
7  
8 266

9  
10 267 Taking into account the alternative nematode strain (**AS**), the control group  
11  
12 268 was more likely to survive than *P. polyphylla* infected with the strain bred on *T.*  
13  
14 269 *molitor* ( $X^2 = 43.323$ , d.f. = 2,  $p < 0.01$ ), followed by *G. mellonella* ( $X^2 = 36.275$ , d.f.  
15  
16  
17 270 = 1,  $p < 0.01$ ), and *T. molitor* was the more susceptible host ( $X^2 = 44.567$ , d.f. = 1,  
18  
19 271  $p < 0.01$ ; Figure 3B). This revealed that *T. molitor* was the more susceptible host  
20  
21 272 against the **AS** strain.  
22  
23  
24 273

25  
26 274 Finally, the strain from the beef medium (saprophytic strain; **SS**) did not kill  
27  
28 275 more *T. molitor* than the Control not infected group ( $X^2 = 1.000$ , d.f. = 1,  $p = 0.31$ ).  
29  
30 276 *P. polyphylla* survived less than the Control not infected group ( $X^2 = 64.65$ , d.f. = 1,  
31  
32  
33 277  $p < 0.01$ ) but more than *G. mellonella* ( $X^2 = 14.723$ , d.f. = 1,  $p < 0.01$ ; Figure 3C).  
34  
35 278 This suggests that *G. mellonella* was the more susceptible host against the **SS**  
36  
37 279 strain.  
38  
39  
40 280

## 41 281 **Immune response**

42 282

### 43 283 **proPO activity**

44 284

45  
46  
47 285 The proPO activity showed significant differences according to Strain ( $X^2 = 76.9$ ,  
48  
49 286 d.f. = 2,  $p = 0.001$ ), Host ( $X^2 = 19.16$ , d.f. = 3,  $p < 0.0001$ ) and the interaction  
50  
51 287 Strain\*Host ( $X^2 = 112.67$ , d.f. = 11,  $p < 0.001$ ). The proPO of *P. polyphylla* showed  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 288 no differences between the Control group (Figure 4A) and the groups **NS** ( $p = 0.9$ ),  
4  
5 289 **AS** ( $p = 0.9$ ) or **SS** ( $p = 0.9$ ). *T. molitor* did not show significant differences in  
6  
7 290 proPO between the Control group (Figure 4B) and the groups **NS** ( $p = 0.9$ ), **AS** ( $p$   
8  
9 = 0.16) or **SS** ( $p = 0.9$ ). Finally, *G. mellonella* did not show significant differences  
10 291  
11 between the Control group (Figure 4C) and the groups **NS** ( $p = 0.9$ ), **AS** ( $p = 0.35$ )  
12 292  
13 or **SS** ( $p = 0.9$ ). Table 1 shows a resume of the results of proPO.  
14 293  
15  
16  
17 294

### 19 295 **PO activity**

20  
21 296  
22  
23 297 The PO activity showed significant differences according to Strain ( $X^2 = 69.84$ , d.f.  
24 = 2,  $p < 0.0001$ ), Host ( $X^2 = 21.76$ , d.f. = 3,  $p < 0.0001$ ) and the interaction  
25 298  
26 Strain\*Host ( $X^2 = 114.28$ , d.f. = 11,  $p < 0.0001$ ). The PO of *P. polyphylla* showed no  
27 299  
28 differences between the Control group (Figure 5A) and the groups **NS** ( $p = 0.9$ ), **AS**  
29 300  
30 ( $p = 0.9$ ) and **SS** ( $p = 0.9$ ). Also, *T. molitor* did not show significant differences in  
31 301  
32 PO between the Control group and the groups **NS** ( $p = 0.9$ ) and **SS** ( $p = 0.9$ ).  
33 302  
34 However, the group infected with **AS** was significant different than Control group ( $p$   
35 303  
36  $< 0.01$ ; Figure 5B). Finally, *G. mellonella* did not show significant differences  
37 304  
38 between the Control group (Figure 5C) and the groups **NS** ( $p = 0.43$ ) and **SS** ( $p =$   
39 305  
40  $0.9$ ), but there were differences with the group **AS** ( $p < 0.03$ ). On the other hand,  
41 306  
42 the PO activity in the **AS** group was higher than the group **NS** ( $p < 0.02$ ). Table 1  
43 307  
44 shows a resume of the results of PO.  
45 308  
46  
47  
48  
49  
50  
51 309

### 54 310 **Lytic activity**

55  
56 311  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 312 The lytic activity showed significant differences according to the Strain ( $X^2 = 18.29$ ,  
4  
5 313 d.f. = 3,  $p = < 0.001$ ), Host ( $X^2 = 29.92$ , d.f. = 2,  $p = 0.0001$ ) and the interaction  
6  
7 314 Strain\*Host ( $X^2 = 58.75$ , d.f. = 11,  $p < 0.0001$ ). The lytic activity of *P. polyphylla*  
8  
9 315 showed no differences between the Control group (Figure 6A) and the groups **NS**  
10  
11 316 ( $p = 0.32$ ), **AS** ( $p = 0.11$ ) and **SS** ( $p = 0.9$ ). *T. molitor* did not show significant  
12  
13 317 differences in PO between the Control group and the groups **NS** ( $p = 0.9$ ), **AS** ( $p =$   
14  
15 318  $0.76$ ) and **SS** ( $p = 0.9$ ). However, the PO group **AS** was higher than in the group  
16  
17 319 **NS** ( $p < 0.01$ ; Figure 6B). Finally, *G. mellonella* did not show significant differences  
18  
19 320 between the Control (Figure 6C), **NS** ( $p = 0.9$ ), **AS** ( $p = 0.35$ ) and **SS** ( $p = 0.9$ )  
20  
21 321 groups. Table 1 shows a resume of the results of lytic activity.  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29 322

## 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60

323 **DISCUSSION**  
324  
325 The evolution of virulence was herein observed during a relatively short period of  
326 time (4 years) with homologous (similar host ambient) and heterologous (dissimilar  
327 host ambient) lines of infection. The greatest virulence was found with the  
328 homologous lines of infection, which were the NS strain against *P. polyphylla* and  
329 the AS strain against *T. molitor*. These combinations produced the most rapid  
330 death of the host, achieved by infection with a single nematode. Contrarily, the  
331 heterologous challenge required 10 nematodes to kill the host as rapidly as one  
332 nematode in the homologous line. Among the heterologous lines, in general, the  
333 greatest virulence was detected against the lepidopteran *G. mellonella*.

1  
2  
3 334  
4  
5

6 335 In this and earlier studies, *R. regina* has been shown to infect different hosts  
7  
8 336 and therefore is considered a generalist parasite.<sup>31, 32</sup> The lifestyle of generalist  
9  
10 337 parasites may imply evolutionary costs.<sup>19</sup> The current contribution demonstrated  
11  
12 338 that higher doses of parasites were required to kill new versus natural hosts, which  
13  
14 339 concurs with other reports.<sup>53,54</sup> Overall, the dose of infection and the survival of the  
15  
16 340 hosts in homologous and heterologous lines of infection give support to two  
17  
18 341 proposed concepts: the hosts belonging to the same taxonomic group as the  
19  
20 342 natural host are susceptible to the same parasites,<sup>55</sup> and the nature of such  
21  
22 343 susceptibility may likely limits the expansion of parasites to new hosts.<sup>19,56</sup> The  
23  
24 344 phylogenetic conservation of the characteristics associated with the exploitation of  
25  
26 345 the natural host and the retention of features formed by past pressures of natural  
27  
28 346 selection should maintain a latent capacity of the parasite to be successful under  
29  
30 347 new conditions if they are similar to those existing with its natural host.<sup>57</sup>  
31  
32 348 Consequently, only particular genotypes of parasites could successfully infect new  
33  
34 349 hosts, based on attributes that favor its survival and replication in a given time and  
35  
36 350 place.<sup>16</sup> Overall, these results support the hypothesis of short-term evolution of  
37  
38 351 virulence,<sup>11</sup> but at the same time demonstrate the limited scope of the phylogenetic  
39  
40 352 relation of hosts. That is, the Lepidoptera compared with Coleoptera died but after  
41  
42 353 a longer time and with a higher dose.  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51 354  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 355 For the strain bred in a saprophytic medium (**SS**), attenuated virulence was  
4  
5 356 found against *P. polyphylla* and *T. molitor*, perhaps due to the importance of live  
6  
7 357 hosts as the causal factor of selective pressure during the evolution of virulence.  
8  
9  
10 358 However, the greater virulence against *G. mellonella* exhibited by nematodes  
11  
12 359 cultivated in the saprophytic medium demonstrates the capacity of this  
13  
14 360 environment to modify some factor or factors of virulence that favor an attack on  
15  
16  
17 361 the host, which corresponds to the hypothesis of coincidental evolution of  
18  
19 362 virulence.<sup>16</sup> An evaluation was not presently made of the specific virulence factors  
20  
21 363 favored or attenuated. However, the greater virulence against *G. mellonella*  
22  
23 364 produced by the saprophytic environment was likely due to the incorporation or  
24  
25  
26 365 loss of bacteria used by *R. regina* for feeding, taking into account that the  
27  
28 366 microbiota of this and other nematode species changes in accordance with its  
29  
30 367 environment.<sup>32,38</sup> For example, the **SS** strain but not the **AS** strain is accompanied  
31  
32 368 by bacteria of the *Brevundimonas*, *Bordetella*, *Myroides*, *Enterococcus*, *Bacillus*,  
33  
34 369 *Clostridium*, *Actynomices*, and *Goronia* genera.<sup>32</sup> It would be interesting to identify  
35  
36 370 the bacteria that kill diverse hosts differentially, and to determine whether their  
37  
38 371 attack on the host is based on distinct mechanisms.  
39  
40  
41  
42  
43 372  
44  
45

46 373 Independently of the mechanisms of virulence, however, the current results  
47  
48 374 can justify both hypotheses of the evolution of virulence, depending on the medium  
49  
50 375 in which the parasite developed. To resolve the question presently under study,  
51  
52 376 therefore, the two hypotheses should be tested at the same time when examining  
53  
54 377 the evolution of virulence against new hosts. The study of the immune response,  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 378 on the other hand, gives insights into how hosts defend themselves against  
4  
5 379 infection and/or the strategies of the parasite for neutralizing these defenses. No  
6  
7 380 significant differences were herein detected in the immune status (proPO, PO and  
8  
9 381 lytic activity) of the infected versus uninfected (control) hosts. That is, the parasites  
10  
11 382 were able to avoid detection by the host immune system. One of the adaptations  
12  
13 383 by parasites used for this purpose is molecular mimicry,<sup>18,25</sup> a strategy apparently  
14  
15 384 generalized for *R. regina* because it was found with homologous and heterologous  
16  
17 385 challenges. Despite evidence of immune evasion, an increase was observed in the  
18  
19 386 level of PO against *T. molitor* and *G. mellonella* inoculated with the AS strain,  
20  
21 387 revealing the activation of the PO system.<sup>58</sup> *Culex pipiens* (Diptera) and  
22  
23 388 *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera) are reported to activate PO and  
24  
25 389 encapsulate *S. carpocapsae*.<sup>59,60</sup> Since PO is directed against the body of the  
26  
27 390 nematode to encapsulate it,<sup>22</sup> a change of host could have a cost for *R. regina* in  
28  
29 391 terms of molecular recognition. It is known that the immune response of insects  
30  
31 392 can vary between species of nematodes and even between strains of the same  
32  
33 393 species.<sup>17,61</sup> For instance, the level of PO increases in *G. mellonella* (Lepidoptera)  
34  
35 394 when infected with *H. bacteriophora*, but not when infected with *S. carpocapsae* or  
36  
37 395 *S. glaseri*.<sup>26</sup> Once again, the current findings validate both evasion and activation  
38  
39 396 of the host immune response, depending on the particular heterologous challenge  
40  
41 397 in the parasite-host system. Therefore, the present data are in agreement with the  
42  
43 398 report of two strains of *S. glaseri* that cause distinct immune responses in the same  
44  
45 399 host.<sup>62</sup> The mechanisms by which *R. regina* evades the activation of the immune  
46  
47 400 response was not herein examined. However, a focus on the role of the cuticle of  
48  
49 401 nematodes in immune evasion deserves examination in a future study, given the  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 402 key role of this component in the immune system of other species of  
4  
5 403 nematodes.<sup>21,22,63</sup> Interestingly, *R. regina* did not appear to lose its capacity of  
6  
7 404 immune evasion when confronting distinct microbiota, though the alternate niches  
8  
9  
10 405 certainly provide different resources, both in quality and quantity. Since a change  
11  
12 406 of hosts modifies the virulence factors of a parasite, there must be costs linked to  
13  
14 407 the corresponding adaptation involved. Such costs of virulence involved in  
15  
16  
17 408 coincidental and short-term evolution should be explored.  
18  
19  
20 409

21  
22  
23 410 Finally, the present results demonstrate that the cultivation of  
24  
25 411 entomopathogenic nematodes in the lab, whether *in vivo* or *in vitro*, can  
26  
27 412 substantially alter their virulence potential. *G. mellonella* is commonly used to  
28  
29 413 cultivate entomopathogenic nematodes of commercial importance.<sup>20</sup> According to  
30  
31 414 the current observations, the specificity of virulence may diminish the effectiveness  
32  
33 415 of these parasites in the control of some plagues. For example, the cultivation of  
34  
35 416 *Steinernema glaseri* in *G. mellonella* considerably reduces its virulence against  
36  
37 417 *Pupil japonica*, its natural host.<sup>62</sup> *In vitro* cultivation (in artificial medium lacking live  
38  
39 418 hosts), on the other hand, is herein shown to be a poor option for the massive  
40  
41 419 production of nematodes.<sup>41,64</sup> Indeed, it could lead to a significant decrease in  
42  
43 420 virulence and therefore inefficiency in the control of particular plagues. Thus, it is  
44  
45 421 crucial to analyze the virulence of entomopathogens from the point of view of the  
46  
47 422 evolution of virulence in order to be aware of the possible scenarios that limit or  
48  
49 423 favor the attack on the host.  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3 424  
4  
5

6 425 **Acknowledgements**  
7

8  
9 426

10  
11 427 Three anonymous reviewers substantially improved this paper. The study received  
12  
13 428 funding from PAPIIT (IA205318), UNAM. VTM received a grant from CONACyT  
14  
15 429 and TTML a grant from the Secretaría de Salud del Estado de Michoacán.  
16  
17

18 430

19  
20 431 **Conflict of Interest**  
21

22 432

23  
24 433 Authors declare no conflict of interest.  
25  
26

27 434

28  
29 435 **Data Availability**  
30

31 436

32  
33 437 Data will be available upon request.  
34  
35

36 438

37  
38 439 **Author Contributions**  
39

40 440

41  
42  
43 441 **VJTM** carry out experiments and analyze of data. **TTML** carry out experiments and  
44  
45 442 analyze of data. **JCG** directed the project. **VJTM**, **TTML** and **JCG** wrote the paper  
46  
47 443 and discussed the results.  
48  
49

50 444

51  
52 445 **References**  
53

54 446  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3 447 1. Schmid-Hempel P. Parasite immune evasion: a momentous molecular war.  
4  
5 448 *Trends Ecol Evol.* 2008; 23: 318-326.  
6  
7
- 8 449 2. Schmid-Hempel P. *Evolutionary Parasitology. The integrated study of*  
9  
10 450 *infections, immunology, ecology, and genetics.* Oxford and New York: Oxford  
11  
12 451 *University Press; 2011. 516 p.*  
13  
14
- 15 452 3. Schmid-Hempel P. Immune defense, parasite evasion strategies and their  
16  
17 453 *relevance for 'macroscopic phenomena' such as virulence. Philos Trans R Soc*  
18  
19 454 *Lond, B Biol Sci.* 2009; 364: 85-98.  
20  
21  
22
- 23 455 4. Creesler CE, McLeod DV, Rozins C, Van Den Hoogen J, Day T. The  
24  
25 456 *adaptive evolution of virulence: a review of theoretical predictions and empirical*  
26  
27 457 *tests. Parasitology.* 2016; 143: 915-930.  
28  
29
- 30 458 5. Anderson RM, May RM. Population biology of infectious diseases: Part I.  
31  
32 459 *Nature.* 1979; 280: 361-367.  
33  
34
- 35 460 6. Read AF. The evolution of virulence. *Trends Microbiol.* 1994; 2: 73-76.  
36  
37
- 38 461 7. Frank SA. Models of parasite virulence. *Q Rev Biol.* 1996; 71: 37-78.  
39  
40
- 41 462 8. Fenner F, Fantini B. *Biological Control of Vertebrate Pests: The History of*  
42  
43 463 *Mixomatosis, an Experiment in Evolution.* Wallingford: CABI Publishing; 1999. 352  
44  
45 464 *p.*  
46  
47
- 48 465 9. Read AF, Mackinnon MJ. Pathogen evolution in a vaccinated world. In:  
49  
50 466 *Stearns SC, ed. Evolution in Health and Disease. 2<sup>nd</sup> ed. USA: Oxford University*  
51  
52 467 *Press; 2008. p.139-152.*  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3 468 10. Müller V, Maggiolo F, Suter F, et al. Increasing clinical virulence in two  
4  
5 469 decades of the Italian HIV epidemic. *PLoS Pathog.* 2009; 5: e1000454.  
6  
7  
8 470 11. Levin BR, Bull JJ. Short-sighted evolution and the virulence of pathogenic  
9  
10 471 microorganisms. *Trends Microbiol.* 1994; 2: 76-81.  
11  
12  
13 472 12. Råberg L, Stjernman M. The evolutionary ecology of infectious disease  
14  
15 473 virulence. In: Demas GE, Nelson RJ, eds. *Ecoimmunology*. New York: Oxford  
16  
17 474 University Press; 2012. p. 548-578.  
18  
19  
20 475 13. Caraco T, Cizauskas CA, Wang I. Environmentally transmitted parasites:  
21  
22 476 Host-jumping in a heterogeneous environment. *J Theor Biol.* 2016; 397: 33-42.  
23  
24  
25 477 14. Creesler CE, McLeod DV, Rozins C, Van Den Hoogen J, Day T. The  
26  
27 478 adaptive evolution of virulence: a review of theoretical predictions and empirical  
28  
29 479 tests. *Parasitology.* 2016; 143: 915-930.  
30  
31  
32  
33 480 15. Woolhouse ME, Haydon T, Antia R. Emerging pathogens: the epidemiology  
34  
35 481 and evolution of species jumps. *Trends Ecol Evol.* 2005; 20: 238-244.  
36  
37  
38 482 16. Levin BR. The Evolution and Maintenance of Virulence in Microparasites.  
39  
40 483 *Emerg Infect Dis.* 1996; 2: 93-102.  
41  
42  
43 484 17. Rynkiewicz EC, Pedersen AB, Fenton A. An ecosystem approach to  
44  
45 485 understanding and managing within-host parasite community dynamics. *Trends*  
46  
47 486 *Parasitol.* 2015; 31: 212–221.  
48  
49  
50 487 18. Longdon B, Brockhurst MA, Russell CA, Welch JJ, Jiggins FM. The  
51  
52 488 evolution and genetics of virus host shifts. *PLoS Pathog.* 2014; 10: e1004395.  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3 489 19. Benmajor R, Hodgson DJ, Perron GG, Buckling A. Host Mixing and Disease  
4  
5 490 Emergence. *Curr Biol.* 2009; 19: 764-767.  
6  
7  
8 491 20. Gaugler R. *Entomopathogenic Nematology*. Wallingford: CABI Publishing,  
9  
10 492 2002.  
11  
12  
13 493 21. Blaxter ML, Page AP, Rudin W, Maizels RM. Nematode surface coats:  
14  
15 494 actively evading immunity. *Parasitol Toda.* 1992; 8: 243–247.  
16  
17  
18 495 22. Castillo JC, Reynolds SE, Eleftherianos L. Insect immune responses to  
19  
20 496 nematode parasites. *Trends Parasitol.* 2011; 27: 537-547.  
21  
22  
23 497 23. Vaux R, Schnoeller C, Berkachy R, et al. Modulation of the Immune  
24  
25 498 Response by Nematode Secreted Acetylcholinesterase Revealed by Heterologous  
26  
27 499 Expression in *Trypanosoma musculi*. *PLoS Pathog.* 2016; 12: e1005998.  
28  
29  
30  
31 500 24. Wang Y, Wu L, Liu X, et al. Characterization of a secreted cystatin of the  
32  
33 501 parasitic nematode *Haemonchus contortus* and its immune-modulatory effect on  
34  
35 502 goat monocytes. *Parasit Vectors.* 2017; 10: 425.  
36  
37  
38 503 25. Brivio MF, Mastore M, Nappi AJ. A pathogenic parasite interferes with  
39  
40 504 phagocytosis of insect immunocompetent cells. *Dev Comp Immunol.* 2010; 34:  
41  
42 505 991-998.  
43  
44  
45 506 26. Ebrahimi L, Niknam G, Dunphy GB. Hemocyte responses of the Colorado  
46  
47 507 potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, and the greater wax moth, *Galleria*  
48  
49 508 *mellonella*, to the entomopathogenic nematodes, *Steinernema feltiae* and  
50  
51 509 *Heterorhabditis bacteriophora*. *J Insect Sci.* 2011; 11: 75.  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3 510 27. Mastore M, Brivio MF. Cuticular surface lipids are responsible for disguise  
4  
5 511 properties of an entomoparasite against host cellular responses. *Dev Comp*  
6  
7 512 *Immunol.* 2008; 32: 1050-1062.  
8  
9  
10 513 28. Mastore M, Arizza V, Manachini B, Brivio M. Modulation of immune  
11  
12 514 responses of *Rhynchophorus ferrugineus* (Insecta: Coleoptera) induced by the  
13  
14 515 entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* (Nematoda: Rhabditida).  
15  
16 516 *Insect Sci.* 2015; 22: 748-760.  
17  
18  
19  
20 517 29. Söderhäll K, Cerenius L. Role of the prophenoloxidase-activating system in  
21  
22 518 invertebrate immunity. *Curr Opin Immunol.* 1998; 10: 23-28  
23  
24  
25 519 30. Cerenius L, Lee BL, Söderhäll K. The proPO-system: pros and cons for its  
26  
27 520 role in invertebrate immunity. *Trends Immunol.* 2008; 29: 263-271.  
28  
29  
30 521 31. Schulte F, Poinar GO. Description of *Rhabditis* (Rhabditoides) *regina* n. sp.  
31  
32 522 (Nematoda: Rhabditidae) from the body cavity of beetle larvae in Guatemala.  
33  
34 523 *Fundam Appl Nematol.* 1991; 14:151-156.  
35  
36  
37  
38 524 32. Jiménez-Cortés JG, Canales-Lazcano J, Lara-Reyes N, Rosenblueth M,  
39  
40 525 Martínez-Romero E, Contreras-Garduño J. Microbiota from *Rhabditis regina* may  
41  
42 526 alter nematode entomopathogenicity. *Parasitol Res.* 2016; 115: 4153-4165.  
43  
44  
45 527 33. Zhang C, Liu J, Xu M, et al. *Heterorhabditoides chongmingensis* gen. nov.,  
46  
47 528 sp. nov. (Rhabditida: Rhabditidae), a novel member of the entomopathogenic  
48  
49 529 nematodes. *J Invertebr Pathol.* 2008; 98:153–168.  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3 530 34. Park HW, Kim YO, Ha JS, et al. Effects of associated bacteria on the  
4  
5 531 pathogenicity and reproduction of the insect-parasitic nematode *Rhabditis blumi*  
6  
7 532 (Nematoda: Rhabditida). *Can J Microbiol.* 2011; 57: 750–758.  
8  
9  
10 533 35. Torres-Barragan A, Suazo A, Buhler WG, Cardoza YJ. Studies on the  
11  
12 534 entomopathogenicity and bacterial associates of the nematode *Oscheius*  
13  
14 535 *carolinensis*. *Biol Control.* 2011; 59: 123–129.  
15  
16  
17 536 36. Tambong JT. Phylogeny of bacteria isolated from *Rhabditis* sp. (Nematoda)  
18  
19 537 and identification of novel entomopathogenic *Serratia marcescens* strains. *Curr*  
20  
21 538 *Microbiol.* 2013; 66: 138–144.  
22  
23  
24 539 37. Stock SP. Diversity, biology and evolutionary relationships. In: Campos-  
25  
26 540 Herrera R, eds. *Nematode pathogenesis of insects and other pests*. Springer;  
27  
28 541 2015. p. 3-27.  
29  
30  
31 542 38. Li P, Dai C, Bao H, et al. A new species of *Pristionchus* (Rhabditida:  
32  
33 543 Diplogastridae) and its bacterial symbiont from Yixing, China. *J Nematol.* 2015; 47:  
34  
35 544 190–197.  
36  
37  
38 545 39. White GF. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures.  
39  
40 546 *Science.* 1927; 66: 302-303.  
41  
42  
43 547 40. The *C. elegans* Research Community. Dauer 2007.  
44  
45 548 [http://www.wormbook.org/chapters/www\\_dauer/dauer.html](http://www.wormbook.org/chapters/www_dauer/dauer.html). Accessed Sep 4, 2019.  
46  
47  
48 549 41. Shapiro-Ilan DI, Han R, Qiu X. Production of entomopathogenic nematodes.  
49  
50 550 In: Guadalupe Rojas M, Morales-Ramos, J, Shapiro-Ilan DI, eds. *Mass production*  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3 551 *of beneficial organisms: invertebrates and entomopathogens*. Academic Press.  
4  
5 552 2014. p. 321-356.  
6  
7  
8 553 42. Morales-Ramos JA, Kay S, Guadalupe-Rojas M, Shapiro-Ilan DI, Tedders  
9  
10 554 WL. Morphometric Analysis of Instar Variation in *Tenebrio molitor* (Coleoptera:  
11  
12 555 Tenebrionidae). *Ann Entomol Soc Am*. 2015; 108: 146-159.  
13  
14  
15 556 43. Márquez-García A, Canalez-Lazcano J, Rantala MJ, Contreras-Garduño J.  
16  
17 557 Is Juvenile Hormone a potential mechanism that underlay the "branched Y-  
18  
19 558 model"? *Gen Comp Endocrinol*. 2016; 1: 170-176.  
20  
21  
22  
23 559 44. Castro-Vargas C, Linares-López C, López-Torres A, et al. Methylation on  
24  
25 560 RNA: A Potential Mechanism Related to Immune Priming within But Not across  
26  
27 561 Generations. *Front Microbiol*. 2017; 8: 473  
28  
29  
30 562 45. Rahman A, Bharali P, Borah L, Bathari M, Taye RR. Post embryonic  
31  
32 563 development of *Galleria mellonella* L. and its management strategy. *J Entomol*  
33  
34 564 *Zool Stud*. 2017; 5: 1523-1526.  
35  
36  
37  
38 565 46. Krams I, Kecko S, Inashkina I, et al. Food quality affects the expression of  
39  
40 566 antimicrobial peptide genes upon simulated parasite attack in the larvae of greater  
41  
42 567 wax moth. *Entomo. Exp Appl*. 2017a; 165: 129-137.  
43  
44  
45 568 47. Krams IA, Kecko S, Jöers P, et al. Microbiome symbionts and diet diversity  
46  
47 569 incur costs on the immune system of insect larvae. *J Exp Biol*. 2017b; 220: 4204-  
48  
49 570 4212.  
50  
51  
52 571 48. Contreras-Garduño J, Lanz-Mendoza H, Córdoba-Aguilar A. The expression  
53  
54 572 of a sexually selected trait correlates with different immune defense components  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3 573 and survival in males of the American rubyspot. *J Insect Physiol.* 2007; 53: 612-  
4  
5 574 621.  
6  
7  
8 575 49. Ardia DR, Gantz JE, Schneider BC, Strebel S. Costs of immunity in insects:  
9  
10 576 an induced immune response increases metabolic rate and decreases  
11  
12 577 antimicrobial activity. *Funct Ecol.* 2012; 26: 732-739.  
13  
14  
15 578 50. Villanueva G, Lanz-Mendoza H, Hernández-Martínez S, et al. In the  
16  
17 579 monarch butterfly the juvenile hormone effect upon immune response depends on  
18  
19 580 the immune marker and is sex dependent. *Open J Ecol.* 2013; 3: 53-58.  
20  
21  
22  
23 581 51. Enríquez-Vara JN, Córdoba-Aguilar A, Guzmán-Franco AW, Alatorre-Rosas  
24  
25 582 R, Conteras-Garduño J. Is Survival After Pathogen Exposure Explained by Host's  
26  
27 583 Immune Strength? A Test with Two Species of White Grubs (Coleoptera:  
28  
29 584 Scarabaeidae) Exposed to Fungal Infection. *Ann Entomol Soc Am.* 2012; 41: 959-  
30  
31 585 965.  
32  
33  
34  
35 586 52. Enríquez-Vara JN, Conteras-Garduño J, Guzmán-Franco AW, Córdoba-  
36  
37 587 Aguilar A, Alatorre-Rosas R, González-Hernández H. Temporal variation in immune  
38  
39 588 components of the White grub *Phyllophaga polyphylla* (Bates) (Coleoptera:  
40  
41 589 Melolonthidae). *Neotrop Entomol.* 2014; 44: 466-473.  
42  
43  
44  
45 590 53. Regoes RR, Ebert D, Bonhoeffer S. Dose-dependent infection rates of  
46  
47 591 parasites produce the Allee effect in epidemiology. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.*  
48  
49 592 2002; 269: 271–279.  
50  
51  
52 593 54. Kinnula H, Mappes J, Valkonen JK, Sundberg LR. The Influence of Infective  
53  
54 594 Dose on the Virulence of a Generalist Pathogen in Rainbow Trout (*Oncorhynchus*  
55  
56  
57  
58  
59  
60



- 1  
2  
3 595 *mykiss*) and Zebra Fish (*Danio rerio*). *PLoS ONE*. 2015; 10:  
4  
5 596 e0139378.doi:10.1371/journal.pone.0139378.  
6  
7  
8 597 55. Longdon B, Hadfield JD, Webster CL, Obbard DJ, Jiggins FM. Host  
9  
10 598 phylogeny determines viral persistence and replication in novel hosts. *PLoS*  
11  
12 599 *Pathog*. 2011; 7: e1002260.  
13  
14  
15 600 56. Leggett, HC, Bucklibg A, Long GH, Boots M. Generalism and the evolution  
16  
17 601 of parasite virulence. *Trends Ecol. Evol.* 28: 592-596.  
18  
19  
20 602 57. Brooks DR, McLennan DA. The nature of diversity: an evolutionary voyage  
21  
22 603 of discovery. Chicago: University of Chicago Press; 2002.  
23  
24  
25 604 58. Laughton A, Siva-Jothy M. A standardised protocol for measuring  
26  
27 605 phenoloxidase and prophenoloxidase in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie*.  
28  
29 606 2012; 42: 140-149.  
30  
31  
32 607 59. Welch HE, Bronskill JF. Parasitism of mosquito larvae by the nematode,  
33  
34 608 DD136 (Nematoda: Neoaplectanidae). *Can J Zool.* 1962; 40: 1263-1268.  
35  
36  
37 609 60. Thurston GS, Yule WN, Dunphy GB. Explanations for the low susceptibility  
38  
39 610 of *Leptinotarsa decemlineata* to *Steinernema carpocapsae*. *Biol Control*. 1994; 4:  
40  
41 611 53-58.  
42  
43  
44 612 61. Eleftherianos I, Shokal U, Yadav S, Kenney E, Maldonado T. Insect  
45  
46 613 Immunity to Entomopathogenic Nematodes and their Mutualistic Bacteria. In:  
47  
48 614 French-Constant RH, ed. The Molecular Biology of Photorhabdus Bacteria. Current  
49  
50 615 Topics in Microbiology and Immunology, vol 402. Springer, Cham. p. 123-156.  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3 616 62. Li XY, Cowles RS, Cowles EA, Gaugler R, Cox-Foster DL. Relationship  
4  
5 617 between the successful infection by entomopathogenic nematodes and the host  
6  
7 618 immune response. *Int J Parasitol.* 2007; 37: 365–374.  
9  
10 619 63. Brivio MF, Mastore M, Pagani M. Parasite-host relationship: a lesson from a  
11  
12 620 professional killer. *Invertebrate Surviv J.* 2005; 2: 41-53.  
14  
15 621 64. Inman FL, Singh S, Holmes LD. Mass production of the beneficial nematode  
16  
17 622 *Heterorhabditis bacteriophora* and its bacterial symbiont *Photorhabdus*  
18  
19 623 *luminescens*. *Indian J Microbiol.* 2012; 52: 316-324.  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 624  
4  
5

6 625 **FIGURE LEGENDS**

7  
8 626  
9

10 627 **Fig. 1.** Flow chart of the experiment to assess survival for the short-sighted  
11  
12 628 evolution hypothesis (a) or the coincidental evolution hypothesis (b).  
13

14 629

15  
16  
17 630 **Fig. 2.** Flow chart of the experiment for the immune response of the hosts infected  
18  
19 631 with each strain of *R. regina* to assess both, short-sighted evolution and the  
20  
21 632 coincidental evolution hypotheses.  
22

23 633

24  
25  
26 634 **Fig. 3.** Survival (in days) of larvae of *Phyllophaga polyphylla*, *Tenebrio molitor* and  
27  
28 635 *Galleria mellonella* after exposure to 1 dauer larvae of *R. regina* of the Natural  
29  
30 636 Strain (**NS**; A), the Alternate Strain (**AS**; B) and the Saprophytic Strain (**SS**; C).  
31

32 637

33  
34  
35 638 **Fig. 4.** The proPO activity of the hosts after exposure to the three strains of *R.*  
36  
37 639 *regina*. A) *P. polyphylla* compared with Control ( $0.62 \times 10^{-5} \pm 2.85 \times 10^{-6}$ ), NS  
38  
39 640 ( $0.37 \times 10^{-5} \pm 7.10 \times 10^{-7}$ ), AS ( $9.37 \times 10^{-6} \pm 5.07 \times 10^{-6}$ ) and SS ( $5.84 \times 10^{-6} \pm 3.21 \times 10^{-6}$ ).  
40  
41 641 B) *T. molitor* compared with Control ( $3.84 \times 10^{-5} \pm 7.91 \times 10^{-6}$ ), NS ( $9.11 \times 10^{-5} \pm$   
42  
43 642  $2.26 \times 10^{-5}$ ), AS ( $1.16 \times 10^{-4} \pm 1.71 \times 10^{-5}$ ) and SS ( $5.62 \times 10^{-5} \pm 1.33 \times 10^{-5}$ ). C) *G.*  
44  
45 643 *mellonella* compared with Control ( $8.80 \times 10^{-5} \pm 2.10 \times 10^{-5}$ ), NS ( $1.54 \times 10^{-4} \pm 2.66 \times 10^{-$   
46  
47 644  $5$ ), AS ( $1.66 \times 10^{-4} \pm 3.68 \times 10^{-5}$ ) and SS ( $7.61 \times 10^{-5} \pm 1.70 \times 10^{-5}$ ).  
48  
49

50 645

51  
52  
53 646 **Fig. 5.** The PO activity of the hosts after exposure to the three strains of *R. regina*.

54  
55  
56 647 A) *P. polyphylla* compared with Control ( $8.82 \times 10^{-6} \pm 4.74 \times 10^{-6}$ ), NS ( $1.91 \times 10^{-6} \pm$   
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 648  $7.58 \times 10^{-7}$ ), AS ( $8.81 \times 10^{-6} \pm 6.54 \times 10^{-6}$ ) and SS ( $2.17 \times 10^{-6} \pm 1.06 \times 10^{-6}$ ). B) *T. molitor*  
4  
5 649 compared with Control ( $2.46 \times 10^{-6} \pm 8.71 \times 10^{-6}$ ), NS ( $1.02 \times 10^{-5} \pm 2.51 \times 10^{-5}$ ), AS  
6  
7 650 ( $1.12 \times 10^{-5} \pm 2.23 \times 10^{-5}$ ) and SS ( $7.68 \times 10^{-5} \pm 1.58 \times 10^{-5}$ ). C) *G. mellonella* compared  
8  
9 651 with Control ( $0.63 \times 10^{-4} \pm 1.19 \times 10^{-5}$ ), NS ( $1.34 \times 10^{-4} \pm 2.47 \times 10^{-5}$ ), AS ( $1.55 \times 10^{-4} \pm$   
10  
11 652  $2.32 \times 10^{-5}$ ) and SS ( $6.84 \times 10^{-5} \pm 1.42 \times 10^{-5}$ ).

12  
13  
14 653

15  
16  
17 654 **Fig. 6.** The lytic activity of the hosts after exposure to the three strains of *R. regina*.

18  
19 655 A) *P. polyphylla* compared with Control ( $-9.50 \times 10^{-6} \pm 1.31 \times 10^{-6}$ ), NS ( $-3.11 \times 10^{-6} \pm$

20  
21 656  $7.38 \times 10^{-7}$ ), AS ( $-2.53 \times 10^{-6} \pm 6.19 \times 10^{-7}$ ) and SS ( $-6.69 \times 10^{-6} \pm 8.78 \times 10^{-7}$ ). B) *T.*

22  
23 657 *molitor* compared with Control ( $-1.22 \times 10^{-5} \pm 2.08 \times 10^{-6}$ ), NS ( $-1.07 \times 10^{-5} \pm 2.67 \times 10^{-$

24  
25 658  $6$ ), AS ( $-6.26 \times 10^{-6} \pm 6.79 \times 10^{-7}$ ) and SS ( $-1.45 \times 10^{-5} \pm 3.04 \times 10^{-6}$ ). C) *G. mellonella*

26  
27 659 compared with Control ( $-7.11 \times 10^{-6} \pm 1.95 \times 10^{-6}$ ), NS ( $-5.43 \times 10^{-6} \pm 1.22 \times 10^{-6}$ ), AS ( $-$

28  
29 660  $4.27 \times 10^{-6} \pm 7.29 \times 10^{-7}$ ) and SS ( $-4.88 \times 10^{-6} \pm 1.38 \times 10^{-6}$ ).

30  
31  
32  
33 661

34  
35 662 **Table 1.** Immune response of the insect larvae after exposure to each strain of *R.*

36  
37 663 *regina* compared to the Control group without infection. NS = non-significant result

38  
39 664 (nematodes passed unnoticed by the immune response);  $\uparrow$  = increased compared

40  
41 665 with control.

42  
43  
44 666

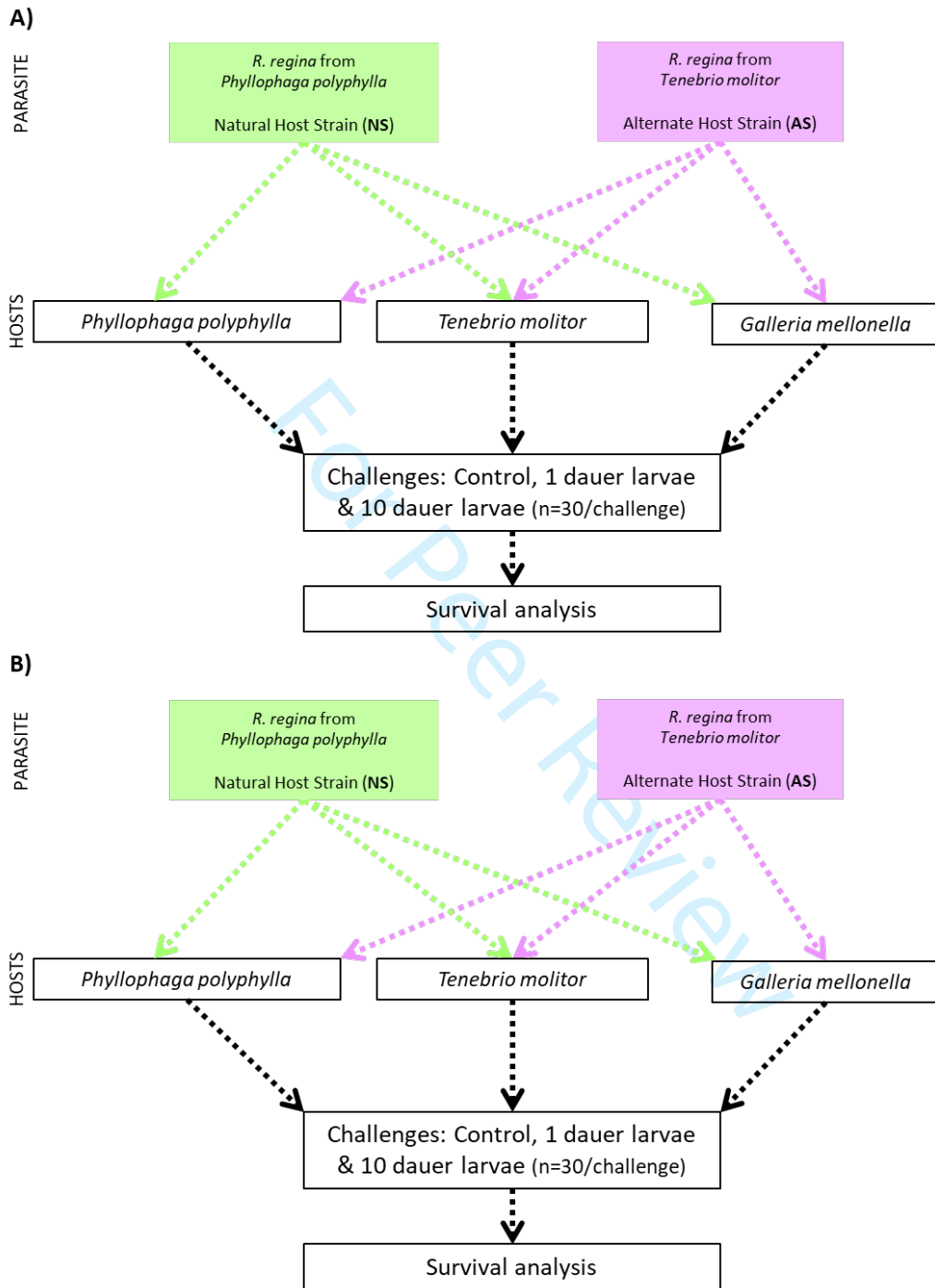
45  
46  
47 667

48  
49 668

50  
51 669



Fig. 1



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Fig. 2

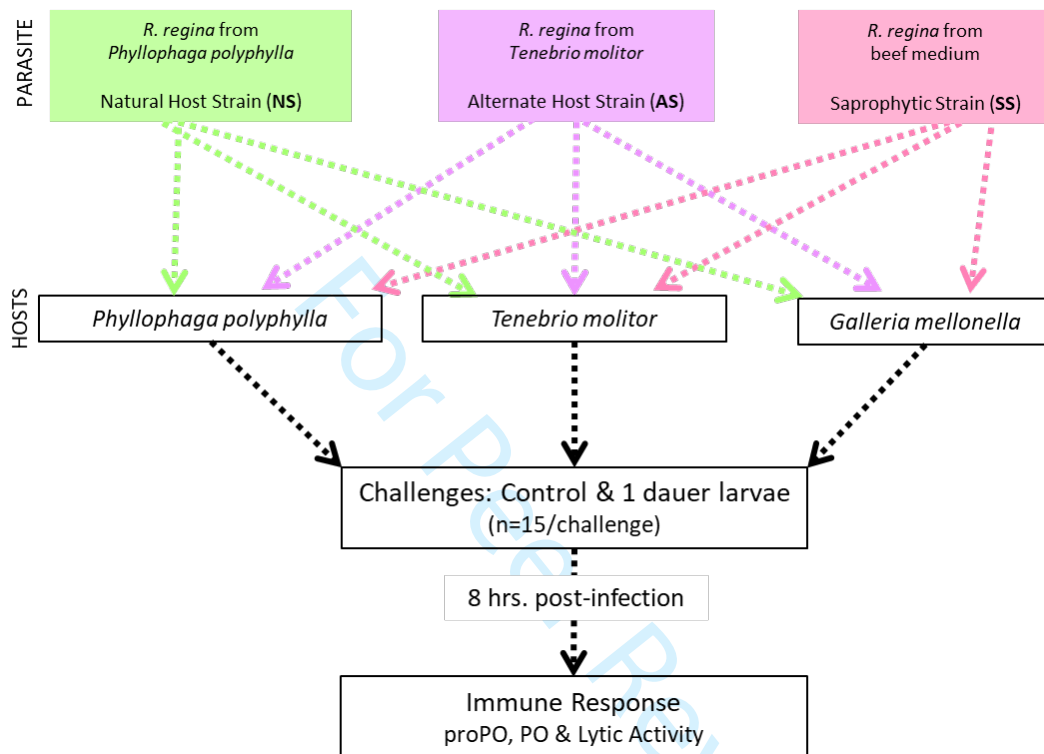
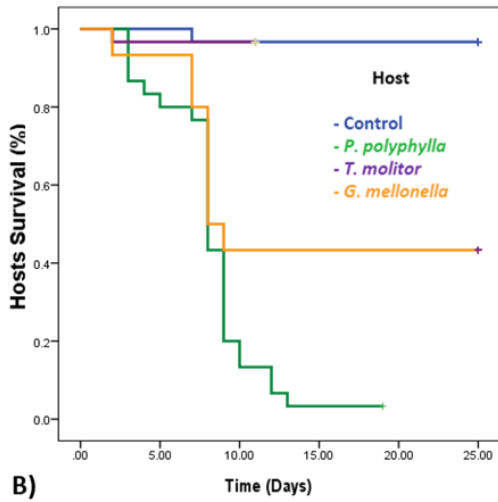
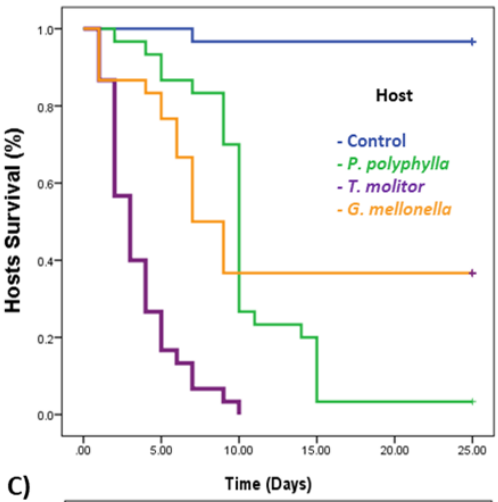


Fig. 3

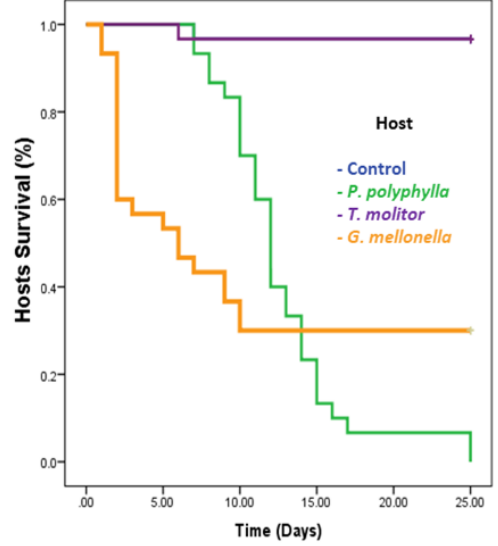
A)



B)



C)



Review

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



Fig. 4

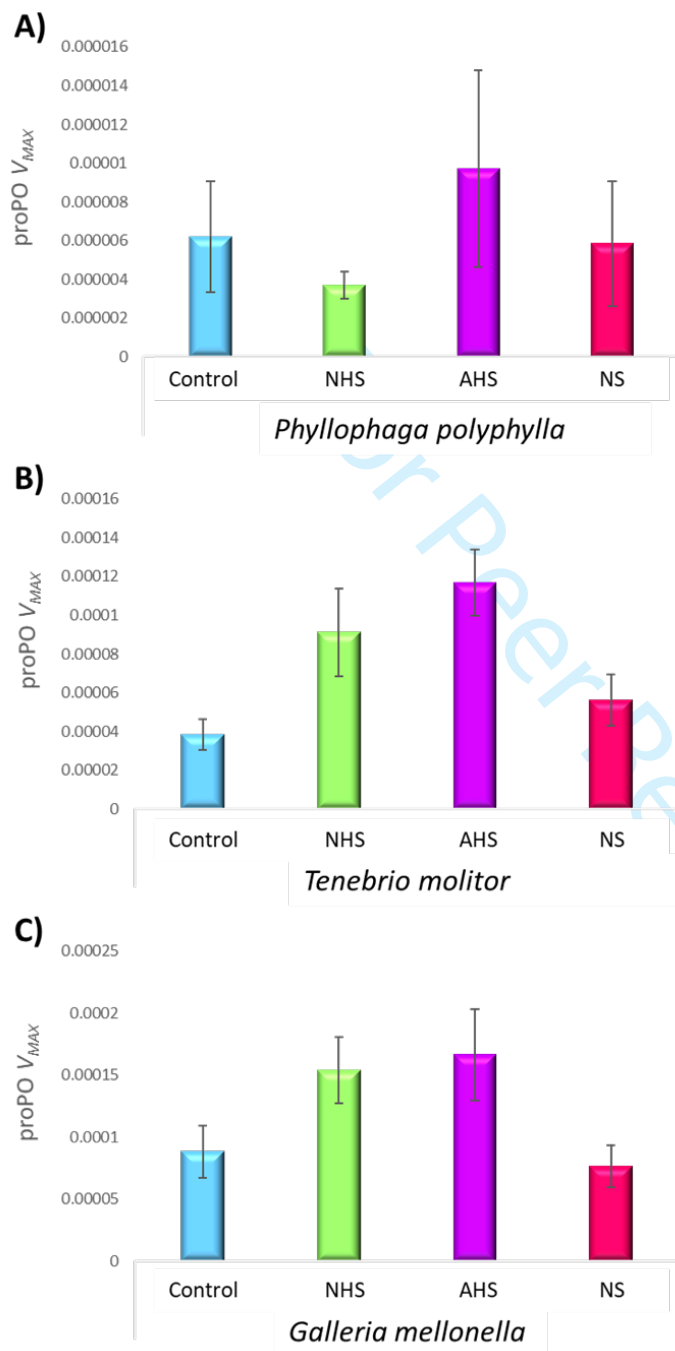


Fig. 5

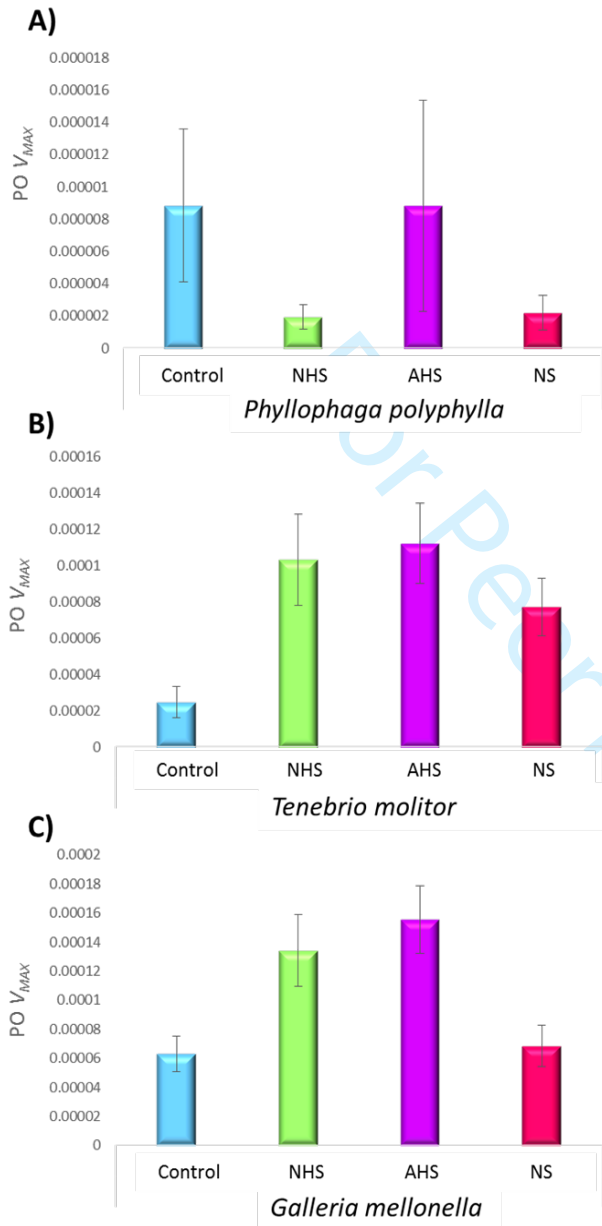
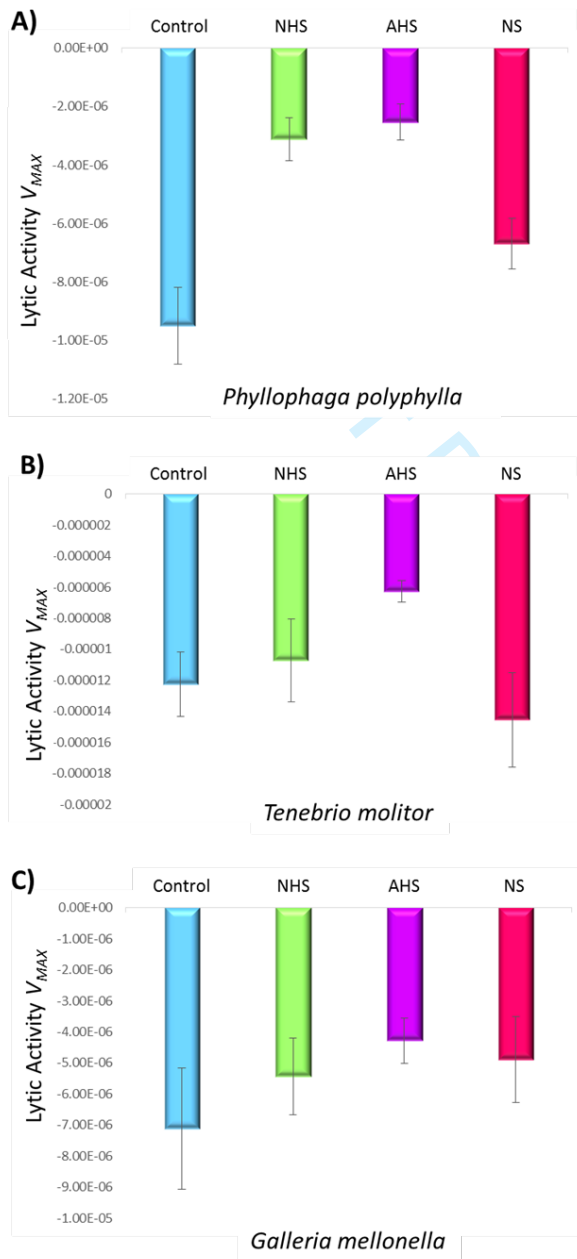


Fig. 6





Victor Trejo Meléndez <vitreme@gmail.com>

---

## Manuscript submitted - PIM-2019-0082

1 mensaje

---

**Ruth Eastwood** <onbehalf@manuscriptcentral.com>

4 de septiembre de 2019, 23:20

Responder a: PIMedoffice@wiley.com

Para: jcg@enesmorelia.unam.mx

Cc: vitreme@gmail.com, texca@hotmail.com, jcg@enesmorelia.unam.mx

Dear Dr Contreras Garduño

PIM-2019-0082 EVOLUTION OF VIRULENCE AND IMMUNE EVASION:  
SHORT-TERM OR COINCIDENTAL EVOLUTION?

Thank you for submitting your paper to Parasite Immunology. We will be contacting you as soon as we are able to make our decision.

Please quote the number above in any future correspondence.

Co-authors: Please contact the Editorial Office as soon as possible if you disagree with being listed as a co-author for this manuscript.

Yours sincerely

Ruth Eastwood  
Managing Editor

On behalf of Professor Eleanor Riley and Professor Richard Grenis, Editors

Get Content Alerts from Parasite Immunology:

1. Login or Register on Wiley Online Library: <http://dmmsclick.wileyurope.com/click.asp?p=20349283&m=85028&u=2247147>
2. Click on the 'Get New Content Alerts' in the top left corner of the Journal Homepage: [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1365-3024](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1365-3024)
3. Wait to receive e-alerts direct to your inbox

---

 \* **Authors-at-Wiley.pdf**  
1679K

## Discusión

Los resultados de los estudios en campo (Anexo 1) revelan la importancia de *R. regina* como enemigo natural de las poblaciones de *P. polyphylla*, siendo el parásito con mayor prevalencia en comparación con otros encontrados en el área, como la bacteria *Serratia marcescens* o el hongo *Beauveria* sp. Las diferencias en las prevalencias registradas en los dos años de colecta pueden deberse a la precipitación anual total en la zona de estudio como se ha visto en la prevalencia de nematodos del género *Heterorhabditis* o *Steinernema* (Risser et al., 2016). Debido a esto, pueden existir fluctuaciones en la humedad del suelo a largo plazo impactando a su vez las poblaciones naturales de nematodos y gallina ciega. Por otra parte, el éxito en la prevalencia de las especies de nematodos entomopatógenos en localidades particulares, son influenciadas por su afinidad hacia ciertos hospederos y su tolerancia a factores ambientales (Labaude & Griffin, 2018). En este sentido, la preferencia por ciertos hospederos, así como su disponibilidad juegan un papel importante en el éxito de los nematodos entomopatógenos (Mráček & Bečvář, 2000), y en este caso *P. polyphylla* abunda en la zona de estudio debido a los campos de cultivo de maíz, que es su principal alimento (Jiménez-Cortés et al., 2016). Por lo tanto, sería interesante saber si riegos periódicos en los campos de maíz, son mejores estrategias para disminuir las plagas de gallina ciega, en comparación con el uso de agroquímicos. Además, los resultados de campo sugieren que el uso de otros entomopatógenos que no sean nematodos podría ser insuficiente para controlar a la gallina ciega, ya que no encontramos evidencia de co-infección cuando los

escarabajos murieron por nematodo. Estas hipótesis garantizan investigación a futuro.

Con respecto al experimento para probar la hipótesis de evolución de la virulencia a corto plazo, se observó que las líneas homólogas de infección (infecciones con la misma especie de hospedero) de las cepas HN contra *P. polyphylla* y HA contra *T. molitor* fueron las más virulentas porque mataron muy rápido y un nematodo fue suficiente para matar a los hospederos en comparación con las líneas heterólogas (al enfrentar hospederos con los que no co-evolucionó). Sin embargo, en las infecciones heterólogas se requirieron más nematodos (10 nematodos) para matar más rápido al hospedero en comparación con las infecciones homólogas (1 nematodo), y en general, la virulencia fue más acentuada contra el lepidóptero *G. mellonella* (ver Anexo 1). De acuerdo con estudios previos y lo observado en este trabajo, *R. regina* se comporta como un entomopatógeno generalista porque infecta hospederos diferentes (Schulte & Poinar, 1991; Jiménez-Cortés et al., 2016) pero este estilo de vida de los parásitos generalistas puede tener costos evolutivos, expresando niveles menores de su virulencia en los hospederos nuevos que infecte (Benmayor et al., 2009). De esta manera, observamos que se requirieron dosis más altas para matar hospederos nuevos y esto concuerda con lo reportado para bacterias patógenas (Regoes et al., 2002; Kinnula et al., 2015). Cabe resaltar que en conjunto, la dosis de infección y supervivencia ante retos con líneas homólogas y heterólogas indican que los hospederos que pertenecen al mismo grupo taxonómico del hospedero natural no serán susceptibles a los mismos parásitos (Longdon et al., 2011) y esto podría limitar la infección del nematodo en

hospederos nuevos (Benmayor et al., 2009; Leggett et al., 2013). No obstante, la conservación filogenética de caracteres asociados a la explotación del hospedero natural, como la simbiosis de *R. regina* con bacterias entomopatógenas y la retención de caracteres formados a partir de presiones selectivas pasadas, mantendrían una capacidad latente del parásito de tener éxito bajo condiciones novedosas similares a las que se presenten en su hospedero natural (Brooks & McLennan, 2002). Desde este punto de vista, sólo genotipos particulares del parásito tendrían éxito al infectar hospederos nuevos, a partir de los atributos que favorecen su supervivencia y replicación en un momento y lugar dado (i.e. nuevo hospedero; Levin, 1996); así, las diferencias registradas en el nivel de virulencia entre los retos homólogos y heterólogos apoyan la hipótesis de la evolución de la virulencia a corto plazo (Levin & Bull, 1994).

Cabe destacar que, el vínculo coevolutivo natural de *R. regina* con *P. polyphylla* involucra fuerzas selectivas particulares que forjan el potencial virulento que el nematodo requiere para infectar a este hospedero y poder transmitirse (Longdon et al., 2015). Evidentemente, la virulencia que ha evolucionado en este sistema se mantiene en las poblaciones silvestres de *R. regina* (cepa HN) y ciertamente, es la razón de que esta cepa provocara una mortalidad elevada en *P. polyphylla*, mientras que en *T. molitor* y *G. mellonella* la virulencia fue significativamente menor. Esto, junto con los resultados de supervivencia de los tres hospederos refuerzan la idea del carácter especialista de la virulencia que se observa en *R. regina* silvestre (HN) contra *P. polyphylla*, su hospedero natural. De esta manera, *T. molitor* y *G. mellonella* pueden ser un

ambiente distinto para *R. regina* y en este sentido, las presiones selectivas particulares y los tipos de recursos que aportan puede influenciar su potencial virulento (Agosta et al., 2010).

Es importante mencionar que, la asociación de los parásitos con hospederos naturales impulsa la evolución de adaptaciones especializadas como: la evasión o manipulación del sistema inmune, la afinidad bioquímica con antígenos del hospedero (mimetismo molecular) o la explotación eficiente de recursos del hospedero (Longdon et al., 2015); no obstante, la infección en hospederos nuevos con los que no ha existido una historia coevolutiva previa podría implicar que la patogenicidad y la susceptibilidad del hospedero no están limitados por fuerzas evolutivas, lo que puede conducir a respuestas virulentas severas o atenuadas, resultando inadecuadas tanto para el parásito como para el hospedero (Woolhouse et al., 2002; Longdon et al., 2015).

La cepa proveniente del hospedero alterno (HA) representó un evento de cambio del hospedero ancestral a uno nuevo (*T. molitor*). Los análisis de supervivencia revelaron un cambio significativo en la virulencia de *R. regina* al probarse con su hospedero natural y su aumento en contra de *T. molitor*, su “hospedero actual”. El éxito de un parásito en la colonización e infección de hospederos alternos o novedosos es posible a través de la exaptación de sus factores de virulencia, así como de sus estrategias para contrarrestar el sistema inmune del hospedero (Agosta et al., 2010). Así, los hospederos nuevos podrían compartir características importantes con los hospederos naturales o actuales y



los recursos que estos poseen pueden ser idénticos o intercambiables para los parásitos, siendo estos variables cuantitativamente de un hospedero a otro (Nyman, 2009).

De acuerdo con la literatura, la virulencia que puede expresar un parásito en las nuevas interacciones iniciará por la adaptación ecológica de sus atributos biológicos, respondiendo a las fuerzas selectivas presentes y posteriormente, estas adaptaciones se fijarán en la población por procesos evolutivos si el parásito continúa enfrentándose al hospedero nuevo (Singer et al., 2008; Thompson et al., 2004). De este modo, es probable que cuando *R. regina* se establece en un hospedero alternativo, ya sea a corto plazo o largo plazo, cambiará su virulencia, provocando una alta mortalidad en los hospederos con los que ha evolucionado y contrariamente se presentarán niveles bajos de virulencia sobre los hospederos con los que no ha evolucionado. Lo anterior, podría explicar las diferencias en la supervivencia de los hospederos infectados con las cepas HN y HA. Dicho esto, podemos suponer que la cepa HN expresa factores genéticos que se relacionan con su virulencia sobre *P. polyphylla* y que estos se modificaron al evolucionar contra *T. molitor*. Así, los resultados con la cepa HN y HA (tanto de retos homólogos y heterólogos) sugieren que la virulencia del nematodo se reducirá al infectar hospederos con los que no ha tenido alguna historia evolutiva previa y más interesante es, que esto implica un costo sobre los niveles óptimos de virulencia que el nematodo puede expresar (Longdon et al., 2015). Por otra parte, si el nematodo evoluciona en un hospedero alternativo similar al original, perderá su potencial virulento que expresaba en su hospedero

original, probablemente como producto de un cambio genotípico en la población parásita (Levin & Bull, 1994).

La cepa mantenida en un medio saprófito (S) mostró una virulencia atenuada contra *P. polyphylla* y *T. molitor*, lo que podría deberse a la importancia de los hospederos vivos como presión selectiva en la evolución de la virulencia (Rynkiewicz et al., 2015). Sin embargo, la susceptibilidad de *G. mellonella* contra esta cepa indica que el desarrollo del nematodo en estas condiciones modificó algún factor de virulencia que favoreció el potencial virulento contra el lepidóptero, y esto corresponde con la hipótesis de la evolución coincidente de la virulencia (Levin, 1996). Aunque no registramos qué factores de virulencia se favorecieron en este medio, proponemos que esto se debe a la incorporación o pérdida de las bacterias de las que se alimenta *R. regina*, porque la microbiota de este nematodo cambia de acuerdo con el medio en el que se desarrolla (Jiménez-Cortés et al., 2016) y este cambio de bacterias también se ha registrado que ocurre en nematodos del género *Pristionchus* (Li et al., 2015). Por ejemplo, la cepa S de *R. regina* presenta bacterias del género *Brevundimonas*, *Bordetella*, *Myroides*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Actynomices*, y *Gordonia*, que no se encuentran en la cepa HA (Jiménez-Cortés et al., 2016). Sería interesante saber cuál o cuáles bacterias matan de manera diferencial a los distintos hospederos y si esto se debe a un ataque diferencial de las bacterias en el hospedero. No obstante, independientemente del mecanismo de virulencia, los ensayos de infección con las tres cepas de *R. regina* indican que su virulencia es lábil y que evolucionará dependiendo del ambiente donde se desarrolle (i.e. hospedero alterno o condiciones saprófitas) y más importante aún, que las hipótesis de evolución de la virulencia no son excluyentes entre sí, por lo que

podrían en conjunto explicarnos como puede evolucionar la virulencia de este parásito. Ciertamente, un medio atípico carente de respuesta inmune (saprófito) o un hospedero alternativo, presentan agentes de selección específicos en forma de factores bióticos y/o abióticos como la expresión de PAMPS (patrones moleculares asociados a patógenos) específicos y su reconocimiento por el sistema inmune del hospedero nuevo, o la presencia y adquisición de bacterias nuevas; estos factores en conjunto pueden influenciar la virulencia de *R. regina*, correspondiendo a la hipótesis de la evolución coincidente de la virulencia (Levin, 1996). Tomando en cuenta los resultados para ambas hipótesis, proponemos poner a prueba distintas hipótesis al mismo tiempo al momento de analizar la evolución de virulencia contra nuevos hospederos.

Para entender mejor la virulencia y los procesos infectivos de *R. regina* en los hospederos evaluamos la respuesta inmune de éstos, pues esta información da pistas de cómo reaccionan los hospederos ante la infección y al mismo tiempo, de las estrategias del parásito para neutralizar las defensas del sistema inmune. En nuestro trabajo, no encontramos diferencias significativas en la respuesta inmune (proPO, PO y actividad lítica) entre los grupos infectados con respecto al grupo Control sin infección. Se ha reportado que esta es una de las adaptaciones contra los hospederos naturales, en donde el parásito ejerce un mimetismo molecular y el resultado es que no se activa la respuesta inmune (Brivio et al., 2010; Longdon et al., 2014). Esta estrategia de mimetismo molecular o evasión de la respuesta inmunitaria parece ser general de *R. regina* porque se presentó en retos homólogos y heterólogos. No obstante, también registramos un aumento en los niveles de PO contra *T. molitor* y *G. mellonella*

inoculados con la cepa HA, lo que indica la activación del sistema PO (Laughton & Siva-Jothy, 2011). De acuerdo con esto, en los insectos *Culex pipiens* (Diptera) y *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera), la PO se activa al ser infectados con *S. carpocapsae* encapsulándolo (Welch & Bronskill, 1962; Thurston et al., 1992) pero nuestros resultados muestran que, ante un cambio de hospedero, *R. regina* podría tener un costo en términos de reconocimiento molecular, ya que la PO va dirigida contra el cuerpo del nematodo para encapsularlo (Castillo et al., 2011). Se sabe que la respuesta inmunitaria de los insectos puede variar con la especie de nematodos e incluso entre cepas de la misma especie (Rynkiewicz et al., 2015; Eleftherianos et al., 2016). Por ejemplo, en *G. mellonella* (Lepidoptera) se ha visto un aumento en los niveles de PO al ser infectado con *H. bacteriophora* pero no hay aumento contra *S. carpocapsae* y *S. glaseri*, todas especies de nematodos entomopatógenos (Ebrahimi et al., 2011); nuevamente, nuestro trabajo muestra evasión y activación de la respuesta inmunitaria ante el cambio de hospedero en el mismo sistema parásito-hospedero y concuerda con que dos cepas de *S. glaseri* provocan respuestas inmunitarias diferentes en el mismo hospedero (Li et al., 2007). Aunque en *R. regina* no determinamos el mecanismo mediante el cual el parásito evade la activación de la respuesta inmune, un futuro trabajo debería analizar el papel de la cutícula de los nematodos en dicha evasión, pues es un carácter importante en otras especies de nematodos (Blaxter et al., 1992; Brivio et al., 2005; Castillo et al., 2011). Proponemos investigar los costos de la evolución de la virulencia por evolución coincidente y por evolución a corto plazo porque el cambio de hospederos modifica los factores de virulencia del parásito y en este caso, *R. regina* no parece cambiar su propiedad inmuno-evasiva aunque cambia la microbiota. Dado que los nichos

alternos deben proveer recursos diferentes tanto en calidad como cantidad, deben existir costos vinculados a su adecuación e incluso en sus factores de virulencia.

Por último, los resultados advierten que el cultivo de nematodos entomopatógenos en laboratorio puede alterar de manera considerable su potencial virulento, tanto en cultivos *in vivo* como *in vitro*. Comúnmente, se utiliza a *G. mellonella* para cultivar a los nematodos entomopatógenos de importancia comercial (Gaugler & Han, 2002) y de acuerdo con lo observado en este trabajo, la especificidad de la virulencia puede limitar el uso de estos parásitos en el control de plagas específicas. Li et al. (2007) reportó que el cultivo de *Steinernema glaseri* en *G. mellonella* redujo considerablemente su virulencia en contra de *Popillia japonica*, su hospedero natural. Asimismo, el cultivo *in vitro* (medios artificiales, carentes de hospederos vivos) lejos de ser una excelente opción para la producción masiva de nematodos (Inman et al., 2012; Saphirolan et al., 2014) podrían resultar en una reducción importante de la virulencia y por ende la ineficiencia en el control de plagas particulares.

## Conclusiones

El nematodo *R. regina* representa un enemigo natural importante en la población de *P. phyllophaga* de la localidad estudiada, lo que se refleja en su prevalencia alta en comparación con otros parásitos presentes en el área estudio. Las fluctuaciones en su prevalencia pueden deberse a factores abióticos como la precipitación media anual de la zona y a factores bióticos como la disponibilidad de hospederos y probabilidad de infección.

La virulencia de *R. regina* evolucionó de acuerdo con el medio en el que se desarrolló. Los resultados sugieren que las hipótesis referentes a la evolución de la virulencia no son excluyentes entre si, porque cada una comprende aspectos biológicos relevantes del parásito. Las infecciones con retos heterólogos apoyan la hipótesis de la evolución a corto plazo y muestran la adaptación del parásito al infectar hospederos alternos y por otro lado, las diferencias observadas en la virulencia de las tres cepas del nematodo apoyan la hipótesis de la evolución coincidente pues indican que cada medio expresa presiones selectivas diferentes que repercuten en el potencial virulento del parásito. Asimismo, la microbiota representa un factor de virulencia importante que puede cambiar en función del ambiente en el que evoluciona el nematodo (hospederos alternos o medios saprófitos). Por último, la respuesta inmunitaria de los hospederos infectados con cada cepa indica que el nematodo despliega una estrategia de inmuno-evasión que le permite contrarrestar los efectos negativos que le puede provocar la respuesta inmune, misma que se mantiene en las tres cepas.

## Referencias

- Adamo, S. A. 2004. How should behavioural ecologists interpret measurements of immunity?. *Animal Behaviour*. 6:1443-1449.
- Adams, B. J. & Nguyen, K. B. 2002. Taxonomy and Systematics. *En: Gaugler, R. (Ed.) Entomopathogenic Nematology*. pp 1-34. CAB International Publishing. London. UK.
- Adiba S., Nizak, C., Van-Baalen, M., Denamur, E. & Depaulis, F. 2010. From grazing resistance to pathogenesis: the coincidental evolution of virulence factors. *PLoS One*. 5: e11882.
- Agosta, S. J., Janz, N. & Brooks, D. R. 2010. How specialists can be generalists: resolving the “parasite paradox” and implications for emerging infectious disease. *Zoologia*. 27: 151-162.
- Alizon, S., Hurford, A., Mideo, N. & Van Baalen, M. 2009. Virulence evolution and the trade-off hypothesis: history, current state of affairs and the future. *Journal of Evolutionary Biology*. 22: 245-259.
- Benmayor, R., Hodgson, D. J., Perron, G. G. & Buckling, A. 2009. Host mixing and disease emergence. *Current Biology*. 19: 764-767.

- Binda-Rossetti, S., Mastore, M., Protasoni, M. & Brivio, M. F. 2016. Effects of an entomopathogen nematode on the immune response of the insect pest red palm weevil: Focus on the host antimicrobial response. *Journal of Invertebrate Pathology*. 133: 110-119.
- Blaxter, M. & Koutsovoulos, G. 2014. The evolution of parasitism in Nematoda. *Parasitology*. 142: S26-S39.
- Brivio, M. F., Pagani, M. & Restelli, S. 2002. Immune suppression of *Galleria mellonella* (Insecta, Lepidoptera) humoral defenses induced by *Steinernema feltiae* (Nematoda, Rhabditida): involvement of the parasite cuticle. *Experimental Parasitology*. 101: 149-156.
- Brivio, M. F., Mastore, M. & Moro, M. 2004. The role of *Steinernema feltiae* body-surface lipids in host–parasite immunological interactions. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 135: 111-121.
- Brivio, M. F., Moro, M. & Mastore, M. 2006. Down-regulation of antibacterial peptide synthesis in an insect model induced by the body-surface of an entomoparasite (*Steinernema feltiae*). *Developmental & Comparative Immunology*. 30: 627-638.



- Brivio, M. F., Mastore, M. & Nappi, A. J. 2010. A pathogenic parasite interferes with phagocytosis of insect immunocompetent cells. *Developmental and Comparative Immunology*. 34: 991-998.
- Brooks, D. R. & McLennan, D. A. 2002. *The nature of diversity: an evolutionary voyage of discovery*. University of Chicago Press. Chicago, IL.
- Bull, J. J. 1994. Virulence. *Evolution*. 48: 1423-1437.
- Castillo, J. C., Reynolds, S. E. & Eleftherianos, I. 2011. Insect immune responses to nematode parasites. *Trends in Parasitology*. 27: 537–547.
- Cerenius, L. & Söderhäll, K. 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews*. 198: 116-126.
- Chen, J., Moore, W. H., Yuen, G. Y., Kobayashi, D. & Caswell-Chen, E. P. 2006. Influence of *Lysobacter enzymogenes* Strain C3 on Nematodes. *Journal of Nematology*. 38: 233-239.
- Crook, M. 2013. The dauer hypothesis and the evolution of parasitism: 20 years on and still going strong. *International Journal of Parasitology*. 44: 1-8.

- Cooper, D. & Eleftherianos, I. 2016. Parasitic nematode immunomodulatory strategies: recent advances and perspectives. *Pathogens*. 5: 58.
- Davis, M. M. & Engström, Y. 2012. Immune response in the barrier epithelia: lessons from the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Journal of innate immunity*. 4: 273-283.
- Day, T. & Burns, J. G. 2003. A consideration of patterns of virulence arising from host-parasite coevolution. *Evolution*. 57: 671-676.
- Dieterich, C. & Sommer, R. J. 2009. How to become a parasite – lessons from the genomes of nematodes. *Trends in Genetics*. 25: 203–209.
- Dillman, A. R. & Sternberg, P. W. 2012. Entomopathogenic nematodes. *Current Biology*. 22: R430–R431.
- Dillman, A. R., Chaston, J. M., Adams, B. J., Ciche, T. A., Goodrich-Blair, H., Stock, S. P. & Sternberg, P. W. 2012. An entomopathogenic nematode by any other name. *PLoS Pathogens*. 8: 1-4. e1002527.
- Ebert, D. & Hamilton, W. D. 1996. Sex against virulence: the coevolution of parasitic diseases. *Trends in Ecology & Evolution*. 11: 79-82.

- Ebrahimi, L., Niknam, G. & Dunphy, G. B. 2011. Hemocyte responses of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, and the greater wax moth, *Galleria mellonella*, to the entomopathogenic nematodes, *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis bacteriophora*. *Journal of Insect Science*. 11:75. available online: [insectscience.org/11.75](http://insectscience.org/11.75).
- Eleftherianos, I., Joyce, S., French-Constant, R. H., Clarke, D. J. & Reynolds, S. E. 2010. Probing the tri-trophic interaction between insects, nematodes and *Photorhabdus*. *Parasitology*. 137: 1695-1706.
- Eleftherianos, I., Shokal, U., Yadav, S., Kenney, E. & Maldonado, T. 2016. Insect Immunity to Entomopathogenic Nematodes and their Mutualistic Bacteria. *En: French-Constant R. (Eds.) The Molecular Biology of Photorhabdus Bacteria*. Current Topics in Microbiology and Immunology, vol 402. Springer, Cham.
- Enríquez-Vara, J. N., Conteras-Garduño, J., Guzmán-Franco, A. W., Córdoba-Aguilar, A., Alatorre-Rosas, R. & González-Hernández, H. 2015. Temporal variation in immune components of the White grub *Phyllophaga polyphylla* (Bates) (Coleoptera: Melolonthidae). *Neotropical Entomology*. 44: 466-473.
- Forst, S. & Clarke, D.J. 2002. Bacteria–nematode symbiosis. *En: Gaugler, R. (Ed.) Entomopathogenic Nematology*. pp 57-78. CABI. New York.

- Gaugler, R. & Han, R. 2002. Production Technology. *En: Gaugler, R. (Ed.) Entomopathogenic Nematology*. pp 293-294. CABI. New York.
- González-Santoyo, I. & Córdoba-Aguilar, A. 2011. Phenoloxidase: a key component of the insect immune system. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 142: 1–16.
- Gillespie, J. P., Kanost, M. R. & Trenczek, T. 1997. Biological mediators of insect immunity. *Annual review of entomology*. 42: 611-643.
- Hahn, B. H., Shaw, G. M., De, K. M. & Sharp, P. M. 2000. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science*. 287: 607-614.
- Heckly, R. J. & Blank, H. 1980. Virulence and viability of *Yersinia pestis* 25 years after lyophilization. *Applied and Environmental Microbiology*. 39: 541-543.
- Hu, P. J. 2007. Dauer. *En: WormBook: the online review of C. elegans biology*. pp 1-19.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI]. 2009. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Jerécuaro, Guanajuato Clave geoestadística 11019. Recuperado de: [http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos\\_geograficos/11/11019.pdf](http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/11/11019.pdf).

- Inman, F. L., Singh, S. & Holmes, L. D. 2012. Mass production of the beneficial nematode *Heterorhabditis bacteriophora* and its bacterial symbiont *Photobacterium luminescens*. *Indian journal of microbiology*. 52: 316-324.
- Jarosz, J. 1998. Active resistance of entomophagous Rhabditid *Heterorhabditis bacteriophora* to insect immunity. *Parasitology*. 117: 201-208.
- Kaper, J. B. & O'Brien, A. D. 1998. *Escherichia coli* 0157: H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. ASM Press.
- King, A. B. S. 1984. Biology and identification of White grubs (*Phyllophaga*) of economical importance in Central America. *Tropical Pest Management*. 30: 36-50.
- Kinnula, H., Mappes, J., Valkonen, J. K., & Sundberg, L. R. 2015. The influence of infective dose on the virulence of a generalist pathogen in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and zebra fish (*Danio rerio*). *PLoS one*, 10. e0139378.
- Labaude, S., & Griffin, C. 2018. Transmission success of entomopathogenic nematodes used in pest control. *Insects*, 9: 72.

- Lamshead, P. J. D. 1993. Recent developments in marine benthic biodiversity research. *Oceanis* 19. 5–24.
- Landureau, J. C. & Jollès, P. 1970. Lytic Enzyme produced *in vitro* by Insect Cells: Lysozyme or Chitinase?. *Nature*. 225: 968-969.
- Lara-Reyes, N. G. 2016. Relación parásito hospedero entre *Rhabditis* (Rhabditoides) *regina* y *Galleria mellonella*. Tesis de Licenciatura. Universidad de Guanajuato. División de Ciencias Naturales y Exactas. México.
- Laughton, A., Siva-Jothy, M. 2011. A standardised protocol for measuring phenoloxidase and prophenoloxidase in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie*. 42: 140-149.
- Levin, B. R. & Svanborg Edén, C. 1990. Selection and evolution of virulence in bacteria: an ecumenical excursion and modest suggestion. *Parasitology*. 100: S103-S115.
- Lewis, E. E., Hazir, S., Hodson, A. & Gulcu, B., 2015. Trophic Relationships of Entomopathogenic Nematodes in Agricultural Habitats. *En: Campos-Herrera, R. (Ed.). Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests*. Series: Sustainability in Plant and Crop Protection (Ciancio, A. Series Ed.). pp 139-164. Springer International Publishing, Switzerland.

- Li, X. Y., Cowles, R. S., Cowles, E. A., Gaugler, R., Cox-Foster, D. L., 2007. Relationship between the successful infection by entomopathogenic nematodes and the host immune response. *International Journal of Parasitology*. 37: 365–374.
- Li, P., Dai, C., Bao, H., Chen, L., Gao, D., Wang, G., Wang, J., Wang, H., Yedid, G. & Zhang, K. 2015. A new species of *Pristionchus* (Rhabditida: Diplogastridae) and its bacterial symbiont from Yixing, China. *Journal of Nematology*. 47: 190–197.
- Longdon, B., Hadfield, J. D., Webster, C. L., Obbard, D. J. & Jiggins, F. M. 2011. Host Phylogeny Determines Viral Persistence and Replication in Novel Hosts. *PLOS Pathogens*. 7: e1002260. doi:10.1371/journal.ppat.1002260.
- Longdon, B., Hadfield, J. D., Day, J. P., Smith, S. C. L., McGonigle, J. E., Cogni, R., Cao, C. & Jiggins, F. M. 2015. The Causes and Consequences of Changes in Virulence following Pathogen Host Shifts. *PLOS Pathogens*. 11: e1004728. doi:10.1371/journal.ppat.1004728.
- Lu, D., Sepulveda, C. & Dillman, A. R. 2017. Infective juveniles of the entomopathogenic nematode *Steinernema scapterisci* are preferentially activated by cricket tissue. *PloS One*. 12: e0169410.

- Machado, I. R., Ribeiro, L. P. & Dolinski, C. 2015. Spiracles as attraction source and entrance for entomopathogenic nematode species in *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) engorged females. *Nematoda*. 2: e052015.
- Marín-Jarillo, A. & Bujanos-Muñiz, R. 2007. Especies del complejo “Gallina ciega” del género *Phyllophaga* en Guanajuato, México. *Agricultura Técnica en México*. 34: 349-355.
- Mastore, M. & Brivio, M. F. 2008. Cuticular surface lipids are responsible for disguise properties of an entomoparasite against host cellular responses. *Developmental and Comparative Immunology*. 32: 1050-1062.
- Mastore, M., Arizza, V., Manachini, B. & Brivio, M. F. 2015. Modulation of immune responses of *Rhynchophorus ferrugineus* (Insecta: Coleoptera) induced by the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* (Nematoda: Rhabditida). *Insect Science*. 22: 748-760.
- May, R. M. & Anderson, R. M. 1983. Epidemiology and genetics in the coevolution of parasites and hosts. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological sciences*. 219: 281-313.



- Midelet-Bourdin, G., Leleu, G., Copin, S., Roche, S. M., Velge, P. & Malle, P. 2006. Modification of a virulence-associated phenotype after growth of *Listeria monocytogenes* on food. *Journal of Applied Microbiology*. 101: 300-308.
- Mitani, D. K., Kaya, H. K. & Goodrich-Blair, H. 2004. Comparative study of the entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae*, reared on mutant and wild-type *Xenorhabdus nematophila*. *Biological Control*. 29: 382–91.
- Morón, M. A. 1988. Las especies de *Phyllophaga* (Coleoptera: Melolonthidae) con mayor importancia agrícola en México. En: Memoria tercera mesa redonda plagas del suelo. Morelia, Michoacán. México. 81-102 pp.
- Morón, M. A. 1993. Las especies de *Phyllophaga* (Coleoptera: Melolonthidae) del estado de Veracruz, Méx. En: Morón, M. A. (Ed.). *Diversidad y manejo de plagas subterráneas*. Sociedad Mexicana de entomología e Instituto de Ecología, Xalapa, Veracruz, México. 55-82 pp.
- Morón, M. A. 2003. Diversidad, distribución e importancia de las especies de *Phyllophaga* Harris en México (Coleoptera: Melolonthidae). En: Aragón, G. A., Morón, M. A. y Marín, J. A. (Eds.) *Estudios Sobre*

*Coleópteros del Suelo en América*. pp 1-27. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México.

- Mráček, Z., & Becvár, S. 2000. Insect aggregation and entomopathogenic nematodes occurrence. *Nematology*. 2. 297–301.
- Nyman, T. 2009. To speciate, or not to speciate? Resource heterogeneity, the subjectivity of similarity, and the macro-evolutionary consequences of niche-width shifts in plant- feeding insects. *Biological Reviews*. doi: 10.1111/j.1469- 185X.2009.00109.x.
- Park, J. W. & Lee, B. L. 2012. Insect immunology. In: *Insect molecular biology and biochemistry*. pp 480-512. Academic Press.
- O'Riordan, V. B. & Burnell, A. M. 1990. Intermediary metabolism in the dauer larva of the nematode *Caenorhabditis elegans* II. The glyoxylate cycle and fatty-acid oxidation. *Comparative Biochemistry and Physiology. B, Comparative Biochemistry*. 95: 125-130.
- Osche, G. 1956. Die Präadaptation freilebender Nematoden an den Parasitismus. *Zoologischer Anzeiger*. 19: 391–396.
- Potter, D. A. & Held, D. W. 2009. June Beetles. *En: Resh, V. H. (Ed.). Encyclopedia of Insects*. pp 540-541. Academic Press.

- Poulin, R. 2007. *Evolutionary Ecology of Parasites*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Poulin, R. & Randhawa, H. S. 2013. Evolution of parasitism along convergent lines: from ecology to genomics. *Parasitology*. 11: 1–10.
- Regoes, R. R., Ebert, D., & Bonhoeffer, S. 2002. Dose–dependent infection rates of parasites produce the Allee effect in epidemiology. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. 269: 271-279.
- Restif, O. & Koella, J. C. 2003. Shared control of epidemiological traits in a coevolutionary model of host-parasite interactions. *The American Naturalist*. 161: 827-836.
- Shapiro-Ilan, D. I., Han, R. & Qiu, X. 2014. Production of entomopathogenic nematodes. *En: Mass production of beneficial organisms*. pp. 321-355. Academic Press.
- Singer, M. C., Wee, B. & Hawkins, S. 2008. Rapid anthropogenic and natural diet evolution: three examples from checkerspot butterflies. *En: Tilmon, K. J. (Ed.). Specialization, speciation, and radiation: the*

*evolutionary biology of herbivorous insects*. pp 311-324. Berkeley, University of California Press.

- Sommer, R. J. & Ogawa, A. 2013. The Genome of *Pristionchus pacificus* and the Evolution of Parasitism. *En: Kennedy, M. W. & Harnett, W. (Eds.). Parasitic nematodes: molecular biology, biochemistry and immunology*. pp. 1-4. CAB International. Oxfordshire, UK.
- Sudhaus, W. 2008. From evolutionary morphology towards evolutionary ecology. *Mitteilungen der deutschen Gesellschaft für allgemeine und angewandte Entomologie*. 16: 451–466.
- Sudhaus, W. 2010. Preadaptive plateau in Rhabditida (Nematoda) allowed the repeated evolution of zooparasites, with an outlook on evolution of life cycles within Spiroascarida. *Palaeodiversity*. 3 (Suppl.): 117–130.
- Thompson, J. N., Nuismer, S. L. & Meeg, K. 2004. Plant polyploidy and the evolutionary ecology of plant/animal interactions. *Biological Journal of the Linnaean Society*. 82: 511-519.
- Thurston, G. S., Yule, W. N. & Dunphy, G. B. 1994. Explanations for the low susceptibility of *Leptinotarsa decemlineata* to *Steinernema carpocapsae*. *Biological Control*. 4: 53-58.

- Toubarro, D., Avila, M. M., Montiel, R. & Simões, N. 2013. A pathogenic nematode targets recognition proteins to avoid insect defenses. *PLoS One*. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0075691>.
- Wang, Y., Gaugler, R. & Cui, L. W. 1994. Variations in immune response of *Popillia japonica* and *Acheta domesticus* to *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema* species. *Journal of Nematology*. 26: 11–18.
- Welch, H. E. & Bronskill, J. F. 1962. Parasitism of mosquito larvae by the nematode, DD-136 (Nematoda: Neoaplectanidae). *Canadian Journal of Zoology*. 40: 1263–1268.
- Woolhouse, M. E. J., Webster, J. P., Domingo, E., Charlesworth, B., & Levin, B. R. 2002. Biological and biomedical implications of the co-evolution of pathogens and their hosts. *Nature Genetics*. 32: 569–577.
- Woolhouse, M. E., Haydon, D. T., & Antia, R. 2005. Emerging pathogens: the epidemiology and evolution of species jumps. *Trends in Ecology & Evolution*. 20: 238-244.
- Wu, J. H., Ali, S., Huang, Z., Ren, S. X. & Cai, S. J. 2010. Media Composition Influences Growth, Enzyme Activity and Virulence of the

Entomopathogen *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae).  
*Pakistan Journal of Zoology*. 42: 451-459.

- Yadav, S., Shokal, U., Forst, S. & Eleftherianos, I. 2015. An improved method for generating axenic entomopathogenic nematodes, *BMC Research Notes*. 8: 461.
- Zelmer, D. A. 1998. An evolutionary definition of parasitism. *International Journal of Parasitology*. 28. 531-533.
- Zhang, J., Friman, V., Laasko, J. & Mappes, J. 2012. Interactive effects between diet and genotypes of host and pathogen define the severity of infection. *Ecology and Evolution*. 2: 2347-2356.
- Zimmer, C. & Emlen D.J. 2016. *Evolution: Making sense of life*. W. H. Freeman, Macmillan Learning. 2<sup>da</sup> Ed. New York.

# ANEXO 1

## A) Método de colecta de *R. regina* en área de estudio

### A.1) Área de Estudio: Jerécuaro, Guanajuato, México.

El municipio de Jerécuaro se localiza al sur del estado de Guanajuato (20°08'58"N 100°30'34"O), a una altitud 1,930 msnm; abarca una superficie territorial de 877.25 km<sup>2</sup>. El clima predominante en el municipio es el templado subhúmedo con lluvias en verano, de humedad media (80.7 %), aunque también puede ser semicálido subhúmedo con humedad baja (8.4 %), siendo los meses más calurosos mayo y junio, con temperaturas máximas de hasta 35°C, mientras que los más fríos son diciembre y enero, con temperatura mínima de 1°C; la temperatura media anual es de 17°C. La precipitación media anual es de 700-900 mm. La vegetación se conforma de bosques de encino, pino-encino, encino-pino, pastizal (inducido) y selva baja caducifolia. La zona presenta una proporción alta dedicada a actividades agrícolas (INEGI, 2009).

### A.2) Colecta, mantenimiento y monitoreo de *P. polyphylla*.

Las larvas de *P. polyphylla* (Coleoptera: Scarabaeidae) fueron colectadas en una localidad dentro del municipio de Jerécuaro, donde se ha estudiado a *P. polyphylla* y *R. regina* desde hace 6 años. En este lugar se registró por primera vez a *R. regina* en México y es uno de los patógenos principales asociados a la "gallina ciega" de este sitio (Enríquez-Vara et al., 2015; Jiménez-Cortés et al.,

2016). La colecta se hizo en dos años: el 28 de octubre del 2017 y el 27 de octubre del 2018. El área de estudio está dentro de un campo de maíz cultivado, lugar donde comúnmente se hallan las larvas de *Phyllophaga*, pues su fuente principal de alimento son las raíces. La colecta se hizo después de una labranza post-cosecha a 20 cm de profundidad del suelo. Las larvas expuestas fueron colectadas manualmente y lavadas con agua destilada estéril y una solución de cloro al 1%; se colocaron individualmente en botes de plástico pequeños de 50 ml con turba (Peat Moss) esterilizada a 30% de humedad, como substrato. Finalmente, la muestra de “gallinas ciegas” fue puesta en periodo de cuarentena verificando la supervivencia de las larvas cada tercer día. Las larvas muertas se retiraron para ser colocadas en cajas Petri con papel filtro estéril y se examinaban con el fin de determinar el patógeno involucrado en el deceso.

## **Resultados de estudios de campo**

### **A) Prevalencia de *R. regina* en poblaciones naturales de *P. polyphylla***

Se colectaron un total de 932 larvas de *Phyllophaga polyphylla* en el 2017 y 630 el 2018. Durante el periodo de monitoreo (cuarentena) se registraron 224 decesos en el 2017 y 550 en el 2018 (Figura 1). La prevalencia de ciertos patógenos varió considerablemente en los dos años, como en el caso de *Rhabditis regina* que presentó una prevalencia de 40% en el 2017 y el 2018 se



registró 74%; las bacterias *Serratia marcescens* y el hongo *Beauveria* sp. prevalecieron los dos años a diferencia de otros patógenos (Figura 2).

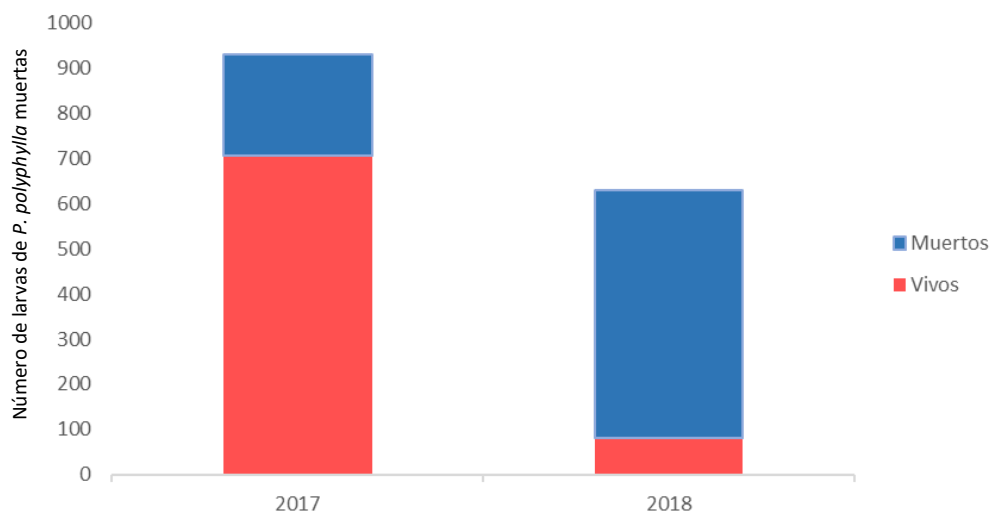
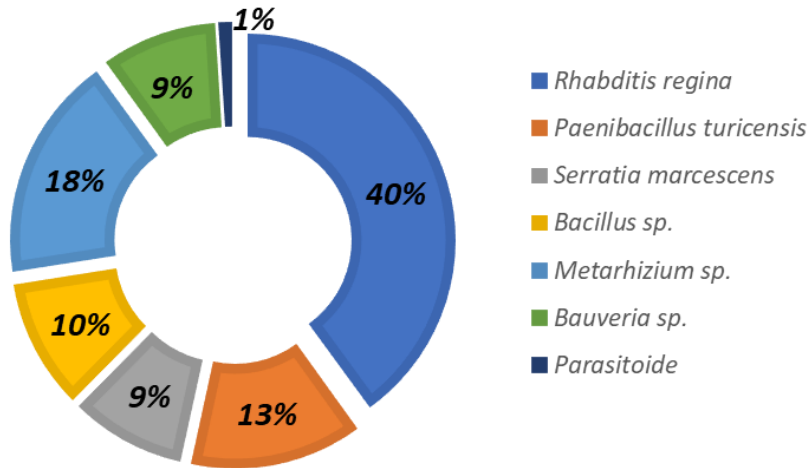


Figura 1. Supervivencia de *P. polyphylla* en el año 2017 y 2018.

**2017**



**2018**

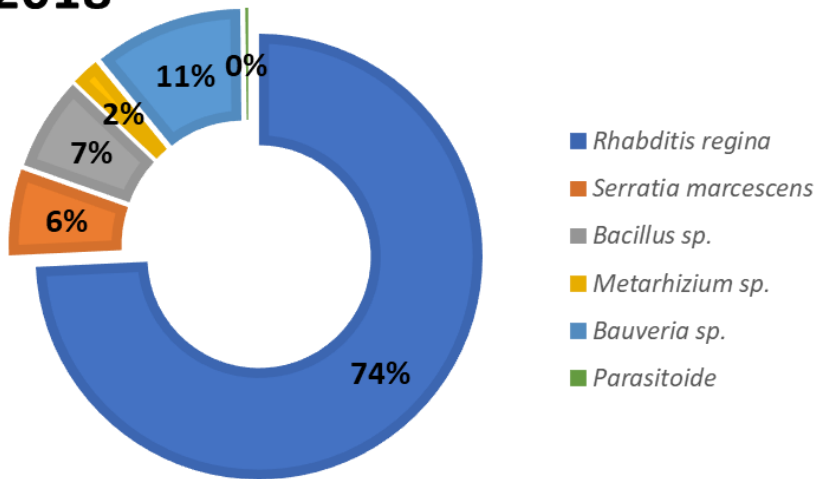


Figura 2. Prevalencia de patógenos encontrados en la muestra de *P. polyphylla* de Jerécuaro, Gto, Méx en 2017 y 2018.

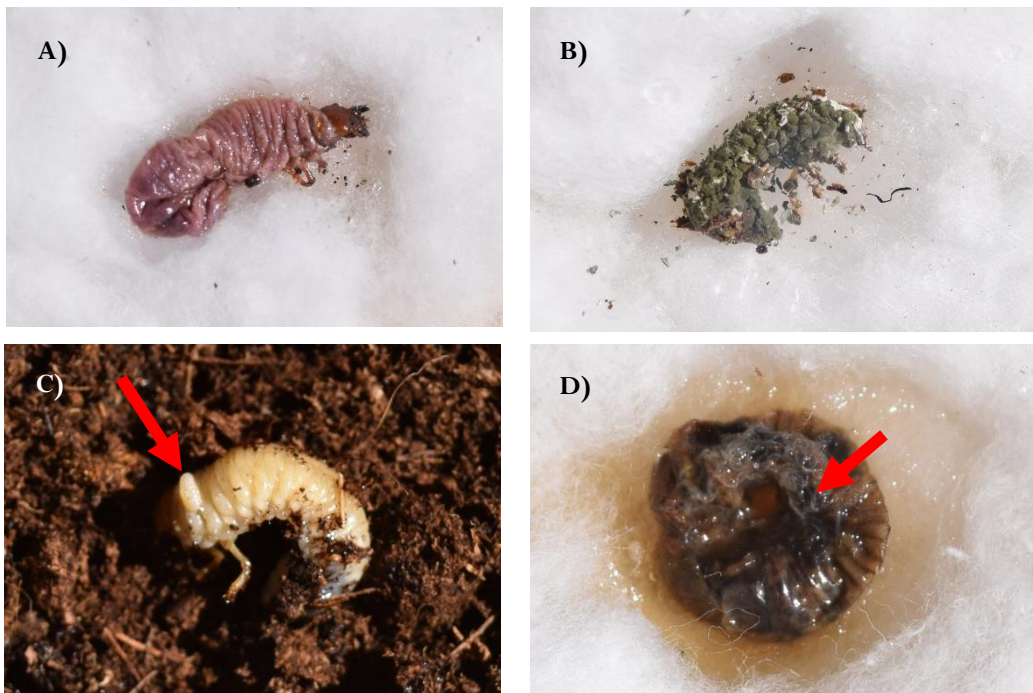
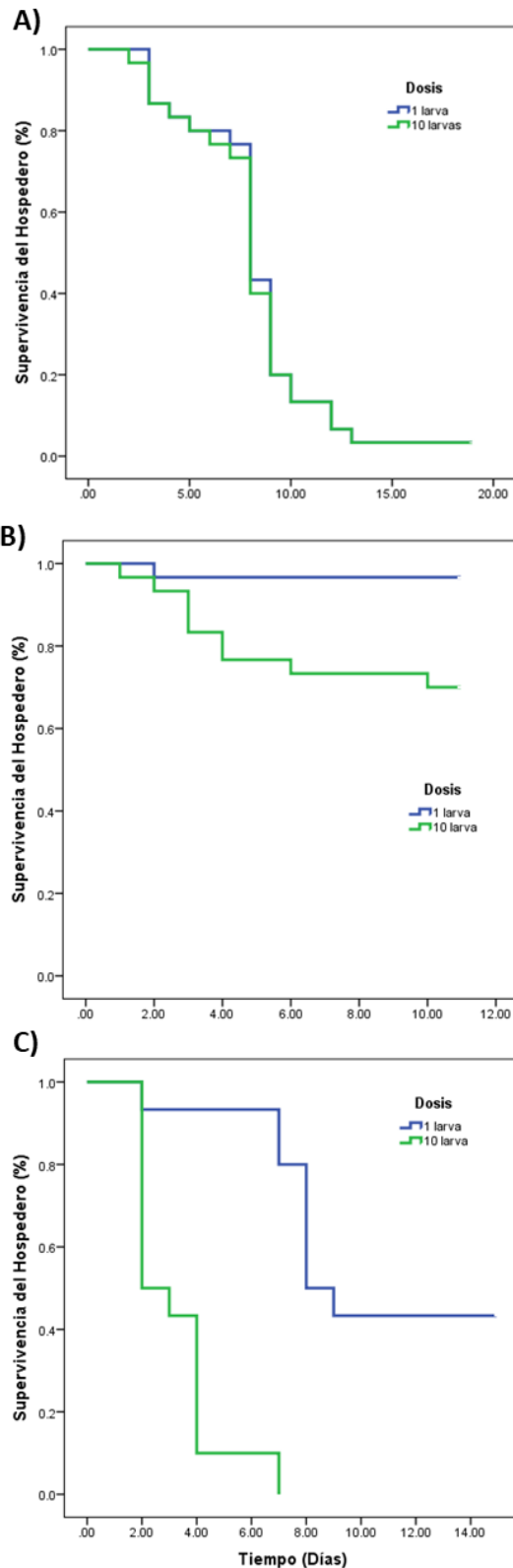


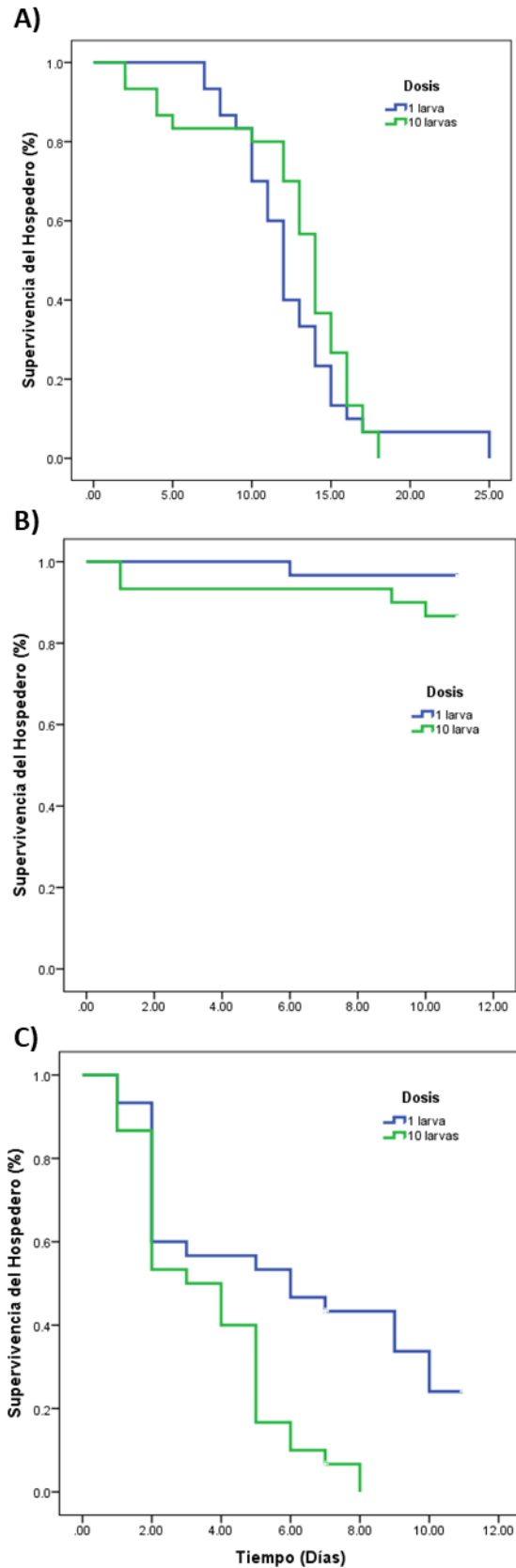
Figura 3. Patógenos encontrados en muestra de *Phyllophaga* sp. A) Bacteria (*Serratia* sp.); B) Hongo (*Metarhizium*); C) Parasitoide; D) Nemátodos

## Resultados de Análisis de Supervivencia

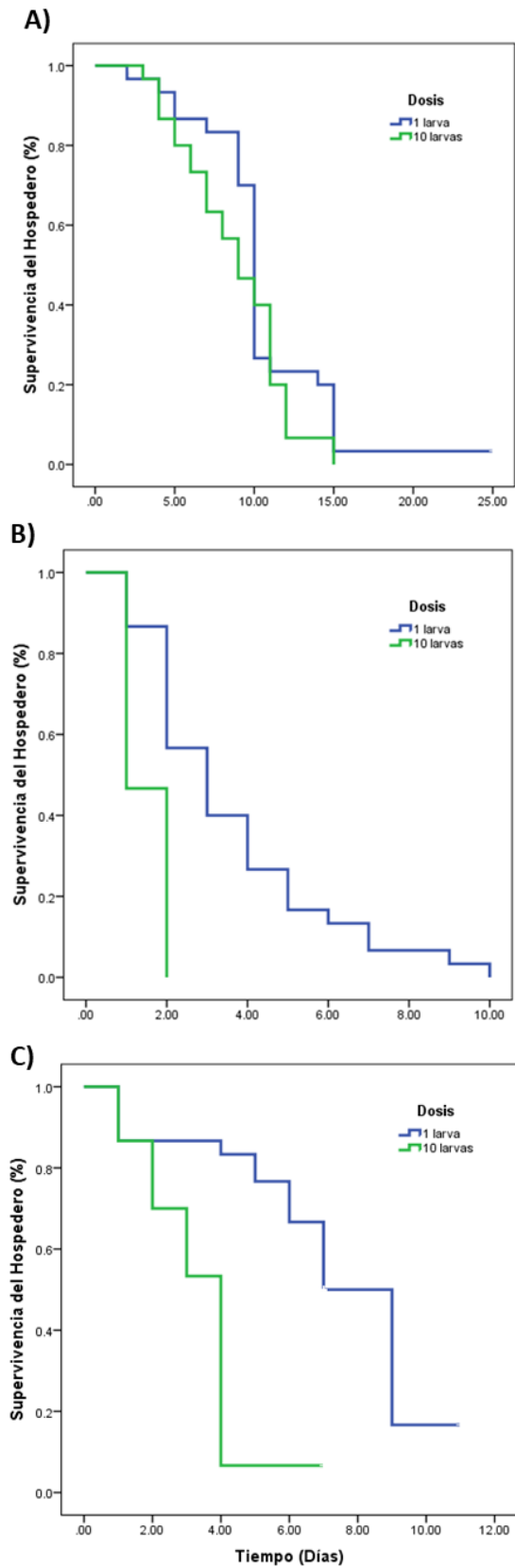
-Ensayos de Virulencia con dos dosis de una larva y 10 larvas dauer.



**Figura 4.** Curvas de supervivencia de los hospederos infectados con las dosis de 1 larva y 10 larvas dauer de la Cepa el Hospedero Natural (HN): A) *Phyllophaga polyphylla* ( $X^2 = 0.033$ ,  $d.f. = 1$ ,  $p = 0.85$ ); B) *Tenebrio molitor* ( $X^2 = 7.36$ ,  $d.f. = 1$ ,  $p < 0.01$ ) y C) *Galleria mellonella* ( $X^2 = 50.35$ ,  $d.f. = 1$ ,  $p < 0.01$ ).



**Figura 5.** Curvas de supervivencia de los hospederos infectados con las dosis de 1 larva y 10 larvas dauer de la Cepa el Hospedero Alterno (HA): A) *Phyllophaga polyphylla* ( $X^2 = 0.91$ ,  $d.f. = 1$ ,  $p = 0.33$ ); B) *Tenebrio molitor* ( $X^2 = 1.92$ ,  $d.f. = 1$ ,  $p = 0.16$ ) y C) *Galleria mellonella* ( $X^2 = 10.57$ ,  $d.f. = 1$ ,  $p < 0.01$ ).



**Figura 6.** Curvas de supervivencia de los hospederos infectados con las dosis de 1 larva y 10 larvas dauer de la Cepa Saprófita (S): A) *Phyllophaga polyphylla* ( $X^2 = 2.05$ ,  $d.f. = 1$ ,  $p = 0.15$ ); B) *Tenebrio molitor* ( $X^2 = 25.18$ ,  $d.f. = 1$ ,  $p < 0.01$ ) y C) *Galleria mellonella* ( $X^2 = 22.93$ ,  $d.f. = 1$ ,  $p < 0.01$ ).