



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

LICENCIATURA EN ECOLOGÍA

Escuela Nacional de Estudios Superiores,
Unidad Morelia

Importancia de la intensidad de la
infección en la señalización honesta o
deshonesta de los machos de *Tenebrio
molitor*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN ECOLOGÍA

P R E S E N T A

Placido Augusto Colin Macedo

DIRECTOR DE TESIS: DR. JORGE ALBERTO CONTRERAS GARDUÑO

MORELIA, MICHOACÁN

Septiembre, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

LICENCIATURA EN ECOLOGÍA

Escuela Nacional de Estudios Superiores,
Unidad Morelia

Importancia de la intensidad de la
infección en la señalización honesta o
deshonesta de los machos de *Tenebrio*
molitor

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN ECOLOGÍA

P R E S E N T A

Placido Augusto Colin Macedo

DIRECTOR DE TESIS: DR. JORGE ALBERTO CONTRERAS GARDUÑO

MORELIA, MICHOACÁN

Septiembre, 2022

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Quiero hacer un enorme reconocimiento por todas las enseñanzas, conocimientos y formación obtenida por los excelentes profesores, durante los ocho semestres cursados en la Licenciatura en Ecología.

Agradezco el financiamiento brindado por la Beca de titulación/Licenciatura PAPIIT con folio 229921 con clave del proyecto IN225120. El proyecto fue financiado por PAPIIT (IN225120).

Al Dr. Indrikis Krams del Instituto de Ecología y Ciencias de la Tierra, Universidad de Tartu en Estonia, por sus comentarios y sugerencias en la redacción de este escrito y en el artículo.

Al Dr. Juan Carlos Torres Guzmán y a la Dra. Angélica Hernández del Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, México por sus comentarios, sugerencias y proveer de las cepas utilizadas en nuestro diseño experimental.

Por último, agradezco enormemente y profundamente a los miembros del sínodo por sus observaciones y comentarios para la mejora de esta Tesis de Licenciatura.

Dr. Jorge Contreras Garduño (Tutor)

Dra. Laura Roxana Torres Avilés (Presidente)

Dr. Rodrigo Macip Ríos (Vocal)

Dr. Fernando Pineda García (Suplente)

Dr. Milan Janda (Suplente)

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Estoy muy agradecido por el buen recibimiento, buen trato, gran apoyo, muy buena atención, compromiso y confianza que me brindó mi tutor de Tesis, el Dr. Jorge Contreras Garduño. Sobre todo, agradezco y resalto todas las herramientas y habilidades que me ayudaron a construir un mejor proyecto, un mejor entendimiento de diferentes procesos y conocimientos durante mi estancia en el Laboratorio. También, quiero agradecer el haber sacado la mejor versión posible académica y personalmente hablando, y haber alentado un mayor trabajo para que todo este proyecto diera como recompensa la constitución de un artículo.

Agradezco a mis compañeras, compañeros y compañeros del laboratorio de Ecología Evolutiva por toda su atención, apoyo, conocimientos, consejos, sugerencias y observaciones que hicieron a lo largo de mi estancia y en la preparación de la presentación de mi tesis para su mejoramiento.

INDICE

AGRADECIMEINTOS INSTITUCIONALES.....	3
AGRADECIMEINTOS PERSONALES.....	4
DEDICATORIA.....	6
RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9-14
HIPOTESIS Y PREDICCIONES.....	15
OBJETIVO GENERAL.....	16
MATERIALES Y MÉTODO.....	17-21
Cría de <i>Tenebrio Molitor</i>	17
Determinación de las dosis de <i>Metarhizium brunneum</i>	18
Tratamiento con <i>Metarhizium brunneum</i>	19
Elección de Pareja.....	19-20
Análisis Estadísticos.....	20-21
RESULTADOS.....	22-26
DISCUSIÓN.....	27-31
REFERENCIAS.....	32-44

DEDICATORIA

Quiero agradecer muy especial y profundamente a mis padres, Irene Macedo Aguirre y José Colin Soto por apoyarme tanto, alentarme y darme fuerzas cuando me podían faltar, por estar tan atentos y siempre creer en que lo podía lograr. Sobre todo, quiero destacar y agradecer todo el cariño, esfuerzo y dedicación a sus trabajos, que hicieron posible tener la oportunidad de culminar mis estudios de licenciatura, porque sin ustedes no sería nada de esto posible y este triunfo es mío, para ustedes y por ustedes. Además, quiero resaltar todo el apoyo recibido por compañeras, compañeros, amigas, amigos y amigos que me acompañaron a lo largo de este gran y muy importante proceso para mí. Por otro lado, quiero agradecer en especial a Emilia Hernández Contreras por apoyarme y alentarme cuando más lo necesitaba y darme ese empujón emocional extra que requería.

RESUMEN

Existen resultados contradictorios sobre si los machos de la misma especie muestran señales honestas o si realizan inversión terminal cuando atraviesan por una infección, y al mismo tiempo, deben cortejar a las hembras. Una hipótesis que podría resolver esta controversia es que la intensidad de la infección, el grado de virulencia y el tiempo transcurrido entre la infección y el cortejo a una pareja potencial, generan una respuesta dinámica que incluye inversión terminal y señales honestas. La hipótesis predice inversión terminal en la elección de pareja con dosis altas de patógenos y con patógenos más virulentos, y señalización de condición con dosis bajas y con patógenos menos virulentos. Además, a las 24 horas de haberse infectado, los machos deberían tener una mayor probabilidad de realizar inversión terminal porque la infección estaría más avanzada que a las 3 horas de la infección. Para evaluar si *Tenebrio molitor* realiza señalización honesta o deshonesto, se realizaron pruebas de elección femenina. Se realizaron infecciones experimentales con el hongo *Metarhizium brunneum* y después del cortejo masculino, se registró la supervivencia durante 12 días. Las hembras prefirieron a los machos control, respecto a los tratados con 400 conidios de la cepa GFP, cuando el tiempo transcurrido entre la infección y el cortejo fue de 24 horas. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en los tratamientos con 20 conidios de GFP a las 3 y 24 horas de la infección y 20 y 400 conidios de la cepa CAT a las 3 y 24 horas. La mortalidad fue mayor con la dosis de 400 conidios, pero no se encontraron diferencias entre los infectados con 20 conidios y su control. Los resultados sugieren que el dinamismo de la señalización honesta o deshonesto está relacionado con la virulencia del patógeno, la dosis del patógeno y el tiempo que transcurre entre la infección y el cortejo para atraer pareja.

ABSTRACT

There are conflicting results about whether males of the same species show honest signals or perform terminal investment when undergoing infection, and at the same time, they court the females. One hypothesis that could resolve this controversy is that the intensity of the infection, the degree of virulence, and the time elapsed between infection and courtship, generate a dynamic response that includes both terminal investment and honest signals. The hypothesis predicts terminal investment in mate choice if males confront high doses and virulent pathogens and condition signaling with low doses and less virulent pathogens. In addition, at 24 hours after being infected, males should have a higher probability of performing terminal investment because the infection would be more advanced than at 3 hours after infection. We assessed whether *Tenebrio molitor* performs honest or dishonest signaling to attract females. Experimental infections with the fungus *Metarhizium brunneum* were performed, and after male courtship, survival was recorded for 12 days. Females preferred the control males, compared to those treated with 400 conidia of the GFP strain when the time elapsed between infection and courtship was 24 hours. However, there were no significant differences in the treatments with 20 GFP conidia at 3 and 24 hours after infection and 20 and 400 CAT strain conidia at 3 and 24 hours. Mortality was higher with the dose of 400 conidia. However, no differences between males infected with 20 conidia and their control were found. The results suggest that the dynamism of honest or dishonest signaling is related to the pathogen's virulence, dose, and the time elapsed between infection and courtship to attract a mate.

1. INTRODUCCIÓN

Los caracteres sexuales secundarios (CSS) son llamativos para el sexo opuesto. Éstos se relacionan positivamente con el éxito reproductivo y comprenden astas, cuernos, danzas, colores, aromas o cantos (Darwin, 1871; Bateson, 1985; Andersson, 1994; Contreras-Garduño *et al.*, 2009). Darwin (1871) propuso que la elección de pareja en animales es un proceso crucial que favorece positivamente la evolución de los CSS. La elección de pareja se refiere a “cualquier aspecto del fenotipo de un animal que conduce a ser más probable que tenga actividad sexual con ciertos individuos que con otros” (Rosenthal, 2017). Un ejemplo clásico es el de la rana *Engystomops pustulosus*, donde las hembras prefieren a los machos con llamados más complejos (Ryan, 1980). Aunque en este estudio se mostraba un sesgo en la preferencia femenina a favor de los machos con CSS más elaborados, no era claro porque existe ese sesgo. Zahavi (1975 y 1977) propuso que los CSS son indicadores de “condición” y con ello, “buenos genes” de los machos porque solamente los mejores podrán tener CSS muy elaborados, lidiar con la desventaja que estos imponen en su supervivencia y heredar estos genes (Zahavi, 1971; Zahavi, 1977).

La condición se refiere a “la capacidad animal para mantener la funcionalidad óptima de los procesos celulares esenciales” (Hill, 2011). Así que un déficit alimenticio, estrés oxidante, patógenos, parásitos y parasitoides afectan el óptimo funcionamiento de las células y por ello de los organismos (Véase Jawor *et al.*, 2004; Hamilton & Zuk, 1982; Von Schantz *et al.*, 1999; Krams *et al.*, 2011; Krams *et al.*, 2015; Martinez-Lendeche *et al.*, 2019).

Es importante señalar que, calidad y condición se usan como sinónimos, pero calidad hace referencia al genotipo y fenotipo del individuo, mientras que condición solo hace referencia al fenotipo (Hegyi *et al.*, 2010; Hill, 2011). Por ejemplo, en el escarabajo *Tenebrio molitor* las hembras prefieren a los machos sanos y rechazan a los infectados con el cestodo *Hymenolepis diminuta* porque, al disminuir la condición de los machos, también se reduce su producción de feromonas para atraer a las hembras (Worden & Parker, 2005).

La elaboración de los ornamentos en los animales predice el tiempo de recuperación (Lindström & Lundström, 2000; Hill & Farmer, 2005) y la capacidad de sobrevivir a una epidemia (Van Oort & Dawson, 2005), la resistencia al parasitismo (Roulin *et al.*, 2001; Worden & Parker, 2005) y al estrés oxidante (Perez-Rodriguez *et al.*, 2010), la activación de la respuesta inmunitaria (Mougeot, 2008) y la producción de esperma funcional (Helfenstein *et al.*, 2011) y de mejores descendientes (Huuskonen *et al.*, 2009). Un tipo de expresión de los rasgos ornamentales son las feromonas atractivas para las hembras, las cuales pueden ser una señal de la condición, pero, eso dependerá de distintos factores, siendo la infección por parásitos o patógenos muy importante (Contreras-Garduño *et al.*, 2009).

1.1 La condición no siempre es un reflejo de la carga parasitaria

Es probable que el atributo de condición más estudiado en la selección sexual sea la respuesta inmunitaria, y podría deberse a que los patógenos y parásitos son una fuerte presión selectiva sobre sus hospederos. Hamilton y Zuk (1982) sugirieron que las hembras basaban su elección

de pareja en la resistencia hereditaria de los machos a sus parásitos (Hamilton & Zuk, 1982; Møller, 1990). Según esta hipótesis, la condición de los machos es percibida por las hembras, a través del grado de elaboración de sus CSS: los CSS deberían ser un reflejo de la carga parasitaria (Hamilton & Zuk, 1982; Møller, 1990). Por ejemplo, en el ave *Carpodacus mexicanus*, las hembras prefieren a machos con plumaje más rojo (carotenoides), y estos machos presentaban menor carga del patógeno, en comparación a los machos con plumaje pálido (Hill & Farmer, 2005). Dado que el grado de desarrollo de los CSS debería estar negativamente relacionado con su carga parasitaria, entonces, también debería existir una relación positiva entre CSS con la intensidad de la respuesta inmunitaria (Møller, 1990; Pryke & Andersson, 2003b; Velando *et al.*, 2006a).

El problema con la idea anterior es que, en ocasiones, los machos que están a punto de morir son incluso más atractivos que los machos sanos (Sadd *et al.*, 2006; Kivleniece *et al.*, 2010; Duffield *et al.*, 2015; Duffield *et al.*, 2017). Esta estrategia alternativa se denomina inversión terminal y consiste en que los machos invierten en la reproducción actual porque la descendencia futura se pone en riesgo debido a factores como una enfermedad, la edad y/o proceso de senescencia (Williams, 1966; Hirshfield & Tinkle, 1975; Clutton-Brock, 1984; Duffield *et al.*, 2017). Por ejemplo, en *T. molitor*, al imponer 3 retos inmunitarios a los machos, las hembras prefirieron a los machos control respecto a los machos con un reto, quienes presentaron activación de la respuesta inmunitaria y redujeron su actividad, mientras que, en los experimentos del segundo y tercer reto, las hembras prefirieron a los machos retados, aunque tuvieron menos actividad inmunológica y aumentó su mortalidad (Krams *et al.*, 2011). Esto sugiere que los machos favorecen su inversión en señales sexuales

(atractividad), aunque esto comprometa su supervivencia (Krams *et al.*, 2011). Sin embargo, existen trabajos que apoyan esta hipótesis de inversión terminal (Rantala *et al.*, 2002; Rantala *et al.*, 2003; Sadd *et al.*, 2006; Kivleniece *et al.*, 2010; Krams *et al.*, 2011; Copeland & Fedorka, 2012; Krams *et al.*, 2015; Duffield *et al.*, 2017; Farchmin *et al.*, 2020) y otros que no la apoyan (Worden & Parker, 2005; Vainikka *et al.*, 2007; Kuczynski *et al.*, 2012), y esto aun, controlando por la especie de estudio y la edad de los organismos. Una explicación a esta aparente contradicción de resultados es que la estrategia para atraer pareja no es de todo o nada (i.e. sí ocurre o no ocurre inversión terminal), sino que depende de la intensidad del efecto estresor sobre la producción de ornamentos y del riesgo de morir (Krams *et al.*, 2015; Duffield *et al.*, 2017). Por ejemplo, no se sabe si la virulencia y dosis de infección de los patógenos imponen una respuesta dinámica que incluye inversión terminal u honestidad de las señales en la misma especie. Esto sugeriría que el apoyo a una estrategia u otra depende del diseño experimental que se utilice y tal vez, en la naturaleza, la diversidad de los agentes estresores determine la estrategia que usen los machos para atraer a las parejas.

1.2 Tenebrio molitor

En esta tesis usamos como modelo de estudio a *T. molitor*. En esta especie, la única variable que usan los machos para cortejar a las hembras es el aroma en términos de feromonas e hidrocarburos cuticulares (Rantala *et al.*, 2002, 2003; Krams *et al.*, 2015; Vainikka *et al.*, 2006; Nielsen & Holman, 2012). Al ser costosa la producción de aroma, se propone que su producción depende de la condición de los machos (Rantala *et al.*, 2002, 2003; Kivleniece *et*

al., 2010). Ante el ataque de parásitos, los machos de tenebrio generan señales honestas o deshonestas (inversión terminal) para las hembras (Kivleniece *et al.*, 2010; Nielsen & Holman, 2012). Las señales honestas en tenebrio consisten en que los machos invierten en la producción de feromonas atractivas dependiendo de su condición: los machos saludables producen más feromonas que los machos infectados (Rantala *et al.*, 2002, 2003). Sin embargo, en la inversión terminal, los machos dan señales deshonestas: invierten en la producción de feromonas y se vuelven más atractivos que los machos sanos, aunque estén a punto de morir por el embate de los patógenos (Vainikka *et al.*, 2006; Kivleniece *et al.*, 2010; Nielsen & Holman, 2012; Krams *et al.*, 2015). Esta diferencia en los resultados podría deberse a que la virulencia de los patógenos, la dosis del patógeno, y/o el tiempo que transcurre entre el encuentro con patógenos y el cortejo a la pareja afecten la probabilidad de que los machos ajusten sus estrategias, y envíen señales honestas o deshonestas (inversión terminal) a las hembras. Con una baja amenaza a la reproducción futura (i.e. con un patógeno de baja virulencia o con una dosis baja de infección), se espera que los individuos inviertan más en la respuesta inmunitaria que en la producción de ornamentos actual y que esto derive en honestidad de la señal, mientras que, con una amenaza alta a la reproducción futura (i.e. con un patógeno de alta virulencia o con una dosis alta de infección), los machos deberían invertir de manera intensa en el cortejo para favorecer la reproducción actual, aunque sacrifiquen la reproducción futura si mueren, dando lugar al fenómeno de inversión terminal (Duffield *et al.*, 2017). Entonces, la pregunta de investigación es: ¿por qué varía la estrategia masculina ante la infección de un patógeno en *T. molitor*? Mediante dos experimentos, se evaluó el efecto de la dosis-dependencia y virulencia de infección con *Metarhizium brunneum* (hongo entomopatógeno natural) en la elección de pareja de *T. molitor*. Para evaluar la dosis y virulencia se utilizaron las cepas GFP (Green Fluorescent Protein) y CAT

(Catalase), siendo CAT la más virulenta, ya que sobreexpresa un gen de catalasa (*cat1*), un antioxidante que altera la respuesta inmunitaria del huésped mediada por especies reactivas de oxígeno y GFP es similar a la cepa parental, menos virulenta (Medina-Gómez *et al.*, 2018). También se sabe que la dosis de 200 conidios/ μ l mata al 100% de los insectos en menos de 6 días y que 20 conidios/ μ l mata al 20-30% (Castro-Vargas *et al.*, 2017). También, cabe resaltar que, a las 24 horas de la infección, la respuesta inmunitaria alcanza su pico máximo de respuesta (Haine *et al.*, 2008; Johnston *et al.*, 2014) e impone un elevado costo energético (Contreras-Garduño *et al.*, 2019). Por lo tanto, en este momento, cortejar a las parejas e invertir en la respuesta inmunitaria podrían tener una disyuntiva de asignación de recursos (Contreras-Garduño *et al.*, 2019). Así que investigamos la importancia de cortejar a las hembras, luego de 3 o 24 horas de que los machos se infectaron.

2. HIPÓTESIS

Existe plasticidad en las estrategias masculinas para atraer pareja, que incluyen inversión terminal o señalización de condición, dependiendo de la virulencia de los patógenos, de la dosis de infección, y/o del tiempo que transcurre entre el encuentro con patógenos y el cortejo a la pareja.

2.1 PREDICCIONES

Esperamos inversión terminal (menor supervivencia y mayor atracción de pareja, o menor supervivencia sin impacto en la elección de pareja) en los machos infectados con una dosis elevada (400 conidios/ μ l) de *M. brunneum* de la cepa GFP y honestidad de la señal (mayor elección de machos no infectados y menor supervivencia en los infectados que en los no infectados) o no diferencias significativas entre grupos, con una dosis baja (20 conidios/ μ l).

En general, esperamos observar inversión terminal en los machos retados contra *M. brunneum* de la cepa CAT y honestidad con la cepa menos virulenta GFP.

Esperamos inversión terminal en los machos que cortejen a las hembras 24 horas después de la infección y honestidad de la señal o no diferencias significativas entre grupos, en los machos que cortejen a las hembras a las 3 horas después de la infección.

3. OBJETIVO GENERAL

Determinar en *Tenebrio molitor* si la infección con *Metarhizium brunneum* y el cortejo a las parejas después de la infección afecta la estrategia masculina para atraer pareja, ya sea de forma honesta o deshonest.

4. MATERIALES Y MÉTODO

4.1 Cría de *Tenebrio molitor*

Se usaron larvas de *T. molitor* provenientes del Insectario María Sibylla Merian, de la Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES) Unidad Morelia, UNAM. Los tenebrios se mantuvieron a una temperatura de $27 \pm 1^\circ \text{C}$ y en un cuarto a completa oscuridad (Carazo *et al.*, 2004; Márquez-García *et al.*, 2016). Las larvas fueron alimentadas *ad libitum* con salvado de trigo y harina de maíz (3:1) estéril y un trozo de manzana cada tercer día, cabe señalar que el alimento se esterilizaba ($125 \pm 2^\circ \text{C}$ durante 15 minutos) para evitar cualquier infección en el individuo que afectara los resultados (Márquez-García *et al.*, 2016; Castro-Vargas *et al.*, 2017; Gómez-Medina *et al.*, 2018). Posteriormente, se tomaron pupas que fueron separadas de manera individual en cajas de 12 pozos (Corning) con alimento estéril. El sexado de pupas fue tomando en cuenta el área genital del lado ventral del último segmento abdominal (Bhattacharya *et al.*, 1970). Se esperaron 10 días desde pupa al estadio adulto y otros 10-12 días más para maduración sexual, ya que se sabe que esta edad coincide con el pico reproductivo en hembras y machos y con los niveles de producción máxima de Hormona Juvenil III (Cole *et al.*, 2003).

4.2 Determinación de las dosis de *Metarhizium brunneum*

Se hicieron diluciones seriadas con tubos Eppendorf de 1.5ml, donde se ponía el stock en un tubo Eppendorf del mismo volumen, mientras que en el resto de 4 tubos Eppendorf se rotulaban conforme la concentración de conidios (estructuras de forma ovoidal o elipsoidal que representan la forma infecciosa del hongo) que contenían: 1:10, 1:100, 1:1,000 y 1:10,000, siendo que el tubo seriado de 1:10 contenía la mayor cantidad de conidios posibles y el 1:10,000 contenía la menor cantidad de conidios. Cada tubo Eppendorf se llenaba mediante micropipetas (Nichiryo Nichipet EX II y RAININ pipet-lite XLS) y puntas (Axygen) previamente esterilizadas. Se vaciaban 900 μ L de Tween (0.001%) para cada tubo y del Stock se tomaban 100 μ L para ponerlos en el tubo seriado 1:10, de ese último se tomaban 100 μ L para vaciarlos en el tubo 1:100, y se repetía el mismo procedimiento hasta llegar al tubo seriado de 1:10,000. Se homogenizaba cada tubo Eppendorf con un Vortex Genie 2 (Scientific Industries) cuando había un cambio en su contenido.

Para llevar a cabo el contenido de los conidios se utilizó un hematocitómetro Reichert bright-line con cámara (Hausser Scientific), donde se colocaban 10 μ L por extremo de la cámara, para después realizar los conteos en un microscopio óptico (Motic). Se hicieron 10 conteos, se sumaban los resultados y después el resultado se dividía entre el número de conteos, para así determinar la cantidad de conidios/ μ L. De esta manera se obtuvieron las concentraciones de 20 y 400 conidios para las cepas GFP (Green Fluorescent Protein) y CAT (catalasa).

4.3 Tratamiento con *Metarhizium brunneum*

Se inyectaron 512 escarabajos adultos machos, de los cuales 256 fueron del grupo experimental y 256 del grupo control. *M. brunneum* GFP fue introducido por inyección (1µl) en la región abdominal del insecto, entre el tercer segmento del par de patas del lado derecho con una microjeringa esterilizada (10µl, Hamilton). Ciento treinta y seis escarabajos del grupo control fueron inyectados con una solución detergente Tween al 0.001%, mientras que los otros 136 del grupo experimental fueron retados con *M. brunneum* GFP. De los insectos experimentales, 68 fueron inyectados con 20 conidios y 68 con 400 conidios. La mitad de los tratamientos se usó para registrar conducta a las 3 o 24 horas después del tratamiento. Se usaron estas dosis porque ya se sabe que 400 conidios es dosis letal y 20 conidios es dosis subletal (Castro-Vargas *et al.*, 2017; Medina-Gómez *et al.*, 2018). Se establecieron los mismos grupos con la cepa CAT.

4.4 Elección de pareja

En las pruebas de elección de pareja, los insectos fueron colocados en una cámara de conducta. En cada prueba se usó una hembra, un macho inyectado con Tween al 0.001% y un macho inyectado con *M. brunneum* (20 ó 400 conidios). La hembra fue colocada en la arena central y cada macho fue colocado en los extremos de la arena en contraposición, con papel filtro estéril al fondo de cada macho y en la arena central (Márquez-García *et al.*, 2016).

La prueba duro 10 minutos, con 5 minutos de habituación para la hembra y los machos. Se registró el número de visitas y el tiempo que pasaba la hembra con cada uno de los dos machos como indicadores de elección de pareja (Kivleniece *et al.*, 2010).

4.5 Análisis estadísticos

Para evaluar la preferencia en la elección de pareja con respecto a las dosis-dependencia, tratamiento y el tiempo que transcurre entre la infección por *Metarhizium brunneum* y cortejar a la pareja, en una primera instancia se utilizaron modelos lineales generalizados con comparaciones múltiples (GLM) (Bonferroni) para las cepas GFP y CAT. Los experimentos realizados con CAT y GFP fueron independientes. CAT tuvo tres niveles de dosis (control sin hongo, 20 o 400 conidios/ μ l) y dos niveles del tiempo que transcurría entre la infección por *M. brunneum* y el cortejo de pareja (3 y 24 horas). Para GFP también se tuvieron los mismos tres niveles de dosis y los mismos dos niveles del tiempo que transcurrió entre la infección por *M. brunneum* y el cortejo de pareja. Para comparar la elección de pareja se utilizó un modelo lineal generalizado (GLM, link = “identity”). Esta variable de respuesta se ajustó a una distribución Gamma después de sumar 1 a cada valor para eliminar los ceros ($x = x + 1$). Se utilizó una prueba de Bonferroni para establecer las diferencias entre grupos. La supervivencia después de la inoculación del hongo *M. brunneum* se graficó con el estimador Kaplan-Meier. Para comparar la supervivencia entre los grupos control e inyectados con las distintas dosis-dependencias y tiempos de inoculación, primero se calculó el riesgo proporcional de muerte y después se usó la prueba de log-rank o Gehan-Breslow-Wilcoxon.

Todas las pruebas se realizaron en IBM SPSS ver. 22. Para la variable dependiente se proporcionó el error estándar, la media y significancia. Se controló el tamaño de todos los individuos emparejándolos conforme a tamaños y edad similar.

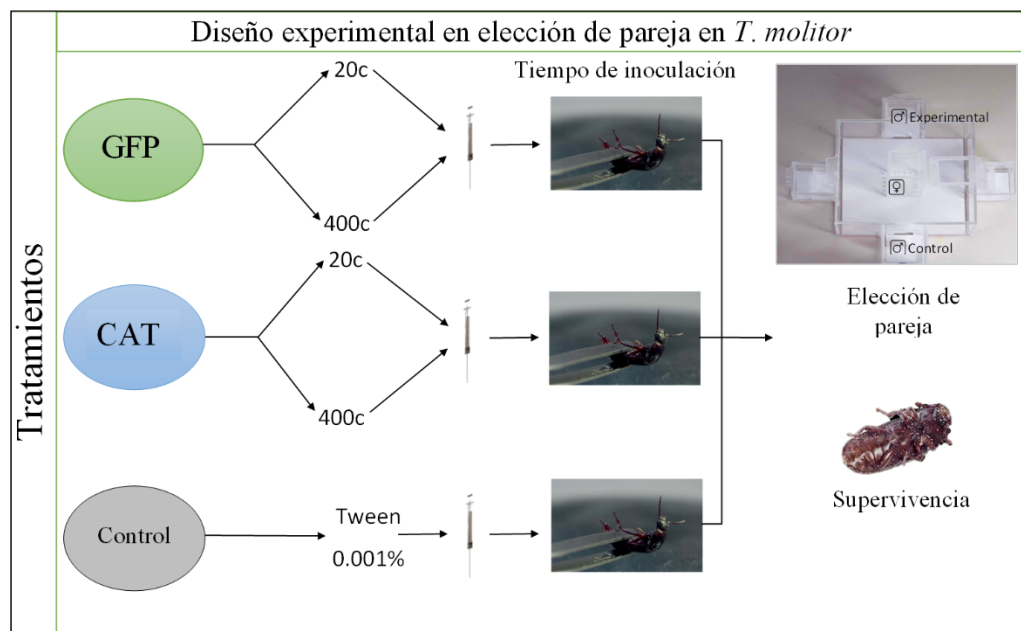


Figura 1. Diseño experimental. Los tratamientos corresponden a las cepas que se utilizaron para inyectar a los individuos de *T. molitor* en la región del tercer segmento abdominal. A las 3 y/o 24 horas después de la infección se realizaron las pruebas de elección de pareja. Las flechas de color negro tienen la misma magnitud y representan un tiempo de 3 y 24 horas, entre el que transcurre la infección del hongo *M. brunneum* y el cortejo de los individuos de *T. molitor*.

5. RESULTADOS

5.1 Supervivencia (cepa GFP)

La supervivencia fue similar entre los grupos GFP de 20 conidios ($n = 33$) y control ($n = 33$, log rank test = 0.28; $p = 0.6$; Fig. 2), sin embargo, el grupo infectado con 400 conidios (GFP) ($n = 38$) sobrevivió menos en comparación con el grupo control (Tw) ($n = 38$, log rank test = 6.86; $p = 0.01$; Fig. 2).

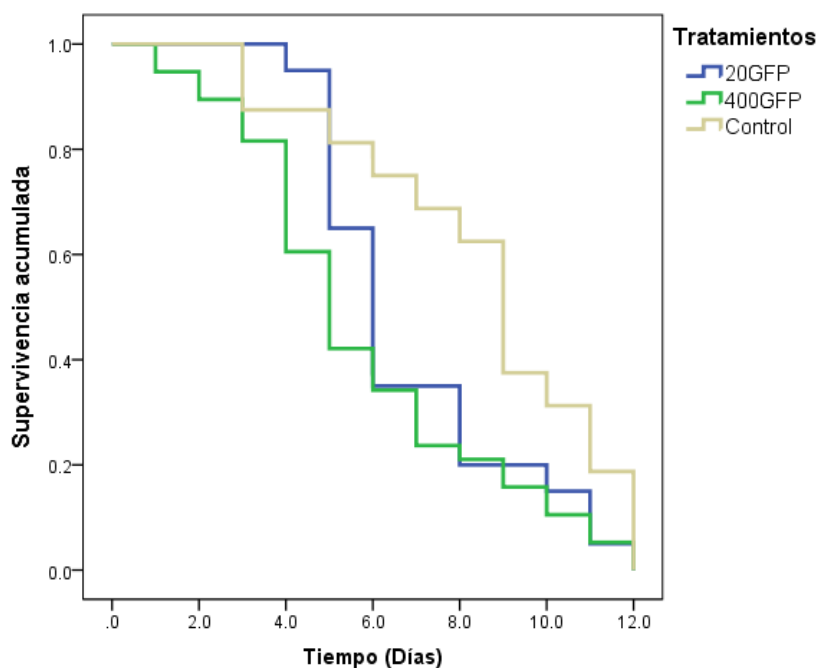


Figura 2. La grafica representa un análisis de Kaplan-Meier que evaluó la diferencia en la supervivencia con diferentes dosis en los individuos. Los adultos de *T. molitor* del grupo control vivieron más días, en comparación al grupo infectado con 400 conidios (GFP). Sin embargo, los adultos tratados con 20 conidios tuvieron una mortalidad similar al grupo control.

5.2 Elección de pareja (cepa GFP)

No se encontraron diferencias significativas con respecto al tratamiento ($X^2 = 0.21$, g.l = 1, $p = 0.64$), la interacción tratamiento*tiempo*dosis ($X^2 = 2.6$, g.l = 2, $p = 0.28$), la interacción dosis*tiempo ($X^2 = 3.25$, g.l = 2, $p = 0.2$), ni dosis ($X^2 = 3.67$, g.l = 2, $p = 0.16$), sin embargo, el tiempo que pasaron las hembras con los machos ($X^2 = 7.80$, g.l = 1, $p = 0.005$), la interacción tratamiento*dosis ($X^2 = 6.51$, g.l = 2, $p = 0.04$) y la interacción tratamiento*tiempo ($X^2 = 4.53$, g.l = 1, $p = 0.03$) fueron significativas. El tratamiento infectado con 400 conidios y su control de 24 horas fueron diferentes: los machos control fueron más preferidos que los machos tratados con 400 conidios ($p = 0.02$; Fig. 3).

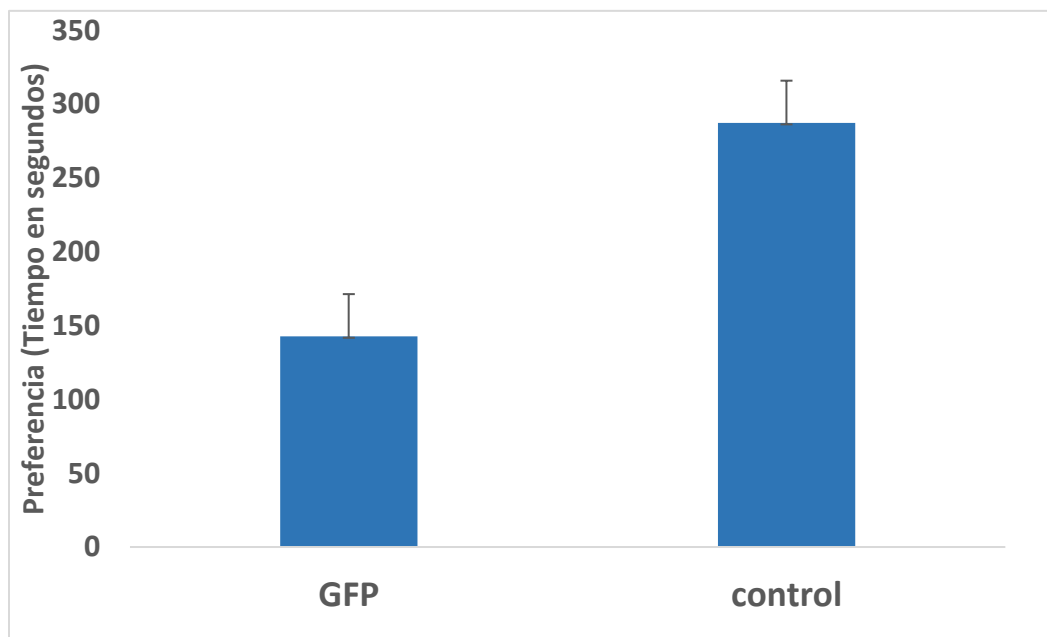


Figura 3. Se graficó la preferencia en la elección de pareja conforme el tiempo, mediante análisis de modelos lineales generalizados (Bonferroni). Las hembras prefirieron pasar más tiempo frente a los machos control, en comparación con los machos retados con 400 conidios de GFP.

5.3 Supervivencia (cepa CAT)

La probabilidad de supervivencia fue similar en el grupo infectado con la cepa CAT con una dosis de 20 conidios, en comparación al grupo control ($n = 36$, log rank test = 1.23; $p = 0.27$; Fig. 4). No obstante, el grupo infectado con una dosis de 400 conidios (CAT) tuvo una menor supervivencia, en comparación con el grupo control ($n = 29$, log rank test = 6.21; $p = 0.01$; Fig. 4). No hubo diferencias significativas entre la supervivencia de 400 conidios de GFP y 400 conidios de CAT (log rank test = 0.50, $p = 0.48$).

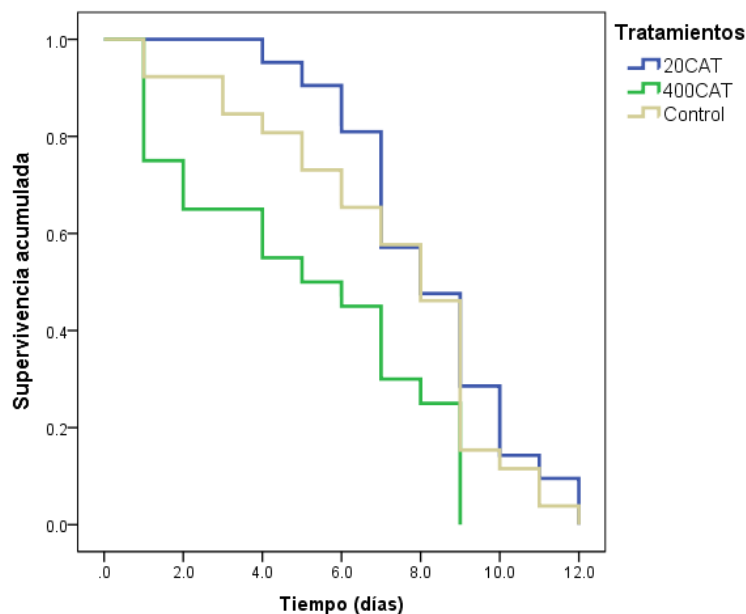


Figura 4. La grafica representa un análisis de Kaplan-Meier que evaluó la diferencia en la supervivencia con diferentes dosis en los individuos. Los adultos de *T. molitor* del grupo control vivieron más días, en comparación al grupo infectado con 400 conidios (CAT). Por otro lado, los adultos tratados con 20 conidios tuvieron una mortalidad similar al grupo control.

5.4 Elección de Pareja (**cepa CAT**)

No se encontraron diferencias significativas, con respecto al tratamiento ($X^2 = 0.84$, g.l = 1, $p = 0.36$), la interacción tratamiento*tiempo*dosis ($X^2 = 0.51$, g.l = 2, $p = 0.77$), la interacción dosis*tiempo ($X^2 = 0.15$, g.l = 2, $p = 0.93$), tiempo ($X^2 = 1.81$, g.l = 1, $p = 0.18$), la interacción tratamiento*tiempo ($X^2 = 2.26$, g.l = 1, $p = 0.13$), ni dosis ($X^2 = 0.16$, g.l = 2, $p = 0.92$). Mientras que la interacción tratamiento*dosis ($X^2 = 5.12$, g.l = 2, $p = 0.08$) mostró una cercanía a la significancia. Esto significa que los machos infectados con 20 y 400 conidios fueron igualmente atractivos que el grupo control.

Tabla 1. Se presentan los resultados de elección de pareja (tiempo que pasaron las hembras frente a los machos) con respecto al tratamiento (GFP o CAT) y la dosis de aplicación. Los asteriscos señalan los valores significativos, derivados de los modelos lineales generalizados (Bonferroni).

Tratamiento	p	n	Media del tratamiento	Error estándar del tratamiento	Media del control	Error estándar del control
(GFP; 20 conidios/ μ L)						
3hrs.	0.99	34	172.20	28.59	97.17	28.59
24hrs.	0.99	34	218.18	28.59	178	28.59
(GFP; 400 conidios/ μ L)						
3hrs.	0.99	34	149.56	28.59	134.32	28.59
24hrs.	0.02*	34	142.73	28.59	287.32	28.59
(CAT; 20 conidios/ μ L)						
3hrs.	0.99	30	238.83	35.78	118.16	35.78
24hrs.	0.99	30	196.33	35.78	159.03	35.78
(CAT; 400 conidios/ μ L)						
3hrs.	0.99	30	162.27	36.17	177.83	35.78
24hrs.	0.99	30	169.4	35.78	187.7	35.78

6. DISCUSIÓN

En general, se encontró apoyo a la hipótesis de que el tipo e intensidad de los agentes estresores favorecen la inversión terminal u honestidad de las señales. Los datos de supervivencia junto con los de elección femenina sugieren que las dosis de 20 conidios de GFP y CAT son subletales y no afectan la elección de pareja. Encontramos que 400 conidios a 3 y 24 horas mataron a los machos y mostraron inversión terminal u honestidad con la cepa GFP o CAT. Finalmente, vimos que el tiempo que transcurrió entre la infección y el cortejo a la hembra, más la interacción con la cepa, favorecieron dinamismo en la estrategia para atraer pareja: a las 24 horas con la cepa GFP observamos honestidad de la señal, y al mismo tiempo, con la cepa CAT, encontramos inversión terminal.

Los estudios de inversión terminal muestran una aparente contradicción porque en ocasiones, se observa inversión terminal u honestidad de la señal ante el ataque con patógenos o con déficit alimenticio (Sadd *et al.*, 2006; Worden & Parker, 2005; Vainikka *et al.*, 2007; Kivleniece *et al.*, 2010; Krams *et al.*, 2011; Copeland & Fedorka, 2012; Farchmin *et al.*, 2020). Dicha contradicción, sugiere que esta estrategia podría no ser de todo o nada, sino que puede ser moldeada en función de la cantidad de recursos (Javoiš, 2013; Krams *et al.*, 2015). Krams *et al.*, (2015) encontraron que los machos con restricción alimenticia invirtieron menos en la respuesta inmunitaria en comparación con los machos sin restricción alimenticia. Además, sin restricción alimenticia, los machos fueron tan atractivos como los machos control sin reto inmunitario (nylon monofilament) y no mostraron diferencias en supervivencia. Sin embargo, ante la restricción alimenticia, los machos retados vivieron

menos, pero, fueron aún más atractivos que los machos control sin reto. Este trabajo pionero sugiere un papel preponderante de la cantidad de recursos en la inversión terminal, pero nuestra investigación sugiere dos nuevos atributos: la virulencia de los patógenos y el tiempo que pasa entre la infección y el cortejo. En conjunto, estos resultados van de acuerdo con la propuesta de que la estrategia de inversión terminal depende de los costos de la reparación de daño y de los costos de la producción de feromonas (Holman, 2012; Nielsen & Holman, 2012).

En conjunto, los resultados apoyan parcialmente nuestra predicción de que la dosis de infección afecta la probabilidad de llevar a cabo inversión terminal. Los resultados de supervivencia, junto con los de elección de pareja a las 3 y 24 horas sugieren que la dosis de 20 conidios de CAT y GFP no son costosas en términos de producción de feromonas, y por esto, podría explicarse por qué los machos no invirtieron más en feromonas para atraer pareja, con respecto al grupo control sin infección. Es decir, que no tienen que invertir en la reproducción actual a costa de la reproducción futura, como lo propone la idea de la inversión terminal (Williams, 1966; Clutton-Brock, 1984). No obstante, aunque la dosis de 400 conidios con CAT y GFP sí mataron más a los machos con respecto a los machos control, tampoco observamos diferencias entre estos grupos en elección de pareja a las 3 y 24 horas. Es decir que los machos infectados simulaban ser tan atractivos como los machos sanos. Esto podría ir de acuerdo con la idea de que los machos percibieron el riesgo de morir e invirtieron en la reproducción en términos de producción de feromonas, haciendo una inversión terminal (Sadd *et al.*, 2006). Esto concuerda con que en *T. molitor*, el incremento en la activación de la respuesta inmunitaria disminuye la supervivencia de los machos y aumenta la probabilidad de realizar inversión terminal (Krams *et al.*, 2011). Cabe resaltar que nuestro estudio sugiere

inversión terminal con ambas cepas porque, aunque los machos estaban a punto de morir, los infectados dieron prioridad a la reproducción a expensas de la supervivencia y fueron tan atractivos como los machos sanos. Sería interesante analizar posteriormente si la restricción alimenticia pudiera evidenciar aún más la inversión terminal, donde los machos infectados produzcan más feromonas que los machos sanos (Krams *et al.*, 2015). Nuestro trabajo denota la importancia de que los estudios de inversión terminal registren supervivencia y elección de pareja al mismo tiempo y no solamente respuesta inmunitaria y elección. El problema es que se podría asumir que, al no ver diferencias en la elección de pareja entre machos sanos e infectados, se asuma que no hubo inversión terminal ni un efecto de los patógenos, pero al analizar supervivencia, los resultados mostrarían que los machos infectados, en realidad, mimetizaron la condición de los machos sanos.

Finalmente, podemos concluir que, existe plasticidad en las estrategias para atraer pareja: existe honestidad de las señales o inversión terminal, dependiendo de los agentes estresores. Lo interesante es que este resultado solamente fue evidente a las 24 horas y no a las 3 horas. Es posible que, a las 3 horas, en comparación con las 24 horas, los conidios apenas estén germinando dentro del insecto y la infección sería menos avanzada. De hecho, Butt *et al.*, (2013) mostraron en *Aedes aegypti* que a las 48 horas después de inocular conidios ya hay invasión de órganos con *M. anisopliae*. Además, ya en la invasión del hemocele, *Metarhizium* produce una gran cantidad de factores de virulencia que favorecen el establecimiento de la infección, y estos, poco a poco van aumentando con el tiempo (González-Hernández *et al.*, 2020; St. Leger & Wang, 2020). Esto podría sugerir que, debido al crecimiento del hongo, para los machos de *T. molitor* sería más costosa la infección a las 24 horas con respecto a las 3 horas. No obstante, algo interesante fue que, a las 24 horas, la

infección con GFP derivó en honestidad de la señal, pero con CAT, los machos lograron hacer inversión terminal. Esto, va de acuerdo con nuestras predicciones.

Existen dos hipótesis que explican qué estrategia utiliza un animal cuando ha sido infectado y posteriormente tiene un comportamiento pre-copulatorio (Duffield *et al.*, 2017; Rose *et al.*, 2022). El primer escenario es que, algunos individuos podrían invertir todos sus recursos en la producción de CSS llamativos (inversión terminal), mientras que, en el otro escenario, los individuos prioricen la inversión en la respuesta inmunitaria sobre la inversión reproductiva (Duffield *et al.*, 2017; Rose *et al.*, 2022). Ambas hipótesis gozan de sustento en insectos, aves y peces (Gustafsson *et al.*, 1994; Adamo *et al.*, 2001; Ahmed *et al.*, 2002; Ahtiainen *et al.*, 2005; Ahmed & Hurd, 2006; Rushbrook *et al.*, 2006; Velando *et al.*, 2006b; Kolluru *et al.*, 2009; Chargé *et al.*, 2010; Roberts *et al.*, 2011; Copeland & Fedorka, 2012; Stahlschmidt *et al.*, 2013; An & Waldman, 2016; Schwenke *et al.*, 2016; Clancy *et al.*, 2017; Duffield *et al.*, 2017; Wigby *et al.*, 2019; Farchmin *et al.*, 2020; Rose *et al.*, 2022). No obstante, en los machos de *T. molitor*, al encontrar a las hembras para cortejarlas 24 horas después de la infección podrían ocurrir ambas estrategias y en este caso, lo que determinaría qué estrategia usar sería la virulencia del hongo. La cepa CAT sobreexpresa el gen *cat-1* (catalasa) y la cepa GFP no sobreexpresa el gen (Morales-Hernández *et al.*, 2010a). La sobreexpresión de CAT, a diferencia de GFP, merma la respuesta inmunitaria en términos de producción de radicales libres y, al reestablecer la producción de radicales libres, los insectos combaten mejor la infección contra CAT (Medina-Gómez *et al.*, 2018). Cabe destacar que, a las 24 horas de la infección, *T. molitor* tiene un pico de activación de la respuesta inmunitaria (Haine *et al.*, 2008; Johnston *et al.*, 2014). Esto deriva en un costo metabólico (Contreras-Garduño *et al.*, 2019) y, por lo tanto, suponemos que al activar la respuesta

inmunitaria contra GFP, los machos tuvieron pocos recursos para producir feromonas y esto se convirtió en honestidad de las señales, mientras que, contra CAT, la respuesta inmunitaria se activó menos, lo que permitió que los machos realizaran inversión terminal. Si bien, esto debe ponerse a prueba posteriormente, los resultados de nuestro trabajo muestran una compleja interacción entre la virulencia del hongo, la dosis de infección y el momento en el que el macho corteja a la hembra después de la infección. Hasta donde se sabe, este es el primer trabajo de inversión terminal que muestra dicha complejidad.

Conforme a la hipótesis de que la virulencia y la dosis de infección de los parásitos modulan la estrategia de los machos para atraer pareja (señales honestas o inversión terminal), esperábamos que con la cepa virulenta y las dosis altas de ambas cepas se presentara inversión terminal. De manera general, se cumplieron nuestras predicciones porque observamos una compensación en los adultos, representada por la capacidad que tuvieron para sobrellevar la infección y aun así fueron tan preferidos como los machos sanos por parte de las hembras.

Proponemos que los estudios de conducta y supervivencia al mismo tiempo son necesarios para observar la dinámica de las estrategias masculinas para atraer pareja. Además, proponemos que distintos agentes estresores deben investigarse para determinar si existe o no, plasticidad de la estrategia masculina para atraer a la hembra, ya sea inversión terminal u honestidad de la señal.

7. REFERENCIAS

Adamo SA., Jensen M, Younger M. (2001). Changes in lifetime immunocompetence in male and female *Gryllus texensis* (formerly *G. integer*): trade-offs between immunity and reproduction. *Animal Behaviour*, 62, 417-425.

Ahmed AM., Baggott SL, Maingon R, Hurd H. (2002). The costs of mounting an immune response are reflected in the reproductive fitness of the mosquito *Anopheles gambiae*. *Oikos*, 97, 371-377.

Ahmed AM., & Hurd H. (2006). Immune stimulation and malaria infection impose reproductive costs in *Anopheles gambiae* via follicular apoptosis. *Microbes and Infection*, 8, 308-315.

Ahtiainen JJ., Alatalo RV, Kortet R, Rantala MJ. (2005). A trade-off between sexual signalling and immune function in a natural population of the drumming wolf spider *Hygrolycosa rubrofasciata*. *Journal of Evolutionary Biology*, 18, 985-991.

An, D., & Waldman, B. (2016). Enhanced call effort in Japanese tree frogs infected by amphibian chytrid fungus. *Biology Letters*, 12, 20160018.

Anaid Patiño Morales. Efecto del manejo agrícola en la elección de pareja de *Tenebrio molitor* (tesis de Licenciatura). ENES Morelia. Mexico, 2019.

Andersson M. (1994). *Sexual Selection*. Princeton University Press

Angers, B., Castonguay, E. & Massicotte, R. (2010). Environmentally induced phenotypes and DNA methylation: how to deal with unpredictable conditions until the next generation and after. *Molecular Ecology*, 19, 1283-1295.

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

Butt, T. M., Greenfield, B. P., Greig, C., Maffei, T. G., Taylor, J. W., Piasecka J., Dudley Ed, Abdulla A., Dubovskiy I. M., Garrido-Jurado I., Quesada-Moraga E., Penny M. W., & Eastwood, D. C. (2013). *Metarhizium anisopliae* pathogenesis of mosquito larvae: a verdict of accidental death. *PloS One*, 8, e81686.

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

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

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

Chargé R, Saint Jalme M, Lacroix F, Cadet A, Sorci G. (2010). Male health status, signalled by courtship display, reveals ejaculate quality and hatching success in a lekking species. *Journal of Animal Ecology*, 79, 843-850.

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

Clancy LM., Cooper AL., Griffith GW., Santer RD. (2017). Increased Male-Male Mounting Behaviour in Desert Locusts during Infection with an Entomopathogenic Fungus. *Scientific Reports*, 7, 1-7.

Clutton-Brock TH. (1984). Reproductive effort and terminal investment in iteroparous animals. *The American Naturalist*, 123, 212-229.

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

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

Contreras-Garduño, J., Méndez-López, T. T., Patiño-Morales, A., González-Hernández, G. A., Torres-Guzmán, J. C., Krams, I., Mendoza-Cuenca L., & Ruiz-Guzmán, G. (2019). The costs of the immune memory within generations. *The Science of Nature*, 106, 1-9.

Copeland, E. K., & Fedorka, K. M. (2012). The influence of male age and simulated pathogenic infection on producing a dishonest sexual signal. *Proceedings of the Royal Society B*, 279, 4740-4746.

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

Duffield, K. R., Bowers, E. K., Sakaluk, S. K., & Sadd, B. M. (2017). A dynamic threshold model for terminal investment. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 71, 1-17.

Duffield, K. R., Hunt, J., Rapkin, J., Sadd, B. M., & Sakaluk, S. K. (2015). Terminal investment in the gustatory appeal of nuptial food gifts in crickets. *Journal of Evolutionary Biology*, 28, 1872-1881.

Durso AM., & French SS. (2017). Stable isotope tracers reveal a trade-off between reproduction and immunity in a reptile with competing needs. *Functional Ecology*, 32, 648-656.

Farchmin, P. A., Eggert, A. K., Duffield, K. R., & Sakaluk, S. K. (2020). Dynamic terminal investment in male burying beetles. *Animal Behaviour*, 163, 1-7.

Godin J-GJ., & Dugatkin LA. (1996). Female mating preference for bold males in the guppy, *Poecilia reticulata*. *Proceedings of the National Academy Sciences*, 93, 10262-10267.

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

González-Hernández, G. A., Padilla-Guerrero, I. E., Martínez-Vázquez, A., & Torres-Guzmán, J. C. (2020). Virulence Factors of the Entomopathogenic Genus *Metarhizium*. *Current Protein and Peptide Science*, 21, 324-330.

Gustafsson L., Nordling D., Andersson MS., Sheldon BC., Qvarnström A., Hamilton WD., Howard JC. (1994). Infectious diseases, reproductive effort and the cost of reproduction in birds. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, 346, 323-331.

Haine, E. R., Pollitt, L. C., Moret, Y., Siva-Jothy, M. T., & Rolff, J. (2008). Temporal patterns in immune responses to a range of microbial insults (*Tenebrio molitor*). *Journal of Insect Physiology*, 54, 1090-1097.

Hamilton, W. D., & Zuk, M. (1982). Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites? *Science*, 218, 384-387.

Hansson, B. & Westerberg, L. (2002). On the correlation between heterozygosity and fitness in natural populations. *Molecular Ecology*, 11, 2467-2474.

Hegyí, G., Szollosi, E., Jenni-Eiermann, S., Torok, J., Eens, M. & Garamszegi, L.Z. (2010). Nutritional correlates and mate acquisition role of multiple sexual traits in male collared flycatchers. *Naturwissenschaften*, 97, 567-576.

Helfenstein, F., Losdat, S., Møller, A.P., Blount, J.D. & Richner, H. (2010). Sperm of colourful males are better protected against oxidative stress. *Ecology Letters*, 13, 213-222.

Hill, G. E. (2011). Condition-dependent traits as signals of the functionality of vital cellular processes. *Ecology Letters*, 14, 625-634.

Hill, G.E. & Farmer, K.L. (2005). Carotenoid-based plumage coloration predicts resistance to a novel parasite in the house finch. *Naturwissenschaften*, 92, 30-34.

Hirshfield MF., Tinkle DW. (1975). Natural selection and the evolution of reproductive effort. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72, 2227-2231.

Holman L. (2012). Costs and constraints conspire to produce honest signalling: insights from an ant queen pheromone. *Evolution*, 66, 2094-2105.

Huuskonen, H., Haakana, H. & Kekalainen, J. (2009). Offspring performance is linked to parental identity and male breeding ornamentation in whitefish. *Biological Journal of Linnean Society*, 98, 532-539.

Jacobs, A. C., Zuk, M., Demas, G. E., & Nelson, R. J. (2012). Sexual selection and parasites. *Ecoimmunology*, 468-496.

Javoš J. (2013). A two-resource model of terminal investment. *Theory in Biosciences*, 132, 123-132.

Jawor, J. M., Gray, N., Beall, S. M., & Breitwisch, R. (2004). Multiple ornaments correlate with aspects of condition and behaviour in female northern cardinals, *Cardinalis cardinalis*. *Animal Behaviour*, 67, 875-882.

Johnston, P. R., Makarova, O., & Rolff, J. (2014). Inducible defenses stay up late: temporal patterns of immune gene expression in *Tenebrio molitor*. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 4, 947-955.

Kivleniece, I., Krams, I., Daukšte, J., Krama, T., & Rantala, M. J. (2010). Sexual attractiveness of immune-challenged male mealworm beetles suggests terminal investment in reproduction. *Animal Behaviour*, 80, 1015-1021.

Kolluru GR, Grether GF, Dunlop E, South SH. (2009). Food availability and parasite infection influence mating tactics in guppies (*Poecilia reticulata*). *Behavioral Ecology*, 20, 131-137.

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

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

Kuczynski, M. C., Bello-DeOcampo, D., & Getty, T. (2015). No evidence of terminal investment in the gray treefrog (*Hyla versicolor*): older males do not signal at greater effort. *Copeia*, *103*, 530-535.

Lane, S. M., Dickinson, A. W., Tregenza, T., & House, C. M. (2016). Sexual Selection on male cuticular hydrocarbons via male–male competition and female choice. *Journal of Evolutionary Biology*, *29*, 1346-1355.

Lawniczak MKN, Barnes AI, Linklater JR, Boone JM, Wigby S, Chapman T. (2007). Mating and immunity in invertebrates. *Trends in Ecology and Evolution*, *22*, 48-55.

Lindström, K. & Lundström, J. (2000). Male greenfinches (*Carduelis chloris*) with brighter ornaments have higher virus infection clearance rate. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *48*, 44-51.

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

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

Martínez-Lendech, N., Osorio-Beristain, M., Franco, B., Pedraza-Reyes, M., Obregón, A., & Contreras-Garduño, J. (2019). Does juvenile hormone prompt oxidative stress in male damselflies? *Journal of Experimental Biology*, *222*, jeb194530.

Medina-Gómez, H., Farriols, M., Santos, F., González-Hernández, A., Torres-Guzmán, J. C., Lanz, H., & Contreras-Garduño, J. (2018). Pathogen-produced catalase affects immune priming: A potential pathogen strategy. *Microbial Pathogenesis*, 125, 93-95.

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

Méthot, P. O., & Alizon, S. (2014). What is a pathogen? Toward a process view of host-parasite interactions. *Virulence*, 5, 775-785.

Møller, A. P. (1990). Parasites and sexual selection: current status of the Hamilton and Zuk hypothesis. *Journal of Evolutionary Biology*, 3, 319-328.

Morales-Hernandez, C.E. Padilla-Guerrero, I.E. Gonzalez-Hernandez, G.A. Mougeot, F., Martinez-Padilla, J., Blount, J.D., Perez-Rodriguez, L., Webster, L.M.I. & Piertney, S.B. (2010a). Oxidative stress and the effect of parasites on a carotenoid-based ornament. *Journal of Experimental Biology*, 213, 400-407.

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

Perez-Rodriguez, L., Mougeot, F. & Alonso-Alvarez, C. (2010). Carotenoid-based coloration predicts resistance to oxidative damage during immune challenge. *Journal of Experimental Biology*, 213, 1685-1690.

- Pryke SR., Andersson S. (2003b). Carotenoid-based status signalling in red-shouldered widowbirds (*Euplectes axillaris*): epaulet size and redness affect captive and territorial competition. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 53, 393-401.
- Rantala, M. J., Jokinen, I., Kortet, R., Vainikka, A., & Suhonen, J. (2002). Do pheromones reveal male immunocompetence? *Proceedings of the Royal Society B*, 269, 1681-1685.
- Rantala, M. J., Kortet, R., Kotiaho, J. S., Vainikka, A., & Suhonen, J. (2003). Condition dependence of pheromones and immune function in the grain beetle *Tenebrio molitor*. *Functional Ecology*, 17, 534-540.
- Roberts JR, Souillard R, Bertin J. (2011). Avian diseases which affect egg production and quality. In *Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products*, 376–393. Elsevier.
- Roemer, I., Reik, W., Dean, W. & Klose, J. (1997). Epigenetic inheritance in the mouse. *Current Biology*, 7, 277–280.
- Roff DA., & Fairbairn DJ. (2007). The evolution of trade-offs: where are we? *Journal of Evolutionary Biology*, 20, 433-447.
- Rose, S., Beckwith, E. J., Burmester, C., May, R. C., Dionne, M. S., & Rezaval, C. (2022). Pre-copulatory reproductive behaviours are preserved in *Drosophila melanogaster* infected with bacteria. *Proceedings of the Royal Society B*, 289, 20220492.
- Rosenthal, G. G. (2017). *Mate choice: the evolution of sexual decision making from microbes to humans*. Princeton University Press.
- Roulin, A., Riols, C., Dijkstra, C. & Ducrest, A.L. (2001). Female plumage spottiness signals parasite resistance in the barn owl (*Tyto alba*). *Behavioral Ecology*, 12, 103-110.

Rushbrook B.J., & Barber I. (2006). Nesting, courtship and kidney hypertrophy in Schistocephalus-infected male three-spined stickleback from an upland lake. *Journal of Fish Biology*, 69, 870-882.

Ryan, M. J. (1980). Female mate choice in a neotropical frog. *Science*, 209, 523-525.

Sadd, B., Holman, H., Armitage, F., Lock, R., Marland, R. & Siva-Jothy, M. T. (2006). Modulation of sexual signalling by immune challenged male mealworm beetles (*Tenebrio molitor*, L): evidence for terminal investment and dishonesty. *Journal of Evolutionary Biology*, 19, 321e325.

Morales Hernandez, C. E., Padilla Guerrero, I. E., Gonzalez Hernandez, G. A., Salazar Solis, E., & Torres Guzman, J. C. (2010). Catalase overexpression reduces the germination time and increases the pathogenicity of the fungus *Metarhizium anisopliae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 1033-1044.

Schluter, D., Price, T. D., & Rowe, L. (1991). Conflicting selection pressures and life history trade-offs. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 246, 11-17.

Schmid-Hempel, P. (2021). *Evolutionary parasitology: the integrated study of infections, immunology, ecology, and genetics*. Oxford University Press.

Schwenke, R. A., Lazzaro, B. P., & Wolfner, M. F. (2016). Reproduction–immunity trade-offs in insects. *Annual Review of Entomology*, 61, 239.

Sharon, G., Segal, D., Ringo, J. M., Hefetz, A., Zilber-Rosenberg, I., & Rosenberg, E. (2010). Commensal bacteria play a role in mating preference of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 20051-20056.

Shilatifard, A. (2006). Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Annal Review of Biochemistry*, 75, 243-269.

St. Leger, R. J., & Wang, J. B. (2020). *Metarhizium*: jack of all trades, master of many. *Open Biology*, 10, 200307.

Stahlschmidt ZR, Rollinson N, Acker M, Adamo SA. (2013). Are all eggs created equal? Food availability and the fitness trade-off between reproduction and immunity. *Functional Ecology*, 27, 800-806.

Stearns SC. (1989). Trade-offs in life-history evolution. *Functional Ecology*, 3, 259-268.

Vahed, K. (2007). All that glitters is not gold: sensory bias, sexual conflict and nuptial feeding in insects and spiders. *Ethology*, 113, 105-127.

Vainikka A, Rantala MJ, Seppala O, Suhonen J. (2007). Do male meal-worm beetles, *Tenebrio molitor*, sustain the honesty of pheromone signals under immune challenge? *Acta Ethologica*, 10, 63-72.

Vainikka, A., Seppälä, O., Löytynoja, K., & Rantala, M. J. (2006). Fitness consequences of female preference for male pheromones in *Tenebrio molitor*. *Evolutionary Ecology Research*, 8, 943-957.

Van Driesche, R., & Hoddle, M. (2009). Control of pests and weeds by natural enemies: an introduction to biological control. John Wiley and Sons.

Van Oort, H., & Dawson, R. D. (2005). Carotenoid ornamentation of adult male Common Redpolls predicts probability of dying in a salmonellosis outbreak. *Functional Ecology*, 19, 822-827.

Velando, A., Drummond, H., & Torres, R. (2006b). Senescent birds redouble reproductive effort when ill: confirmation of the terminal investment hypothesis. *Proceedings of the Royal Society B*, 273, 1443-1448.

Velando, A., Beamonte-Barrientos, R., & Torres, R. (2006a). Pigment-based skin colour in the blue-footed booby: an honest signal of current condition used by females to adjust reproductive investment. *Oecologia*, 149, 535-542.

Von Schantz, T. V., Bensch, S., Grahn, M., Hasselquist, D., & Wittzell, H. (1999). Good genes, oxidative stress and condition-dependent sexual signals. *Proceedings of the Royal Society B*, 266, 1-12.

Wigby, S., Suarez, S. S., Lazzaro, B. P., Pizzari, T., & Wolfner, M. F. (2019). Sperm success and immunity. *Current Topics in Developmental Biology*, 135, 287-313.

Williams, G. C. (1966). Natural selection, the costs of reproduction, and a refinement of Lack's principle. *The American Naturalist*, 100, 687-690.

Worden, B. D., & Parker, P. G. (2005). Females prefer noninfected males as mates in the grain beetle *Tenebrio molitor*: evidence in pre- and postcopulatory behaviours. *Animal Behaviour*, 70, 047-1053.

Zahavi, A. (1975). Mate selection—a selection for a handicap. *Journal of Theoretical Biology*, 53, 205-214.

Zahavi A. (1977). The cost of honesty: further remarks on the handicap principle. *Journal of Theoretical Biology*, 67, 603-605.

Zera, A. J., & Harshman, L. G. (2001). The physiology of life history trade-offs in animals. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 32, 95-126.

