



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Escuela Nacional de Estudios
Superiores, Unidad Morelia

LICENCIATURA EN ECOLOGÍA

IMPORTANCIA DE LA FASE DEL
DESARROLLO EN LOS COSTOS Y
BENEFICIOS DE LA MEMORIA INNATA
TRANSGENERACIONAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADA EN ECOLOGÍA

P R E S E N T A

FERNANDA VÁZQUEZ FUERTE

DIRECTOR DE TESIS: DR. JORGE ALBERTO CONTRERAS GARDUÑO

MORELIA, MICHOACÁN

ABRIL, 2023



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

LICENCIATURA EN ECOLOGÍA

Escuela Nacional de Estudios Superiores,
Unidad Morelia

IMPORTANCIA DE LA FASE DEL
DESARROLLO EN LOS COSTOS Y
BENEFICIOS DE LA MEMORIA INNATA
TRANSGENERACIONAL

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADA EN ECOLOGÍA

P R E S E N T A

FERNANDA VÁZQUEZ FUERTE

DIRECTOR DE TESIS: DR. JORGE ALBERTO CONTRERAS GARDUÑO

MORELIA, MICHOACÁN

ABRIL, 2023



ESCUELA
NACIONAL
de ESTUDIOS
SUPERIORES
ENES

10
años
(2011-2021)

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

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

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la **sesión ordinaria 02** del **Comité Académico** de la **Licenciatura en Ecología** de la Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES) Unidad Morelia, celebrada el día **20 de febrero de 2023**, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para la presentación del Trabajo Profesional de la alumna **Fernanda Vázquez Forte** de la Licenciatura en **Ecología**, con número de cuenta **418127627**, con el trabajo titulado: **"Importancia de la fase del desarrollo en los costos y beneficios de la memoria Innata transgeneracional"**, bajo la dirección como tutor del **Dr. Jorge Alberto Contreras Garduño**.

El jurado queda integrado de la siguiente manera:

Presidente:	Dra. Ek del Val de Gortari
Vocat:	Dr. Rodrigo Macip Ríos
Secretario:	Dr. Jorge Alberto Contreras Garduño
Suplente:	Dr. Joel Edmundo López Mesa
Suplente:	Dr. Cuauhtémoc Juan Humberto Lanz Mendoza

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Morelia, Michoacán a 30 de marzo de 2023.

DRA. YUNUEN TAPIA TORRES
SECRETARIA GENERAL

CAMPUS MORELIA

Antigua Carretera a Pátzcuaro N° 8701, Col. Ex Hacienda de San José de la Huerta
58190, Morelia, Michoacán, México. Tel: (443) 689.3500 y (55) 5623.7300. Extensión Red UNAM: 806 14
www.enesmorelia.unam.mx

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Agradezco a la Licenciatura en Ecología y a todo el cuerpo docente que la conforma por haberme brindado conocimientos, orientación, e inspiración para mi formación completa como ecóloga.

El proyecto fue financiado por PAPIIT (IN225120).

Al Dr. Francisco Espinosa García, a la Lic. Yolanda García Rodríguez y a la Lic. María de la Luz Sierra Ruíz del Laboratorio de Ecología Química del Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad de la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme recibido en su laboratorio para colaborar y asesorarme en la colecta en campo, mantenimiento de la colonia e identificación de los instares larvales de *Spodoptera frugiperda*.

Al Dr. Juan Carlos Torres Guzmán y a la Dra. Angélica Hernández del Laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Biología de la Universidad de Guanajuato por haber proporcionado las cepas del hongo *Metarhizium brunneum* para realizar el experimento.

Al M. en C. Daniel del Laboratorio de Ecología Evolutiva de la Escuela Nacional de Estudios Superiores por haber gestionado el material del laboratorio y por su colaboración en el conteo de conidios.

A mis sinodales, al Dr. Jorge Alberto Conteras Garduño, al Dr. Joel Edmundo López Meza, a la Dra. Ek del Val de Gortari, al Dr. Rodrigo Macip Ríos y al Dr. Cuauhtémoc Juan Humberto Lanz Mendoza, por el tiempo que invirtieron en la revisión y por sus comentarios que enriquecieron mi proyecto de tesis.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi familia por apoyarme y confiar plenamente en mis primeros pasos en el camino de la ciencia.

A todas las amistades que me acompañaron durante la carrera. Sin duda, disfruté demasiado esta etapa y fue enriquecida, particularmente por las amistades de mi generación, pero también de otras carreras, así como de las amistades que formé haciendo deporte.

Agradezco infinitamente a mis compañeros y compañeras del Laboratorio de Ecología Evolutiva. En especial porque nos estuvimos acompañando durante nuestros procesos de titulación y compartimos conocimientos, experiencias y sentimientos muy similares.

No terminaría de nombrar a todas las personas con las que estoy agradecida por haberme acompañado durante la Licenciatura y la titulación. Millones de gracias por haber compartido todo tipo de experiencias conmigo y sobre todo por haber confiado en mí.

Contenido

RESUMEN	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUCCIÓN	9
2. HIPÓTESIS Y PREDICCIONES	19
3. OBJETIVO	19
4. MÉTODOS	20
4.1. MODELO DE ESTUDIO	20
4.2. DISEÑO EXPERIMENTAL	21
4.2.1. ACTIVACIÓN DE LA MEMORIA INMUNITARIA EN PADRES	22
4.2.2. MEMORIA INNATA TRANSGENERACIONAL	24
4.3. DEFENSA EN LA MEMORIA TRANSGENERACIONAL	25
4.3.1. RESPUESTA INMUNITARIA	25
4.3.2. DEFENSA ANTIOXIDANTE	27
4.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	30
5. RESULTADOS	32
5.1. ACTIVACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNITARIA INNATA (PADRES)	32
5.2. MEMORIA INNATA TRANSGENERACIONAL	36
5.3. DEFENSA EN MEMORIA INNATA TRANSGENERACIONAL	45
6. DISCUSIÓN	52
7. REFERENCIAS	60
8. APÉNDICE	72

Resumen

La plasticidad en el desarrollo es crucial en la adecuación porque las distintas fases del desarrollo pueden responder de forma diferente a la misma presión selectiva. Sin embargo, dependiendo de la etapa de desarrollo que sea blanco de la selección, la plasticidad puede ser costosa. Por ejemplo, se sabe poco sobre el costo evolutivo de la memoria inmunitaria innata en el desarrollo y en la plasticidad. No se sabe si la memoria innata transgeneracional depende de la etapa de desarrollo que enfrentan los padres y su descendencia. Por lo tanto, se investigó esta pregunta en el insecto *Spodoptera frugiperda* frente al hongo entomopatógeno *Metarhizium brunneum*. Usando un diseño dividido, tanto los padres como las madres recibieron un desafío subletal con 5 conidios de *M. brunneum* en la etapa L5 o L6, y sus larvas recibieron una dosis de 2000 conidios en la etapa L5 o L6. Los resultados mostraron que la activación de la respuesta inmunitaria de los padres en la etapa L5 o L6 no afectó la supervivencia, el desarrollo o la reproducción. Sin embargo, el grupo de memoria (un desafío homólogo con *M. brunneum*), desafiado en la etapa L5, vivió más que el resto de los individuos con el desafío heterólogo en la etapa L5 o L6, y que los individuos con el desafío homólogo en la etapa L6. En cambio, en la etapa L6, la descendencia no mostró diferencias significativas en supervivencia entre los grupos desafiados (heterólogo y homólogo). Además, ninguna de las larvas de la descendencia desafiadas en la etapa L6 alcanzó la etapa adulta. En cuanto al desarrollo, no hubo diferencias significativas entre los grupos desafiados (homólogos y heterólogos) en la etapa L5 ni en la etapa L6. Los resultados revelan que la memoria inmunitaria transgeneracional depende de la etapa larvaria infectada, y que la memoria es más probable que se establezca en la etapa L5. Además, si el desafío inmunológico y la memoria ocurren cerca de la pupa (etapa L6), las larvas incurren en el costo de no llegar a la edad adulta. Por lo tanto, la etapa ontogénica del insecto podría determinar el alcance de la memoria inmunitaria innata.

Abstract

Developmental plasticity is a crucial trait that enhances fitness in organisms. However, the costs associated with development and plasticity can vary depending on the developmental stage affected by selective pressures. For example, the evolutionary costs of innate immune memory on development and plasticity are still largely unknown. For instance, it remains unclear whether transgenerational innate memory is dependent on the developmental stage when parents and offspring are challenged. This thesis investigates this question in the lepidopteran species *Spodoptera frugiperda* in response to the fungus *Metarhizium brunneum*. Using a split design, both fathers and mothers received a sublethal challenge with 5 *M. brunneum* conidia at stage 5 or 6, and their larvae received a dose of 2000 conidia at stage L5 or L6. The results indicate that the activation of the immune response of parents at instars L5 or L6 did not have a significant impact on their survival, development, or reproduction. However, in offspring, survival was higher in the memory groups (homologous challenge with *M. brunneum*) challenged at L5 than in other organisms with heterologous challenge at L5 or homologous challenge at L6. None of the larvae challenged at L6 reached the adult stage. The study also revealed that the L5-challenged memory group took longer to reach adulthood than the control group, but the L6-challenged larvae (homologous or heterologous) did not reach adulthood. These results suggest that transgenerational immune memory depends on the larval stage infected and that memory is likely to occur at instar 5. Additionally, if the immune challenge and memory occur closer to pupation (instar L6), the larvae incur the cost of not reaching adulthood. Therefore, the extent of immune memory in insects is likely to be determined by their development.

1. Introducción

En la naturaleza, los insectos se encuentran constantemente expuestos a patógenos y parásitos. La colonización de distintos hábitats por parte de los insectos, en parte se ha atribuido a su gran capacidad de enfrentar las infecciones (Siva-Jothy *et al.*, 2005; Schmid-Hempel, 2005; Sheehan *et al.*, 2018). Las primeras líneas de defensa contra infecciones son la conductual y la fisicoquímica. La conductual incluye, por ejemplo, evitar el alimento infectado (Siva-Jothy *et al.*, 2005) y la defensa fisicoquímica, incluye la superficie cuticular externa y el revestimiento de tráqueas, el canal alimentario y/o los conductos reproductivos. Si estas barreras no son suficientes, los agentes extraños se encuentran con un sistema clave de defensa del hospedero: la respuesta inmunitaria (Moret & Moreau, 2012). El sistema inmunitario es un conjunto de células y moléculas que mantienen la integridad de un individuo ante el ataque de patógenos o parásitos (Cadavid, 2009). En las interacciones parásito-hospedero, los hospederos han evolucionado estrategias de respuesta inmunitaria que les permiten defenderse de los patógenos (Sheldon & Verhulst, 1996). De esta forma, reducen los costos que imponen los parásitos en la adecuación del hospedero mediante la optimización de la respuesta inmunitaria (Lanz-Mendoza & Contreras-Garduño, 2018). Aunque los mecanismos podrían variar filogenéticamente, en general, el sistema inmunitario distingue lo propio de lo ajeno.

La diferencia en la respuesta inmunitaria de vertebrados e invertebrados consiste en que los vertebrados poseen tanto inmunidad innata como adaptativa. Esta respuesta adaptativa se basa en el reordenamiento somático de los receptores

de antígenos y en la formación de células B que portan inmunoglobulina y de células T que portan receptores de células T (TCR) (Flajnik, 2002). Los anticuerpos producen células que reconocen a los patógenos y, después de un segundo encuentro, la respuesta es más rápida y se mantiene por toda la vida del organismo (Farber *et al.*, 2016). Los compuestos antes mencionados están conservados a lo largo del linaje de los vertebrados, pero, en los vertebrados sin mandíbula (agnatos) hay compuestos homólogos, que no pertenecen a la superfamilia de inmunoglobulinas, pero también generan diversidad de reconocimiento y favorecen la memoria (Pancer *et al.*, 2004).

Se pensaba que los invertebrados únicamente dependían de la inmunidad innata (Siva-Jothy *et al.*, 2005), misma que se activa cuando los receptores que se codifican en la línea germinal reconocen y se unen a las características moleculares conservadas de un patógeno o parásito (Melcarne *et al.*, 2019). El sistema inmunitario innato en invertebrados es muy diverso: en cada linaje se pueden encontrar componentes inmunitarios celulares y/o humorales específicos (Loker *et al.*, 2004). La defensa celular está mediada por los hemocitos, existen hemocitos especializados en la fagocitosis, nodulación y encapsulación; esta respuesta se inicia de forma inmediata una vez que la infección es detectada (Strand, 2008; Browne *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2018). La defensa humoral implica la activación de precursores de moléculas como la profenoloxidasa (PPO) (Sugumaran & Barek, 2016), la producción de receptores de reconocimiento de patrones humorales (PRR) y enzimas líticas, y las especies reactivas de oxígeno (ERO) o nitrógeno (ERN). También, hay componentes conservados evolutivamente, como son las vías

inmunitarias Toll e IMD, que derivan en la producción de péptidos antimicrobianos (AMP) (Mylonakis *et al.*, 2016). La vía Toll por lo regular es activada por bacterias Gram (+), levaduras y hongos, mientras que la vía IMD, usualmente se activa por bacterias Gram (-) (Lemaitre & Hoffmann, 2007). Es importante tener en cuenta que diversos factores humorales afectan las funciones celulares y que los hemocitos también producen algunas moléculas humorales (Zhang *et al.*, 2021; Eleftherianos *et al.*, 2021). Además, las vías IMD y Toll pueden estar interconectadas (Tanji *et al.*, 2007; Nashide *et al.*, 2019).

Otra parte fundamental de la respuesta inmunitaria innata es la defensa antioxidante. El estrés fisiológico ante una enfermedad puede desbalancear la homeostasis y provocar estrés oxidante. El estrés oxidante rompe la dinámica de equilibrio y se producen más especies reactivas de oxígeno (ROS) que antioxidantes. Este desbalance, resulta en el daño oxidativo de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos; dañando a su vez las funciones de las células, los órganos o de todo el organismo, lo que puede llevar a la muerte (Kodrík *et al.*, 2015). Todos estos efectos citotóxicos de los ROS son neutralizados por mecanismos de detoxificación enzimáticos y no enzimáticos (Fridovich, 2004). La mitocondria es el sitio en el que se producen los radicales de anión superóxido (O_2^-) como resultado de la respiración; aunque, también pueden ser producidos durante la fagocitosis. La enzima antioxidante superóxido dismutasa (SOD) convierte el radical anión superóxido en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual puede atravesar la membrana plasmática por difusión (Dupuy *et al.*, 1991). El H_2O_2 también puede ser producido de forma endógena en los peroxisomas y ser neutralizado por enzimas

antioxidantes como glutatión peroxidasa, tiorredoxina y catalasa (Zug & Hammerstein, 2015). Debido a esta naturaleza citotóxica, los ROS también forman parte del sistema inmunitario. Están involucrados en la encapsulación, melanización, autofagia, en las vías de Toll, IMD y DUOX, protegiendo al hospedero de bacterias Gram (+) y Gram (-), hongos, levaduras y protozoarios (Nappi & Vass, 1998; Carter & Hurd, 2010; Buchon *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2003). La respuesta inmunitaria innata posee una gran intercomunicación entre sus componentes y estas distintas respuestas en conjunto defienden al hospedero contra una gran diversidad de patógenos (Zug & Hammerstein, 2015).

Dado que los invertebrados no presentan una memoria específica basada en inmunoglobulinas, por mucho tiempo se asumió que los vertebrados eran los únicos que poseían memoria inmunitaria (Siva-Jothy *et al.*, 2005). No obstante, recientemente se ha demostrado contundentemente que los invertebrados poseen dicha memoria, aunque no produzcan anticuerpos (Lanz-Mendoza & Contreras-Garduño, 2018; 2022). De acuerdo con Milutinovic & Kurtz (2016), en la memoria inmunitaria se utiliza información de un primer encuentro con los enemigos o agentes extraños, y en encuentros específicos recurrentes, el sistema inmunitario responde de forma más rápida y efectiva. Por lo tanto, hay una protección mejorada del hospedero después de una exposición previa y específica a patógenos, y esto se observa en una mayor supervivencia, una reducción de la infección y un aumento de la respuesta inmunitaria (Kurtz & Franz, 2003). En invertebrados, se denomina *memoria innata* y se ha propuesto que debe reunir los siguientes atributos (Contreras-Garduño *et al.*, 2016): I) *resistencia específica*, es decir, que el

hospedero distinga entre patógenos a nivel de especie o cepa; II) *protección de larga duración*, es decir que pueda persistir durante la mayor parte de la vida del organismo o que sea transmitida a la progenie; y, III) *respuesta inmunitaria bifásica*, en donde ante un primer desafío, la respuesta inmunitaria debe incrementar, después regresar a sus niveles basales y ante un segundo desafío, la respuesta incrementa aún más que en el primer desafío (Kurtz, 2005; Brehélin & Roch, 2008; Schmid-Hempel, 2011).

El primer estudio donde se demostró la memoria inmunitaria innata fue realizado por Kurtz & Franz (2003). En dicho estudio, dos grupos del crustáceo *Macrocyclus salbidus* fueron retados contra la tenia *Schistocephalus solidus* y tres días después, un grupo fue retado con un parásito genéticamente similar (hermanos) y el otro grupo con un parásito distinto (sin relación genética cercana, no hermanos). Sus resultados indican que la reinfección y la intensidad de reinfección con *S. solidus* fueron menores en los crustáceos desafiados por parásitos similares que en el grupo con parásitos genéticamente distintos. Otro estudio clave fue el de Little *et al.* (2003), quienes indicaron que la protección después de un segundo desafío es específica y la inmunidad se puede transferir a la descendencia. Por ejemplo, las hembras de *Daphnia magna* fueron expuestas a cepas de *Pasteuria ramosa* y su descendencia fue dividida en dos grupos, un grupo fue retado con la misma cepa (desafío homólogo) y el otro con una cepa distinta (desafío heterólogo). Sus resultados indicaron que, en los grupos con un desafío homólogo, el número de descendientes producidos por día aumentó en comparación con el grupo del desafío heterólogo. En *Tribolium castaneum*, la

inoculación de padres con *Bacillus thuringiensis* muertos por calor protegió a la primera y segunda generación de descendientes. Sin embargo, en este estudio, también encontraron que hubo costos en la primera generación, ya que produjeron menos descendientes (Schulz *et al.*, 2019). La evidencia en conjunto sugiere que los rasgos de la memoria inmunitaria innata se pueden transferir generacionalmente, aunque ésta, sea costosa.

Ahora se sabe que la memoria inmunitaria innata ocurre en distintas especies de invertebrados (Lanz-Mendoza & Contreras-Garduño, 2022) y que sus efectos pueden extenderse a las siguientes generaciones, protegiendo a la descendencia en contra de los patógenos que infectaron los padres (Pigeault *et al.*, 2016; Tetreau *et al.*, 2019). Cabe resaltar que no todos los estudios actuales prueban que hay memoria innata, y tal vez, esto dependa del contexto ecológico y de su historia evolutiva (Contreras-Garduño *et al.*, 2016; Dhinaut *et al.*, 2018). Además, no hay una respuesta específica para todos los parásitos, por lo que la memoria inmunitaria podría estar restringida a solo ciertos parásitos, lo que no sucede en la memoria adaptativa de vertebrados (Dubuffet *et al.*, 2015). En particular, es posible que los parásitos o patógenos más virulentos eviten la respuesta inmunitaria, y así, la de memoria (Contreras-Garduño *et al.*, 2016). Incluso, si son afectados por diferentes parásitos a lo largo de sus vidas, es probable que no exista memoria inmunitaria innata por el alto costo que implicaría generarla y no utilizarla. Sin embargo, si el hospedero enfrenta constantemente a los mismos parásitos, podría favorecerse la memoria innata (Contreras-Garduño *et al.*, 2016).

Respecto a los costos evolutivos de la memoria inmunitaria, existe poca

evidencia de que la memoria afecte, por ejemplo, la reproducción, el tiempo de desarrollo del hospedero, la masa corporal o el metabolismo (Contreras-Garduño *et al.*, 2016). Incluso, los costos podrían solo verse en las siguientes generaciones y no solamente en los padres (Schulz *et al.*, 2019). Hasta ahora, se sabe que las hembras del mosquito *Anopheles albimanus* que presentan memoria innata, en comparación con las hembras control, tienen un menor éxito en la eclosión (Contreras-Garduño *et al.*, 2014). Además, Contreras-Garduño *et al.* (2019) reportaron que las larvas de *Tenebrio molitor* que tuvieron memoria innata contra *M. brunneum*, presentaron una mayor tasa metabólica y pasaron más tiempo en el estadio larval que el grupo control. Finalmente, al llegar a la fase adulta, las hembras y los machos sin memoria (sin infección), tuvieron una mayor probabilidad de rechazar el apareamiento con los individuos que realizaron memoria innata en su etapa juvenil. Roth *et al.* (2010) reportaron que ambos padres contribuyen a la memoria de su descendencia, pero por parte de las madres, los costos se reflejaron en un tiempo más largo de desarrollo, y por parte de los padres, se presentó en una menor fecundidad. Se ha considerado costoso que los individuos tarden más en desarrollarse debido a que pueden tener un menor tamaño, por ejemplo, durante el estadio larval (Trauer & Hilker, 2013). Incluso si larvas de menor tamaño también son adultos pequeños, podrían además tener costos en reproducción en comparación con adultos de mayor tamaño (Koella & Boëte, 2002).

Es importante destacar que no solamente se ha visto que los individuos que generan memoria innata retrasan su tiempo de desarrollo, también pueden acelerarlo. Carmona *et al.* (2022) reportaron que los individuos del hemíptero

Rhodnius prolixus que tuvieron un reto dual con la cepa Dm28c de *Trypanosoma cruzi* tuvieron una mayor probabilidad de ecdisis en comparación con los individuos control, aunque no encontraron evidencia de memoria con esta cepa. La hipótesis de *bet-hedging*, propone que los ambientes impredecibles aumentan la probabilidad de que los individuos expresen un fenotipo que será adaptativo en un ambiente futuro. Esta estrategia se asocia con los cambios en el tiempo de desarrollo solo si la reproducción es favorecida. En los trabajos de memoria hasta el momento han detectado cambios en el tiempo de desarrollo, sin embargo, para poder proponer que es un costo o una estrategia de *bet-hedging* se deberían analizar los efectos de la memoria a través de las generaciones (Beaumont, *et al.*, 2009; Menu, *et al.*, 2010). Estos trabajos sugieren que la memoria inmunitaria en la etapa juvenil afecta el desarrollo y la reproducción dentro de las generaciones, e incluso, afecta a la descendencia.

En cuanto a cómo varía la memoria innata dependiendo de la etapa de desarrollo, Khan *et al.* (2016) encontraron que las diferencias en la memoria innata se deben al sexo o al estadio de desarrollo en el coleóptero *T. castaneum*. En donde determinaron que la memoria innata, inducida con un reto subletal en el estadio larval y uno letal en los adultos, confiere una mejor protección contra el patógeno *B. thuringiensis* en comparación con la memoria inducida con dos retos en el estadio larval o con memoria transgeneracional. Con estos resultados, propusieron que los costos y los mecanismos de la memoria innata también podrían variar en función del estadio de desarrollo. Además, se han realizado modelos teóricos, en donde se predice que los beneficios de la memoria innata están influenciados por las

disyuntivas reproductivas y por el desarrollo (Tate & Rudolf, 2012). Se sabe que, en una misma especie, en diferentes estadios se ocupan nichos ecológicos distintos, además tienen diferentes tasas de exposición a parásitos y patógenos, diferente inversión en la inmunidad, diferentes tasas de transmisión y distinta mortalidad por enfermedades (Tate & Rudolf, 2012). Incluso, en algunos sistemas se ha visto que diferentes instares larvales varían en su susceptibilidad a la infección (Boots, 2004). Sin embargo, aún no se ha evaluado como varían los costos de la memoria innata, tanto dentro como entre generaciones, si se retan a los individuos en diferentes instares larvales.

En el género *Spodoptera* (Lepidoptera:Noctuidae), la memoria inmunitaria innata y sus costos están poco estudiados. Por ejemplo, Wilson & Graham (2015) indagaron la protección de la descendencia a través de las generaciones en *S. littoralis*. Retaron larvas contra el mismo nucleopoliedrovirus al que enfrentaron sus padres. Reportaron efectos denso-dependientes, ya que, las larvas criadas de forma gregaria tuvieron una mayor tasa de supervivencia después del reto inmunitario en comparación con las larvas criadas solitariamente. Incluso, encontraron un posible costo transgeneracional, debido a que las larvas de los padres criados gregariamente tuvieron una menor tasa de supervivencia después de la infección. Posteriormente, Wilson *et al.* (2021) pusieron a prueba la memoria innata transgeneracional en *S. exempta* contra un virus dsADN, que de hecho es su virus endémico, SpexNPV. Su objetivo fue analizar el efecto de inocular diferentes dosis del virus en la memoria innata transgeneracional. Sus resultados indicaron que la descendencia de padres retados con dosis virales bajas tuvo memoria innata,

mientras que la descendencia retada con dosis virales altas fue más susceptible al virus. Incluso, indicaron que murió la mayoría de descendencia de este último grupo por la transmisión vertical y no por el segundo reto. Esto significa que no son claros los costos transgeneracionales. Hasta ahora son los dos únicos estudios en donde se pone a prueba la memoria innata en el género. Aun no se sabe si *S. frugiperda* posee memoria inmunitaria innata, y de presentarse, si existen costos en términos de reproducción y del desarrollo, entre y a través de las generaciones. El objetivo de este trabajo fue analizar los costos y los beneficios de la memoria innata transgeneracional en *S. frugiperda* dependiendo del estadio del desarrollo.

2. Hipótesis y predicciones

- a) A pesar de tener beneficios, la memoria innata transgeneracional tiene costos. Se predice que los costos se verán reflejados cuando padres e hijos son retados en etapas jóvenes (L5), ya que retrasarán el desarrollo, disminuirán el éxito reproductivo y la supervivencia en comparación con padres e hijos retados en un estadio más cercano a pupar.
- b) De acuerdo con la hipótesis de *bet-hedging*, se plantea que la memoria innata transgeneracional provee beneficios cuando padres e hijos son retados en un estadio cercano a pupar (L6). Se predice que padres e hijos retados en un estadio más cercano a pupar, acelerarán el tiempo de desarrollo, tendrán una mayor supervivencia y un mayor éxito reproductivo que padres e hijos retados en estadios más juveniles.

3. Objetivo

Determinar si hay costos y beneficios diferentes dependiendo del instar en el que se induce la memoria innata transgeneracional en *S. frugiperda*.

3.1 Objetivos específicos

1. Determinar las diferencias en la supervivencia y el tiempo en días que pasan los individuos en cada fase de desarrollo (larva, pupa y adulto) entre las etapas L5 y L6.
2. Analizar la respuesta inmunitaria innata en la descendencia de las etapas L5 y L6 con los parámetros de proteína, actividad lítica, actividad de la fenoloxidasa, capacidad antioxidante total, catalasa, peróxido de hidrógeno y superóxido dismutasa en la hemolinfa.

4. Métodos

4.1. Modelo de estudio

Spodoptera frugiperda Smith (Lepidoptera:Noctuidae), comúnmente es conocida como gusano cogollero, se distribuía originalmente en regiones tropicales y subtropicales en América, sin embargo, actualmente ha invadido todos los continentes (Pogue, 2002; Wan *et al.*, 2021). Es un insecto generalista que se alimenta principalmente de gramíneas como los cultivos de maíz, sorgo, algodón y arroz, pero se han reportado más de 300 especies de plantas de las cuales puede alimentarse (Casmuz *et al.*, 2010; Goergen *et al.*, 2016; Deshmusk *et al.*, 2018). Los enemigos naturales de esta especie incluyen bacterias, hongos, nemátodos, parasitoides (Molina-Ochoa *et al.*, 2003). El ciclo de vida dura aproximadamente 35 días; los huevos tardan aproximadamente tres días en eclosionar, una vez que son larvas pasan por seis instares hasta llegar a pupa, cuya fase dura cerca de siete días y finalmente, emergen los adultos y pasan en esta fase 9 días (Schmidt-Duran *et al.*, 2015). Para poner a prueba las hipótesis, se usaron larvas de los últimos dos instares previos a la pupa: L5 y L6. Las larvas fueron alimentadas con una dieta artificial a base de harina de maíz y durante el estadio adulto, se les proporcionó agua con miel al 10%. Se mantuvieron en una incubadora a 25 ± 2 °C y con un fotoperiodo 12:12 horas en el estadio larval y los adultos se mantuvieron en un cuarto oscuro (Goh *et al.*, 1990; de la Luz Sierra-Ruíz, *et al.*, 2022) en el insectario Maria Sibylla Merian de la Escuela Nacional de Estudios Superiores, Unidad Morelia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

4.2. Diseño experimental

Se realizó un experimento piloto para determinar la dosis letal de 100% y una subletal de entre el 20% y 30% de mortalidad (Medina-Gómez *et al.*, 2018). Las dosis se obtuvieron a partir de dos cepas del hongo entomopatógeno *Metarhizium brunneum*: la cepa *Cherry* que tiene un marcador fluorescente rojo, y la cepa GFP, con un marcador fluorescente verde. Con estos marcadores se puede identificar la infección en un microscopio de fluorescencia. Las cepas del hongo se proporcionaron por el Laboratorio de Genética Molecular de la Universidad de Guanajuato. Previamente, ya se había determinado que no existen diferencias en supervivencia entre las cepas *Cherry* y GFP (Castro-Vargas *et al.*, 2017).

Para obtener la dosis subletal y letal se utilizaron 274 larvas de cada instar (L5 y L6), y en ambos instares las larvas se dividieron en cuatro grupos, tres de ellos fueron inyectados con 1 μ L de distintas concentraciones de la cepa *Cherry* del hongo *M. brunneum* diluido en Tween 80 (0.001%); que corresponden a 5, 200 o 2,000 conidios/ μ L, más un control en donde se inyectó 1 μ L de Tween 80. Las larvas fueron inyectadas entre el sexto y séptimo segmento abdominal con una microjeringa de 10 μ L (Hamilton). Después de inyectar a las larvas, estas se mantuvieron de forma individual en cajas de 24 pozos con alimento. Se registró la supervivencia diariamente, así como el tiempo de desarrollo que transcurrió entre cada estadio. Se determinó que la dosis subletal fue la de 5 conidios/ μ L y la letal de 2,000 conidios/ μ L (**figuras A1 y A2**).

4.2.1. Activación de la memoria inmunitaria en padres

Se evaluó la memoria innata transgeneracional mediante un experimento de dos fases. En la primera fase del experimento se activó la respuesta inmunitaria con una dosis subletal de la cepa GFP en los padres (f_0). Se tuvieron dos grupos experimentales de larvas, uno de memoria y otro control ($N = 383$). Estas larvas fueron inoculadas en el instar larval L5 o L6. En el primer reto, los individuos del grupo de memoria fueron inoculados con (etapa L5, $n = 95$; etapa L6, $n = 96$) y a los individuos del grupo control, se les inyectó 1 μL de Tween 80 (etapa L5, $n = 96$; etapa L6, $n = 96$). Las larvas se mantuvieron individualmente en cajas de 24 pozos con alimento hasta el estadio de pupa, en donde los individuos fueron sexados, posteriormente se trasladaron a envases de plástico. En cada envase se colocó una pareja, formada aleatoriamente de cada tratamiento (hembras/machos de memoria, y hembras/machos control). Una vez que pasaron al estadio adulto se les proporcionó una solución de agua mezclada con miel al 10% en un algodón y trozos doblados de papel encerado para la oviposición, mismos que fueron cambiados diariamente. Las puestas de huevos fueron separadas de los adultos y cuando eclosionaron las larvas se mantuvo a la descendencia de cada pareja con dieta artificial en condiciones controladas. Se registró la supervivencia y el tiempo que transcurrió en cada estadio (**figura 1**). Se confirmó con un microscopio de fluorescencia que la infección en la descendencia de los tratamientos homólogos se debió solamente al hongo con la cepa Cherry. Esto es relevante debido a que se aseguró que los efectos que se observaron en los resultados se debieron a la infección con la dosis letal y no al traslape de infecciones (**figura A3**).

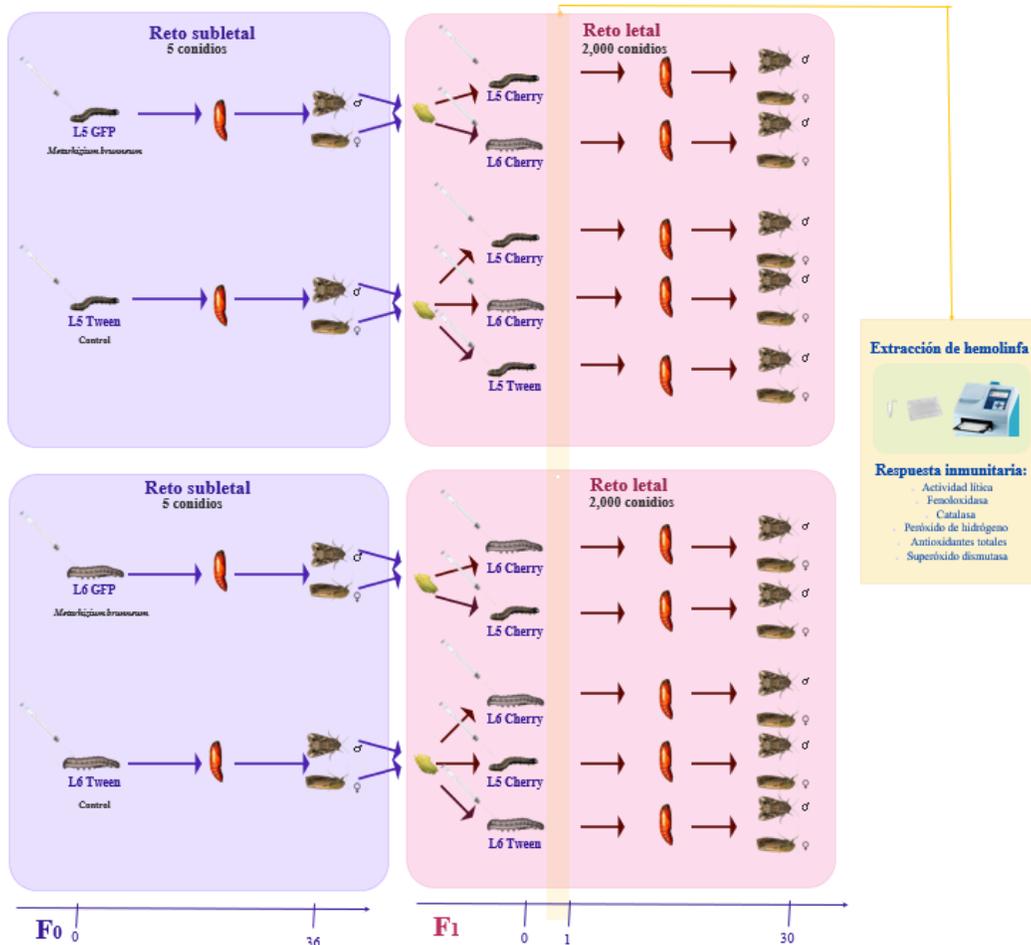


Figura 1. Diseño experimental para determinar la memoria innata transgeneracional. Dentro del cuadro morado se delimita la primera fase del experimento con dos tratamientos (experimental: 5 conidios/ μ L; control: Tween 80), ambos tratamientos se inyectaron en L5 y L6. El cuadro rosa delimita la segunda fase del experimento. En donde el grupo control se dividió en tres grupos, un grupo al que se inyectó Tween 80; el segundo fue retado en L5 y el tercero en L6 con 2,000 conidios/ μ L. Para los grupos homólogos, la descendencia fue retada en L5 y L6. Después de 24 horas del segundo reto, se extrajo hemolinfa para realizar la respuesta inmunitaria y estrés oxidante. En ambos retos se registró la supervivencia y el tiempo que transcurrió en cada fase.

4.2.2. Memoria innata transgeneracional

Para la segunda fase del experimento se inyectó a la descendencia que sobrevivió hasta la etapa L5 o L6 provenientes de los tratamientos en la f_0 . En esta fase del experimento la descendencia fue dividida en los siguientes tratamientos (N = 639): *control* (L5C-L5C, n = 44; L6C-L6C, n = 18) en el que padres e hijos se inyectaron con Tween en la etapa L5 o L6; *homólogo L5 o L6* (L5R-L5R, n = 77; L6R-L6R, n = 148), en donde los padres fueron retados con una dosis subletal y los hijos fueron retados con una dosis letal (2,000 conidios/ μ L, cepa *Cherry* del hongo *M. brunneum*) ambos en la etapa L5 o L6; *heterólogo L5 o L6* (L5C-L5R, n = 44; L6C-L6R, n = 22) en el que los padres fueron control (inyectados con Tween) y los hijos retados con una dosis letal en la etapa L5 o L6; *homólogo L5-L6 o L6-L5* (L5R-L6R, n = 56; L6R-L5R, n = 12) en donde los padres fueron retados con la dosis subletal en la etapa L5 o L6 y los hijos fueron retados con la dosis letal en la etapa L6 o L5; y por último, *heterólogo L5-L6 o L6-L5* (L5C-L6R, n = 25; L6C-L5R, n = 8) en el que los padres fueron control en etapa L5 o L6 y los hijos retados con una dosis letal en la etapa L6 o L5 (**figura 1**).

Después de 24 horas de la inyección, se separaron 185 individuos a los cuales se les extrajeron 30 μ L de hemolinfa. La hemolinfa se depositó en 200 μ L de PBS (Solución Salina Amortiguada por Fosfatos; Sigma) y las muestras se mantuvieron en un congelador a -80 °C. Cabe resaltar que estos individuos se excluyeron de los análisis de supervivencia y desarrollo. Con estas muestras de los diferentes tratamientos se analizaron las siguientes medidas de la respuesta inmunitaria: la actividad lítica, la actividad de fenoloxidasa, un pro-oxidante y

distintos antioxidantes. Se cuantificó la proteína en la hemolinfa para que, en caso de encontrar diferencias significativas en la respuesta inmunitaria, esto no se debiera a una cantidad inicial en la proteína por grupo (ver resultados).

Para analizar los costos durante el desarrollo, se registró el tiempo (días) que tardó cada larva en llegar a pupa, después se registró el tiempo transcurrido durante el estadio de pupa y nuevamente durante el estadio adulto. Para los costos en fertilidad se contó el número de larvas que eclosionaron en cada tratamiento. También se registró la supervivencia después de cada reto para conocer los beneficios de la memoria inmunitaria innata.

4.3. Defensa en la memoria transgeneracional

4.3.1. Respuesta inmunitaria

4.3.1.1. Concentración de proteína

Se utilizó el kit de proteína de Pierce BCA (catálogo #23225; Thermo Scientific). En cada microplaca de ELISA de 96 pozos, ocho fueron utilizados para la curva estándar de proteína, misma que se realizó colocando 40 μ L de albúmina de suero bovina (BSA) bajo diferentes concentraciones: 2,000, 1,500, 1,000, 750, 500, 250, 125 y 25 μ g/mL de proteína. Para diluir la BSA se utilizó un buffer fosfato salino (PBS; Sigma). Por otra parte, se preparó el reactivo de trabajo diluyendo 297 μ L del reactivo B en 14.9 mL del reactivo A, ambos proporcionados por el kit. El resto de los pozos se llenaron con 40 μ L de PBS y 150 μ L del reactivo de trabajo; de los cuales se dejaron dos pozos controles, es decir, solo con las dos soluciones

anteriores y a los demás pozos se les colocaron 40 μ L de muestra ($n = 185$). Se leyó la absorbancia a 562 nm en lector de microplacas Multiskan GO (Thermo Scientific) después de que se incubara la microplaca 15 minutos a 37 C°. Con la ecuación de la curva de regresión de cada muestra se obtuvo la concentración de proteína en μ g/mL.

4.3.1.2. Actividad de la fenoloxidasa

Se preparó una solución diluyendo 0.004 gramos de L-DOPA (Sigma-Aldrich) en 1 mL de PBS. Se cubrió con aluminio y se mantuvo en agitación durante 20 minutos hasta que se disolvió. De los 96 pozos de una microplaca ELISA, dos fueron utilizados como controles, a los que se les colocaron 90 μ L de PBS y 10 μ L de L-DOPA. Al resto de pozos de igual forma se les colocó 10 μ L de L-DOPA, además de 40 μ L de PBS y 50 μ L de muestra ($n = 184$). Después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, se leyó la absorbancia de cada pozo a 490 nm en el lector de microplacas Multiskan GO (Thermo Scientific) cada tres minutos durante media hora. Para obtener la actividad de la fenoloxidasa se calculó la pendiente de la curva de regresión lineal de la reacción de cada muestra. Se utilizó el valor de la tasa máxima de la pendiente (V_{max}) para los análisis.

4.3.1.3. Actividad lítica

Se preparó una solución de reactivo diluyendo 0.072 gramos de *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma- Aldrich) en 19.2 mL de PBS. Del total de pozos de una microplaca ELISA, se utilizaron dos como controles, a los que solamente se les agregó 230 μ L de PBS. El resto de la placa se llenó con 200 μ L de *M. lysodeikticus*

y 30 μL de muestra ($n = 185$). La placa se incubó 15 minutos a temperatura ambiente y se leyó a 490 nm con agitación previa de 15 segundos cada tres minutos durante media hora en el lector de microplacas Multiskan GO (Thermo Scientific). La actividad lítica se calculó como la pendiente en la regresión lineal entre la absorbancia y el tiempo de degradación de *M. lysondeikticus*. Se utilizó el valor de la tasa máxima de la pendiente (V_{max}) para los análisis.

4.3.2. Defensa antioxidante

4.3.2.1. Capacidad antioxidante total

Se utilizó el kit de capacidad antioxidante total (catalogo #K274-100; BioVision). Se utilizaron seis pozos de una placa ELISA para colocar la curva estándar de Trolox de la siguiente forma: 0, 4, 8, 12, 16 y 20 μL de la solución estándar de Trolox (1 μmol) y 100, 96, 92, 88, 84 y 80 μL de agua ultrapura por pozo. En los demás pozos se colocaron 25 μL de protein mask, 25 μL de la muestra ($n = 103$) y 50 μL de la solución de trabajo de cobre. La solución de trabajo se preparó al diluir el reactivo Cu en la solución de ensayo en una relación de 1:49. Se incubó la placa cubierta con aluminio a temperatura ambiente durante una hora y media. Se leyó la absorbancia de la placa a 570 nm en el lector de microplacas Multiskan GO (Thermo Scientific). Se obtuvo la cantidad de antioxidantes totales (nmol) de cada muestra con la ecuación de la curva de regresión.

2.3.2.2. Catalasa

Para obtener el contenido de catalasa (nmol) se utilizó un kit (catalogo #A22180;

INVITROGEN) y se prepararon las siguientes soluciones: para la solución de Amplex Red se colocaron 100 μL de DMSO en un vial del reactivo Amplex Red; la solución de trabajo 1X se preparó colocando 4 mL de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en 16 mL de agua destilada; la solución de peroxidasa del rábano (PHR) se preparó disolviendo el vial con el reactivo PHR en 200 μL de la solución de trabajo 1X; la solución de H_2O_2 se preparó diluyendo 23 μL del vial de H_2O_2 en 977 μL de agua destilada, y se preparó la solución de catalasa disolviendo el vial de catalasa en 100 μL de agua destilada. Se utilizaron seis pozos de una placa ELISA para colocar la curva estándar de la siguiente forma: 25 μL de la solución 1X, 6.25 μL de 1 U/mL de catalasa y 18.75 μL de la solución 1X; 12.5 μL de 1 U/mL de catalasa y 12.5 μL de la solución 1X; 2.5 μL de 10 U/mL de catalasa y 22.5 μL de la solución 1X; 5 μL de 10 U/mL de catalasa y 20 μL de la solución 1X; y 10 μL de 10 U/mL de catalasa y 15 μL de la solución 1X. Además, se preparó una solución a 40 μM de H_2O_2 diluyendo 10 μL de la solución de H_2O_2 en 4.99 mL de la solución 1X. Para la primera fase de la reacción se colocaron 12.5 μL de muestra ($n = 118$) y 12.5 μL de la solución 40 μM de H_2O_2 en los pozos restantes. Se cubrió la placa con aluminio y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Para preparar la solución de 100 μM de Amplex Red se diluyeron 50 μL de la solución de Amplex Red y 20 μL de la solución de HRP en 4.93 mL de la solución 1X. Se colocaron 25 μL de la solución de 100 μM de Amplex Red en los pozos con muestra. Se volvió a cubrir la placa, se incubó a 37 °C por 30 minutos y se leyó la absorbancia a 560 nm en el lector de microplacas Multiskan GO (Thermo Scientific). Se obtuvo la cantidad de catalasa (nmol) de cada muestra con la ecuación de la curva de regresión.

4.3.2.3. Superóxido dismutasa

Se utilizó un kit (catalogo #19160-1KT-F; Sigma-Aldrich) para determinar la actividad de superóxido dismutasa (SOD). Para la solución de trabajo, se diluyó 1 mL de la solución WST en 19 mL de la solución amortiguadora. Se centrifugó la enzima por cinco segundos y se diluyeron 15 µL en 2.5 mL de la solución amortiguadora para preparar la solución con la enzima. Se utilizaron tres pozos de una placa ELISA como blancos y se prepararon de la siguiente forma: al pozo del blanco uno se le agregaron 10 µL de agua ultrapura, 100 µL de la solución de trabajo y 10 µL de la solución con enzima; al pozo del blanco dos se le agregaron 10 µL de muestra, 100 µL de la solución de trabajo y 10 µL de la solución amortiguadora y al pozo del blanco tres se le agregaron 10 µL de agua ultrapura, 100 µL de la solución de trabajo y 10 µL de la solución amortiguadora. Los demás pozos se llenaron con 10 µL de muestra (n = 116), 10 µL de la solución con enzima y 100 µL de la solución de trabajo. Se incubó la placa cubierta con aluminio a 37 °C por 20 minutos y se leyó la absorbancia a 450 nm en el lector de microplacas Multiskan GO (Thermo Scientific). Se calculó la actividad SOD con la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad del SOD (tasa de inhibición \%)} = (\text{AB1} - \text{AB3}) - (\text{Amuestra} - \text{AB2}) / (\text{AB1} - \text{AB3}) * 100\%$$

AB1: Absorbancia del blanco 1; **AB2:** absorbancia del blanco 2; **AB3:** absorbancia del blanco 3 y; **Amuestra:** absorbancia de la muestra.

2.3.2.4. Peróxido de hidrógeno

Con un kit (catalogo #A22188; Thermo Fisher Scientific) determinamos la cantidad de H₂O₂. Primero se prepararon las siguientes soluciones estándar: para solución

de 10 mM Amplex Red, se disolvió el vial de Amplex Red en 60 μ L de DMSO, para la solución 1X se diluyeron 4 mL de la solución 5X en 16 mL de agua desionizada; para obtener una solución de 10 U/mL de HRP se disolvió el vial de HRP en 1 mL de la solución 1X; y se preparó una solución de 20 mM de H_2O_2 diluyendo 22.7 μ L del vial de H_2O_2 al 3% en 977 μ L de la solución 1X. Se utilizaron ocho pozos de una placa ELISA para la curva de H_2O_2 . Se colocaron diferentes volúmenes de la solución de 10 nM de H_2O_2 y del buffer 1X teniendo un total de 50 μ L en cada pozo para obtener las concentraciones de 10, 8, 6, 4, 2 y 0 mM de H_2O_2 . Adicionalmente, se preparó una solución con 100 μ M Amplex red y 0.2 U/mL de HRP diluyendo 50 μ L de la solución de 10 mM de Amplex Red y 100 μ L de la solución HRP en 4.85 mL de la solución 1X. El resto de los pozos se llenaron con 25 μ L de la muestra ($n = 116$) y 25 μ L de la solución de 100 μ M Amplex red y 0.2 U/mL de HRP. Se cubrió la placa con aluminio y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. Se leyó la absorbancia a 560 nm en el lector de microplacas Multiskan GO (Thermo Scientific) y se obtuvo la cantidad de H_2O_2 (nmol) con la ecuación de la regresión lineal.

4.4. Análisis estadísticos

Para comparar las funciones de supervivencia se realizaron la prueba de rango logarítmico de Kaplan-Meier, así como la prueba de Chi cuadrada. Se compararon las larvas eclosionadas de los padres y el porcentaje de supervivencia de la descendencia por tratamiento con un análisis de varianza (ANOVA) y posteriormente se realizó la prueba *post hoc* de Tukey. Para estos análisis se utilizó el software estadístico IBM SPSS. Para comparar los días que pasaron los individuos de los diferentes tratamientos en la fase de larva y pupa, primero se hizo

la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, se comprobó que los datos no eran normales. Por lo tanto, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis y si la prueba era significativa se realizó posteriormente la prueba de Wilcoxon. Las variables de respuesta inmunitaria y estrés oxidante se compararon entre los tratamientos con modelos lineales generalizados (GLZ) en R Studio (4.1.1).

5. Resultados

5.1. Activación de la respuesta inmunitaria innata (padres)

5.1.1. Efecto de la activación de la respuesta inmunitaria innata en la supervivencia

No se encontraron diferencias significativas en la supervivencia entre los tratamientos control y reto subletal en el estadio larval en la etapa L5 ($X^2 = 2.92$, g.l. = 1, $p = 0.09$), pero sí en la etapa L6, en donde el grupo subletal tuvo una mayor probabilidad de supervivencia y vivió más días (10 días) que el control (9 días) ($X^2 = 6.4$, g.l. = 1, $p = 0.01$). Al comparar entre las etapas, el grupo retado en la etapa L6 (10 días) tuvo una mayor probabilidad de supervivencia que el grupo retado en la etapa L5 (9 días; $X^2 = 6.93$, g.l. = 1, $p = 0.008$). El control en la etapa L5 tuvo una mayor probabilidad de supervivencia que el control en la etapa L6, aunque ambos sobrevivieron 9 días ($X^2 = 7.4$, g.l. = 1, $p = 0.01$; **figura 2a**).

En la etapa L5 en el estadio de pupa el tratamiento control tuvo una mayor probabilidad de supervivencia y sobrevivió más días (16 días) que el tratamiento con el reto subletal (15 días; $X^2 = 12.06$, g.l. = 1, $p = 0.001$). En la etapa L6, el grupo control tuvo una mayor probabilidad de supervivencia y sobrevivió más (15 días) que el grupo retado (14 días; $X^2 = 19.1$, g.l. = 3, $p < 0.0001$). Al comparar la supervivencia entre las etapas L5 (15 días) y L6 (14 días), no se encontraron diferencias significativas entre los grupos retados ($X^2 = 0.01$, g.l. = 1, $p = 0.9$) ni entre los controles (L5 = 16 días, L6 = 15 días; $X^2 = 5.22$, g.l. = 1, $p = 0.47$; **figura 2b**). En el estadio adulto no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ni entre las etapas L5 o L6 ($X^2 = 0.48$, g.l. = 3, $p = 0.92$).

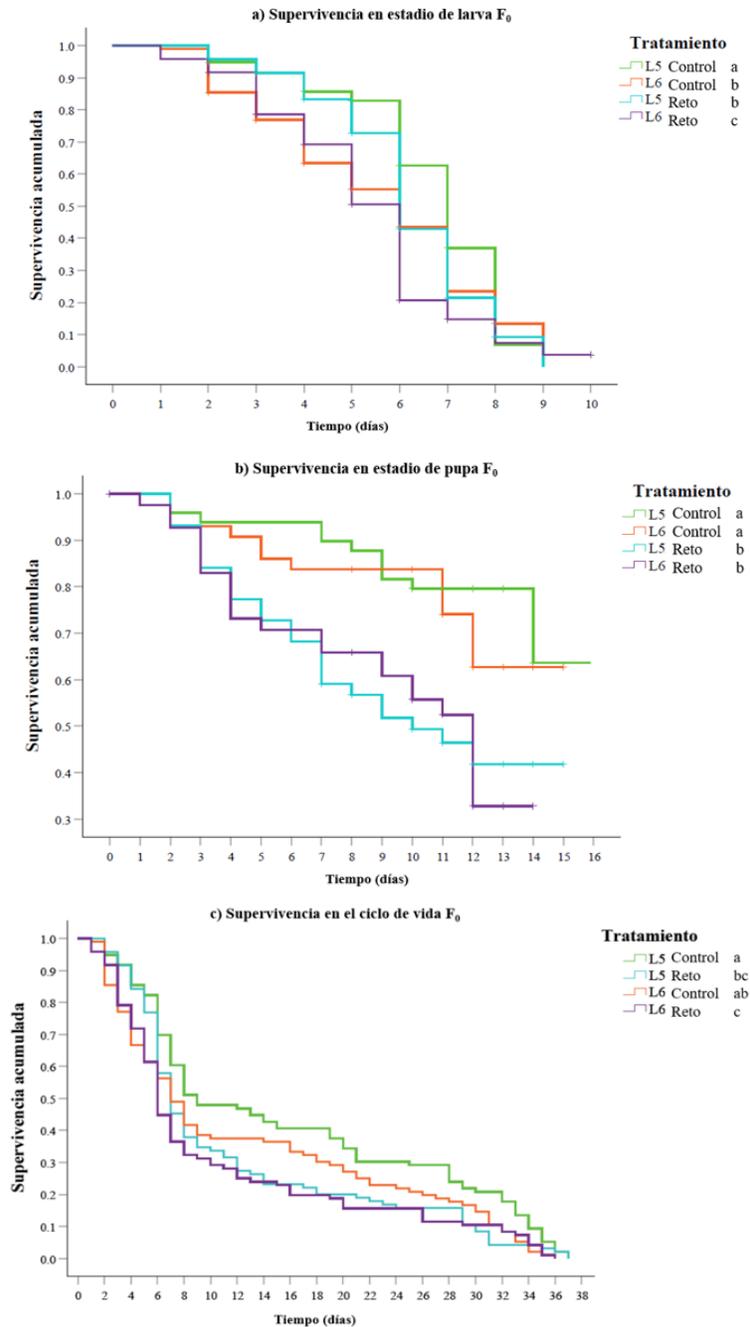


Figura 2. Curvas de supervivencia de los padres con respecto a los grupos experimentales.

Los padres se dividieron en los siguientes tratamientos: *control*, se inyectaron larvas con Tween en la etapa L5 o L6 y *reto*, se inoculó una dosis subletal de 5 conidios/ μ L del hongo *M. brunneum* en la etapa L5 o L6. Curvas de supervivencia de los padres en: **a)** estadio larval, **b)** en estadio de pupa y **c)** supervivencia en el ciclo de vida. Las letras al lado de la leyenda indican las diferencias entre los

tratamientos.

Considerando la supervivencia en el ciclo de vida, en la etapa L5 el grupo retado tuvo una menor probabilidad de supervivencia (36 días) que el control (37 días; $X^2 = 6.03$, g.l. = 1, $p = 0.01$). En la etapa L6, también el grupo retado tuvo una menor probabilidad de supervivencia que el control, aunque ambos vivieron 36 días ($X^2 = 19.1$, g.l. = 1, $p < 0.001$). Al comparar la supervivencia entre las etapas, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos retados ($X^2 = 1.21$, g.l. = 1, $p = 0.27$) ni entre los grupos control ($X^2 = 0.52$, g.l. = 1, $p = 0.47$; **figura 2c**).

5.1.2. Efecto de la activación de la respuesta inmunitaria innata en el desarrollo

En cuanto a los días que pasaron los individuos en la fase de larva, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($X^2 = 15.69$, g.l. = 3, $p = 0.001$; **figura 3**). Los tratamientos control ($p = 0.01$) y reto ($p = 0.01$) en la etapa L6 pasaron menos días en la fase de larva en comparación con el control en la etapa L5. No se encontraron diferencias entre el tratamiento de reto en la etapa L5 y los tratamientos control ($p = 0.10$) y reto ($p = 0.08$) en la etapa L6. Tampoco hubo diferencias significativas entre los tratamientos control y reto en la etapa L5 ($p = 1.00$) ni en la etapa L6 ($p = 1.00$). No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos en las etapas L5 y L6 en el tiempo que pasaron en la fase de pupa ($X^2 = 3.51$, g.l. = 3, $p = 0.32$) ni en el tiempo que pasaron en la fase de adulto ($X^2 = 0.75$, g.l. = 3, $p = 0.86$).

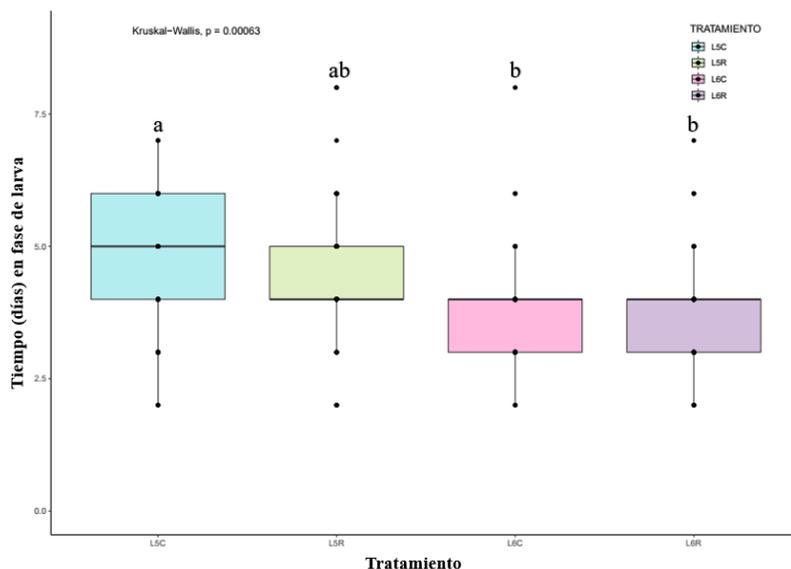


Figura 3. Cajas de bigotes del tiempo de desarrollo de padres inyectados en etapa L5 y/o L6. Tiempo en días que pasaron los individuos de los tratamientos control y reto en las etapas L5 y L6 en la fase de larva.

5.1.3. Efecto de la activación de la respuesta inmunitaria innata en la fertilidad

Primero se analizó cuantas larvas eclosionaron en cada tratamiento y se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($F = 2.99$, $p = 0.04$). Aunque, solamente se encontró que el tratamiento con el reto subletal en la etapa L5 tuvo más larvas eclosionadas que el tratamiento control en la etapa L6 ($p = 0.02$; **figura 4**). Se mantuvieron las larvas hasta la segunda fase del experimento, de las cuales solo sobrevivieron el 23% de la descendencia del tratamiento control en etapa L5; el 15% del tratamiento con el reto subletal en etapa L5; en etapa L6 sobrevivió el 10% de la descendencia del tratamiento control y el 27% del tratamiento con reto subletal.

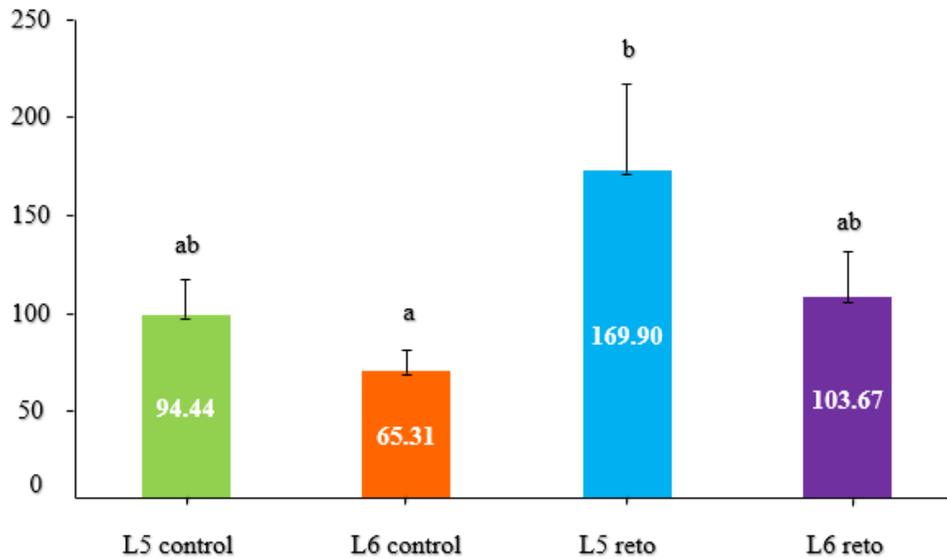


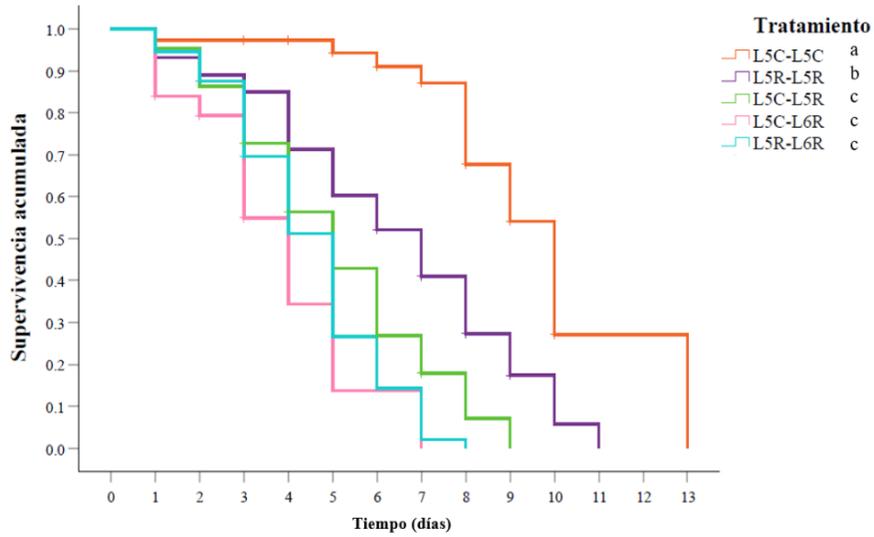
Figura 4. Gráfica de barras de la fertilidad en los padres, en términos del número de larvas eclosionadas en cada tratamiento. Las barras indican el error estándar.

5.2. Memoria innata transgeneracional

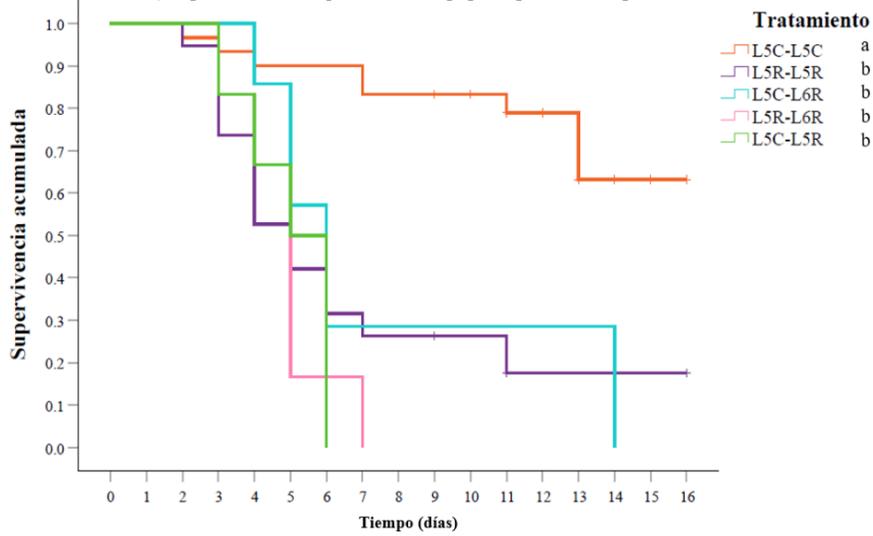
5.2.1. Efecto de la memoria innata transgeneracional en la supervivencia

En etapa L5, el tratamiento control tuvo una mayor probabilidad de supervivencia y sobrevivió más días (13 días) que el tratamiento homólogo (11 días). Además, el tratamiento homólogo tuvo una mayor probabilidad de supervivencia que los tratamientos heterólogos de hijos retados en etapa L5 (9 días) y L6 (8 días), y homólogo de hijos retados en etapa L6 (7 días), estos últimos tres no difirieron en la probabilidad de supervivencia ($X^2 = 97.04$, g.l. = 4, $p < 0.001$; **figura 5a**). En pupa, el grupo control fue el tratamiento con la mayor probabilidad de supervivencia en comparación con los demás tratamientos, que tuvieron la misma probabilidad de supervivencia ($X^2 = 30.49$, g.l. = 4, $p < 0.001$; **figura 5b**).

a) Supervivencia de F_1 en estadio larval de padres en etapa L5



b) Supervivencia de F_1 en estadio de pupa de padres en etapa L5



c) Supervivencia de F_1 en el ciclo de vida de padres en etapa L5

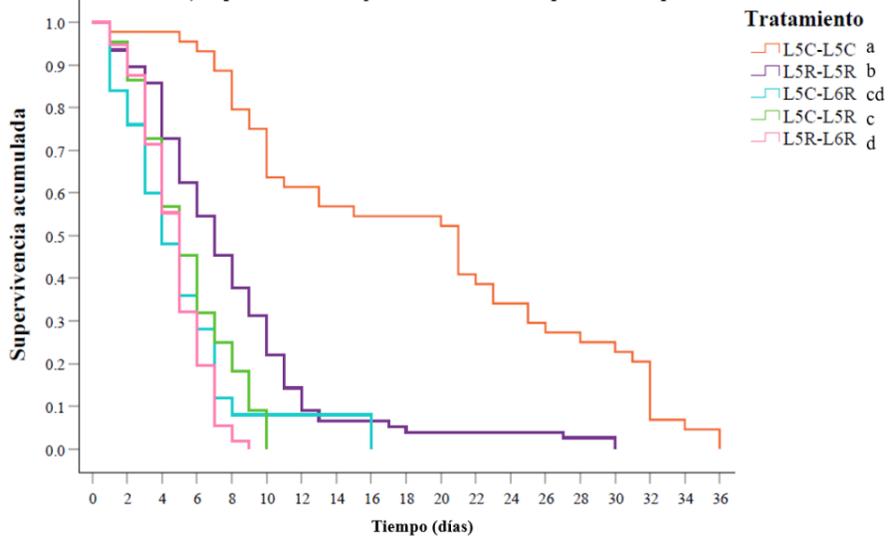


Figura 5. Curvas de supervivencia de la descendencia de padres inyectados en la etapa L5 con respecto a los grupos experimentales. La descendencia se dividió en los siguientes tratamientos: control (L5C-L5C), padres e hijos fueron controles en la etapa L5; homólogo L5 (L5R-L5R), padres e hijos fueron retados en la etapa L5; heterólogo L5 (L5C-L5R), padres fueron control y los hijos retados ambos en etapa L5; memoria L5-L6 (L5R-L6R) los padres fueron retados en la etapa L5 y los hijos en la etapa L6; y, por último, heterólogo L5-L6 (L5C-L6R) los padres fueron control en la etapa L5 y los hijos retados en la etapa L6. Curvas de supervivencia de la descendencia en: a) estadio larval, b) en estadio de pupa y c) supervivencia en el ciclo de vida. Las letras al lado de la leyenda indican las diferencias entre los tratamientos.

No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos en el estadio adulto ($X^2 = 0.66$, g.l. = 1, $p = 0.72$). Aunque solamente pasaron al estadio adulto individuos de los grupos control y de memoria de padres e hijos retados en L5.

Al considerar la supervivencia en tiempo total del ciclo de vida se encontró que el tratamiento control tuvo la mayor probabilidad de supervivencia (36 días) en comparación con los demás tratamientos. El tratamiento homólogo en etapa L5 (30 días) tuvo una mayor probabilidad de supervivencia en comparación con el tratamiento heterólogo en las etapas L5 (10 días; $X^2 = 11.88$, g.l. = 1, $p = 0.001$) y L6 (16 días; $X^2 = 7.85$, g.l. = 1, $p = 0.005$), y con el homólogo retado en la etapa L6 (9 días; $X^2 = 28.15$, g.l. = 1, $p < 0.0001$). Los individuos del tratamiento heterólogo en la etapa L5 tuvieron una mayor probabilidad de supervivencia en comparación con el homólogo de hijos retados en la etapa L6 ($p = 0.03$). No se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento heterólogo de hijos retados en la etapa L6 y el heterólogo de hijos retados en la etapa L5 y el homólogo de hijos retados en la etapa L6 ($X^2 = 111.07$, g.l. = 4, $p < 0.0001$; **figura 5c**). Estos resultados indican

que hay una memoria transgeneracional solamente si padres e hijos son retados en etapa L5.

Por otro lado, en el estadio larval en la etapa L6, se encontró que las larvas del tratamiento control (10 días) y heterólogo de hijos retados en etapa L5 (9 días) tuvieron la mayor probabilidad de supervivencia en comparación con los demás tratamientos. Mientras que el tratamiento homólogo de hijos retados en la etapa L6 (8 días), el tratamiento heterólogo de hijos retados en la etapa L6 (7 días); y el tratamiento homólogo de hijos retados en etapa L5 (6 días) tuvieron la misma probabilidad de supervivencia. Con excepción de la descendencia del tratamiento homólogo retada en la etapa L6 que tuvo una mayor probabilidad de supervivencia que la del tratamiento homólogo en etapa L5 ($X^2 = 14.87$, g.l. = 4, $p = 0.005$; **figura 6a**).

En cuanto a la supervivencia durante la fase de pupa, se encontró que el tratamiento control fue el que tuvo la mayor probabilidad de supervivencia en comparación con los demás tratamientos ($X^2 = 118.85$, g.l. = 4, $p = 0.001$; **figura 6b**). El tratamiento homólogo retado en la etapa L6 tuvo una mayor probabilidad de supervivencia en comparación con el tratamiento homólogo retado en la etapa L5 ($X^2 = 6.89$, g.l. = 1, $p = 0.009$); aunque tuvo la misma probabilidad de supervivencia que los tratamientos heterólogos en la etapa L5 ($X^2 = 3.19$, g.l. = 1, $p = 0.07$) y L6 ($X^2 = 1.56$, g.l. = 1, $p = 0.21$). Los tratamientos heterólogos en las etapas L5 y L6, y el tratamiento homólogo en la etapa L5 no difirieron estadísticamente en la supervivencia. En el estadio adulto no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($X^2 = 0.5$, g.l. = 2, $p = 0.776$).

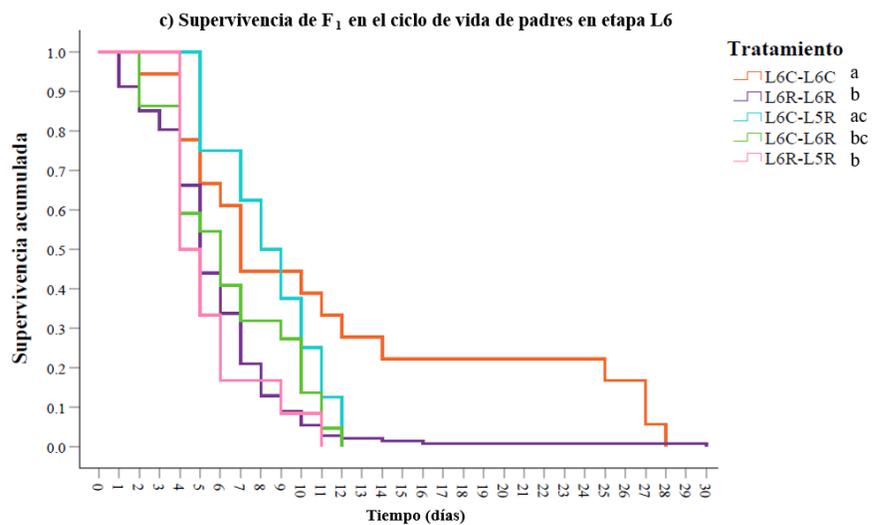
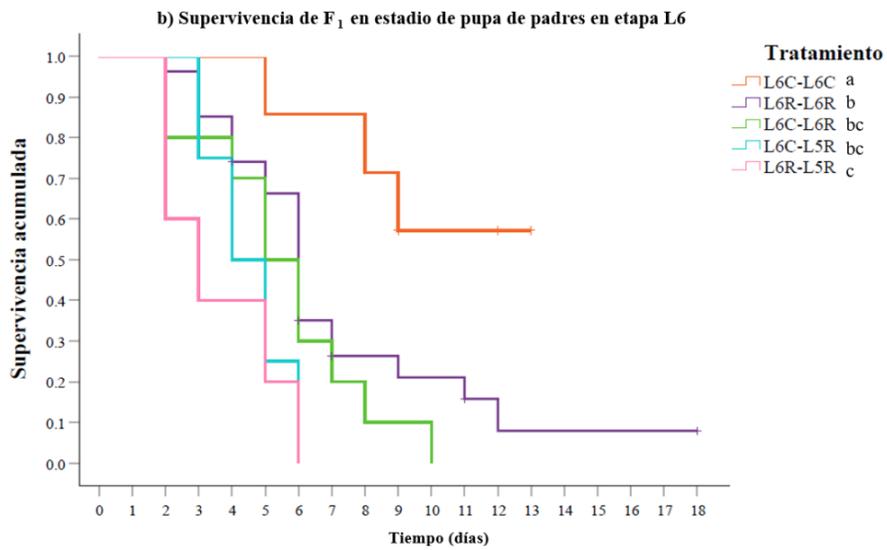
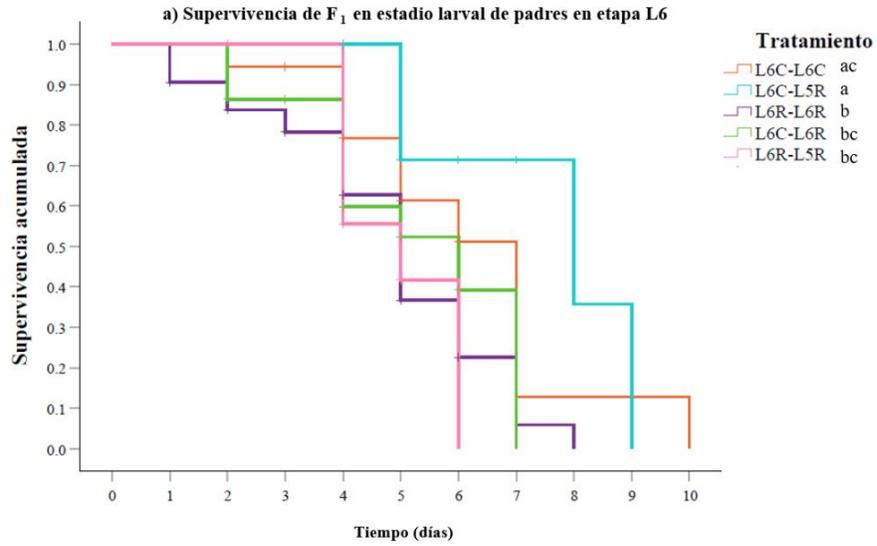


Figura 6. Curvas de supervivencia de la descendencia de padres inyectados en la etapa L6 con respecto a los grupos experimentales. La descendencia se dividió en los siguientes tratamientos: *control* (L6C-L56), padres e hijos fueron controles en la etapa L6; *homólogo L6* (L6R-L6R), padres e hijos fueron retados en la etapa L6; *heterólogo L6* (L6C-L6R), padres fueron control y los hijos retados ambos en etapa L6; *memoria L6-L5* (L6R-L5R) los padres fueron retados en la etapa L6 y los hijos en la etapa L5; y por último, *heterólogo L6-L5* (L6C-L5R) los padres fueron control en la etapa L6 y los hijos retados en la etapa L5. Curvas de supervivencia de la descendencia en: **a)** estadio larval, **b)** en estadio de pupa y **c)** supervivencia en el ciclo de vida. Las letras al lado de la leyenda indican las diferencias entre los tratamientos.

En la etapa L6 también es importante considerar que solamente pasaron al estadio adulto individuos de los tratamientos control y homólogo.

Con respecto al ciclo de vida se encontró que el tratamiento control tuvo la mayor probabilidad de supervivencia en comparación con los demás tratamientos, con excepción del tratamiento heterólogo de hijos retados en la etapa L5, debido a que tuvieron la misma probabilidad de supervivencia ($X^2 = 0.61$, g.l. = 1, $p = 0.43$). Los tratamientos heterólogos en la etapa L5 y L6 no difirieron estadísticamente en la probabilidad de supervivencia ($X^2 = 1.357$, g.l. = 1, $p = 0.24$). Además, no se encontraron diferencias significativas en la supervivencia entre los tratamientos homólogo de hijos retados en etapa L6, heterólogo de hijos retados en la etapa L6 y el tratamiento homólogo de hijos retados en etapa L5 ($X^2 = 17.05$, g.l. = 4, $p = 0.002$; **figura 6c**). Estos resultados sugieren que no hay una memoria transgeneracional o que es ineficiente si padres e hijos son retados en la etapa L6.

Al comparar los tratamientos heterólogos y homólogos entre las etapas L5 y L6 en el estadio larval se encontró que el homólogo en etapa L5 tuvo la mayor

probabilidad de supervivencia en comparación con los demás tratamientos, que tuvieron la misma probabilidad de supervivencia. ($X^2 = 33.59$, g.l. = 3, $p < 0.0001$; **figura 7a**); no se encontraron diferencias significativas en el estadio de pupa ($X^2 = 2.75$, g.l. = 3, $p = 0.432$) y tampoco en estadio adulto ($X^2 = 0.66$, g.l. = 3, $p = 0.88$) entre las etapas.

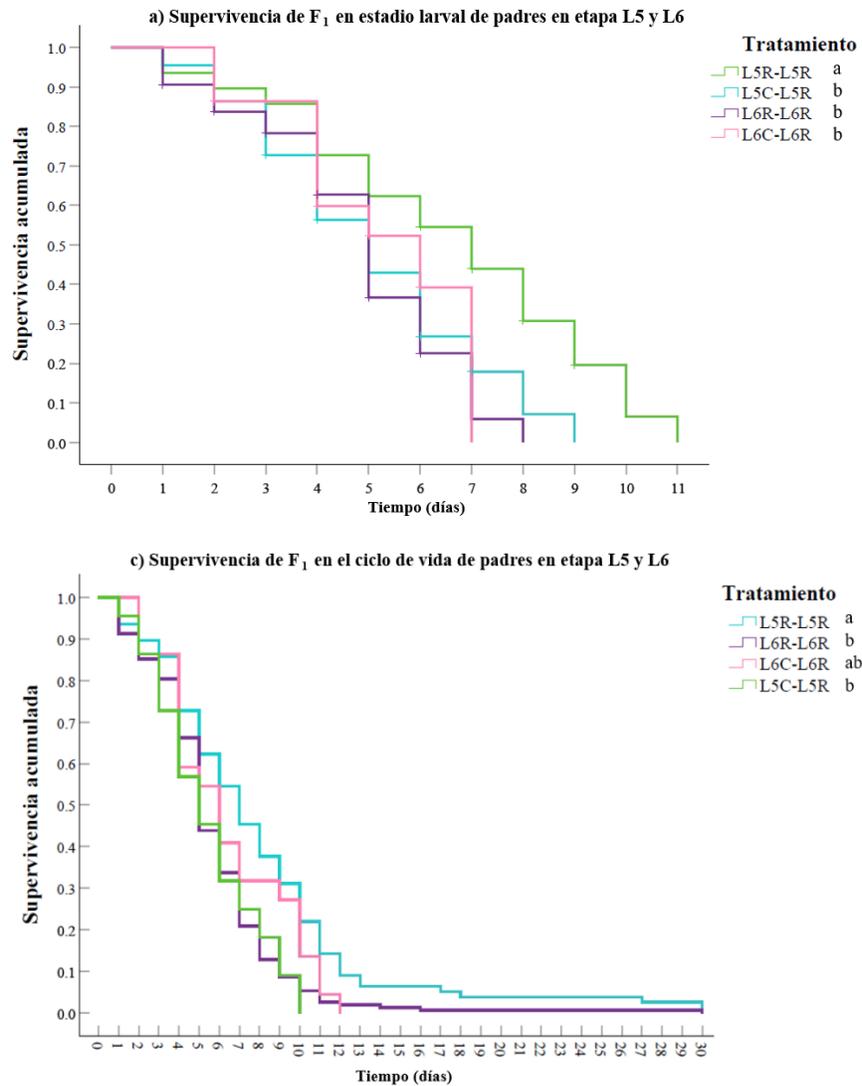


Figura 7. Curvas de supervivencia de la descendencia de padres inyectados en la etapa L5 y L6 con respecto a los grupos experimentales. Curvas de supervivencia de la descendencia en estadio: **a)** larval y **b)** curvas supervivencia en el ciclo de vida. Las letras al lado de la leyenda indican

las diferencias entre los tratamientos.

En cuanto a la supervivencia en el tiempo total del ciclo de vida se encontró que el tratamiento de memoria en la etapa L5 tuvo una mayor probabilidad de supervivencia que el resto de los tratamientos, que tuvieron la misma probabilidad de supervivencia ($X^2 = 19.74$, g.l. = 3, $p < 0.0001$; **figura 7b**). Con excepción del tratamiento homólogo en la etapa L5 y el tratamiento heterólogo en la etapa L6 que tuvieron la misma probabilidad de supervivencia ($X^2 = 1.65$, g.l. = 3, $p = 0.12$).

5.2.2. Efecto de la memoria innata transgeneracional en el desarrollo

En la descendencia de padres retados en la etapa L5 se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos en los días que pasaron en la fase de larva ($X^2 = 36.17$, g.l. = 4, $p < 0.0001$). El tratamiento control no difirió estadísticamente de los tratamientos heterólogo ($p = 0.27$) y homólogo ($p = 1.00$) de la descendencia retada en la etapa L5. Además, el tratamiento heterólogo de la descendencia retada en la etapa L5 pasó menos días en la fase de larva en comparación con el tratamiento homólogo de la descendencia retada en la etapa L5 ($p = 0.03$). Por otra parte, se encontró que los tratamientos heterólogo y homólogo de la descendencia retada en la etapa L6 pasó menos días en la fase de larva en comparación con los tratamientos control ($p < 0.0001$, $p = 0.001$), homólogo ($p < 0.001$, $p = 0.001$) y heterólogo ($p = 0.04$, $p = 0.04$) de la descendencia retada en la etapa L5 (**figura 8a**). No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos en los días que pasaron en la etapa de pupa ($X^2 = 0.03$, g.l. = 1, $p = 0.86$).

En la descendencia de padres retados en la etapa L6 no se encontraron

diferencias significativas entre los tratamientos ni en los días que pasaron en la fase de larva ($X^2 = 7.48$, g.l. = 4, $p = 0.11$) ni en los días que pasaron en la fase de pupa ($X^2 = 1.51$, g.l. = 1, $p = 0.22$).

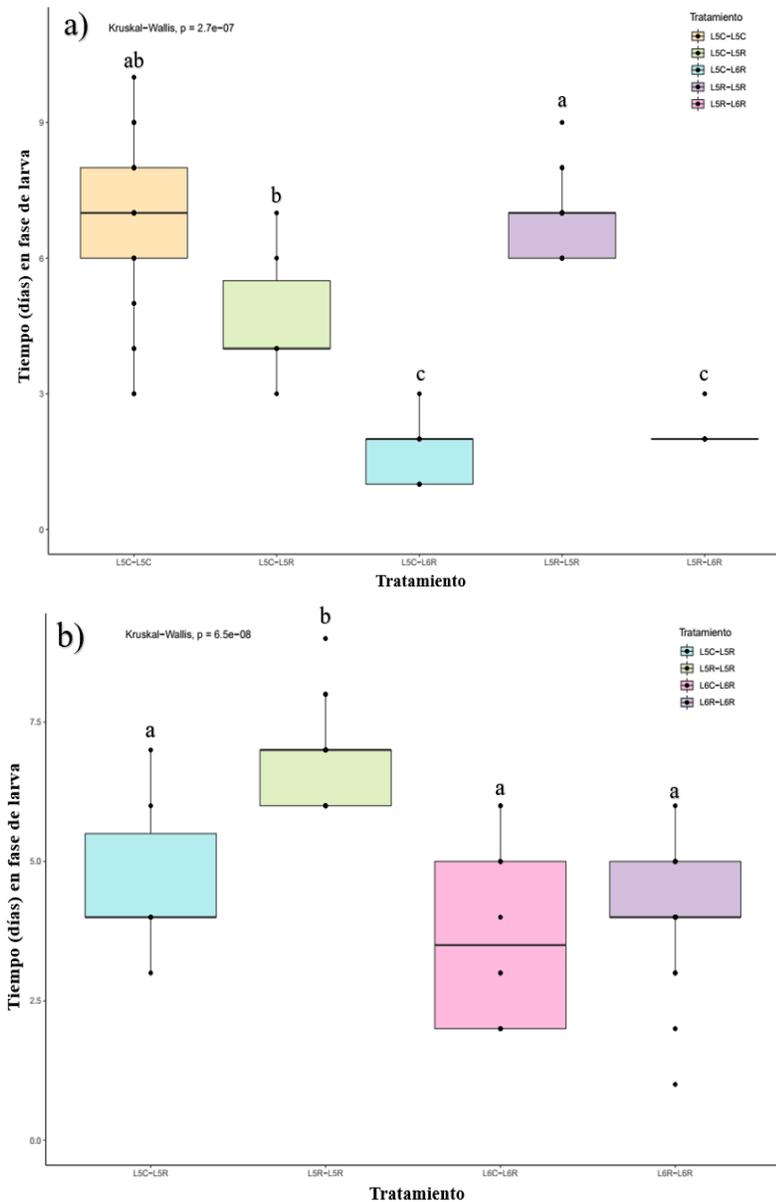


Figura 8. Cajas de bigotes del tiempo de desarrollo de la descendencia de padres que fueron inyectados en etapa L5 y/o L6. Tiempo en días que pasaron los individuos de los diferentes tratamientos en la fase de larva de **a)** la descendencia de padres que fueron inyectados en la etapa L5 y **b)** la descendencia de padres que fueron inyectados en las etapas L5 y L6.

Al comparar entre los tratamientos homólogos y heterólogos de las etapas L5 y L6, se encontró que el tratamiento homólogo en la etapa L5 tardó más días en la fase de larva en comparación con los tratamientos heterólogo en la etapa L5, y homólogo y heterólogo en la etapa L6 ($X^2 = 36.30$, g.l. = 3, $p < 0.0001$; **figura 8b**). No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de las etapas L5 y L6 en los días que pasaron los individuos en la fase de pupa ($X^2 = 0.75$, g.l. = 1, $p = 0.39$).

5.3. Defensa en memoria innata transgeneracional

5.3.1. Respuesta inmunitaria innata

En la actividad de la fenoloxidasa se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos control, memoria y heterólogo ($X^2 = 10.04$, g.l. = 2, $p = 0.007$), así como entre las etapas L5 y L6 ($X^2 = 33.89$, g.l. = 1, $p < 0.001$) y en la interacción tratamiento*desarrollo ($X^2 = 44.49$, g.l. = 5, $p < 0.001$; **tabla A1**). En la etapa L5, el tratamiento control tuvo una menor actividad de la fenoloxidasa en comparación con el tratamiento heterólogo ($p = 0.02$). Aunque el tratamiento homólogo no difirió del tratamiento heterólogo ($p = 0.79$) ni del control ($p = 0.48$). En la etapa L6, el tratamiento heterólogo tuvo una mayor actividad de la fenoloxidasa en comparación con el tratamiento control ($p = 0.04$). Aunque el tratamiento homólogo no difirió en la actividad de la fenoloxidasa con respecto al tratamiento control ($p = 0.15$) y heterólogo ($p = 0.29$). Al comparar los tratamientos entre las etapas todos los tratamientos en la etapa L5 tuvieron una menor actividad de la fenoloxidasa en comparación con todos los tratamientos en la etapa L6. Con excepción del

heterólogo en la etapa L5 y el control en la etapa L6, que tuvieron la misma actividad de la fenoloxidasasa ($p = 2.88$; **figura 9a**).

Con respecto la actividad lítica, se detectaron diferencias significativas entre las etapas L5 y L6 ($X^2 = 76.1$, g.l. = 1, $p < 0.0005$), entre los tratamientos control, memoria y heterólogo ($X^2 = 7.81$, g.l. = 2, $p = 0.02$), así como en la interacción tratamiento*desarrollo ($X^2 = 89.39$, g.l. = 5, $p < 0.0001$). En la etapa L5, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos control, heterólogo y homólogo. En la etapa L6, el tratamiento heterólogo tuvo la mayor actividad lítica que el tratamiento homólogo ($p = 0.002$) y que el tratamiento control ($p < 0.001$). No se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento homólogo y control ($p = 0.15$). Al comparar los tratamientos entre las etapas L5 y L6, se encontró que los tratamientos control, homólogo y heterólogo en la etapa L6 tienen una mayor actividad lítica que todos los tratamientos en la etapa L5. Con excepción del control en la etapa L5 que tuvo una mayor actividad lítica que el control en la etapa L6 ($p = 0.04$; **fig. 9b; tabla A1**).

Se encontraron diferencias significativas en la cantidad de proteína entre las etapas L5 y L6 ($X^2 = 98.7$, g.l. = 1, $p < 0.0001$); también se encontraron diferencias marginales entre los tratamientos control, homólogo y heterólogo ($X^2 = 6.16$, g.l. = 2, $p = 0.05$); y se encontraron diferencias significativas en la interacción tratamiento*desarrollo ($X^2 = 113.47$, g.l. = 5, $p < 0.0001$; **tabla A1**). En la etapa L5, el tratamiento control tuvo más proteína en comparación con el tratamiento heterólogo ($p = 0.03$) y homólogo ($p = < 0.001$).

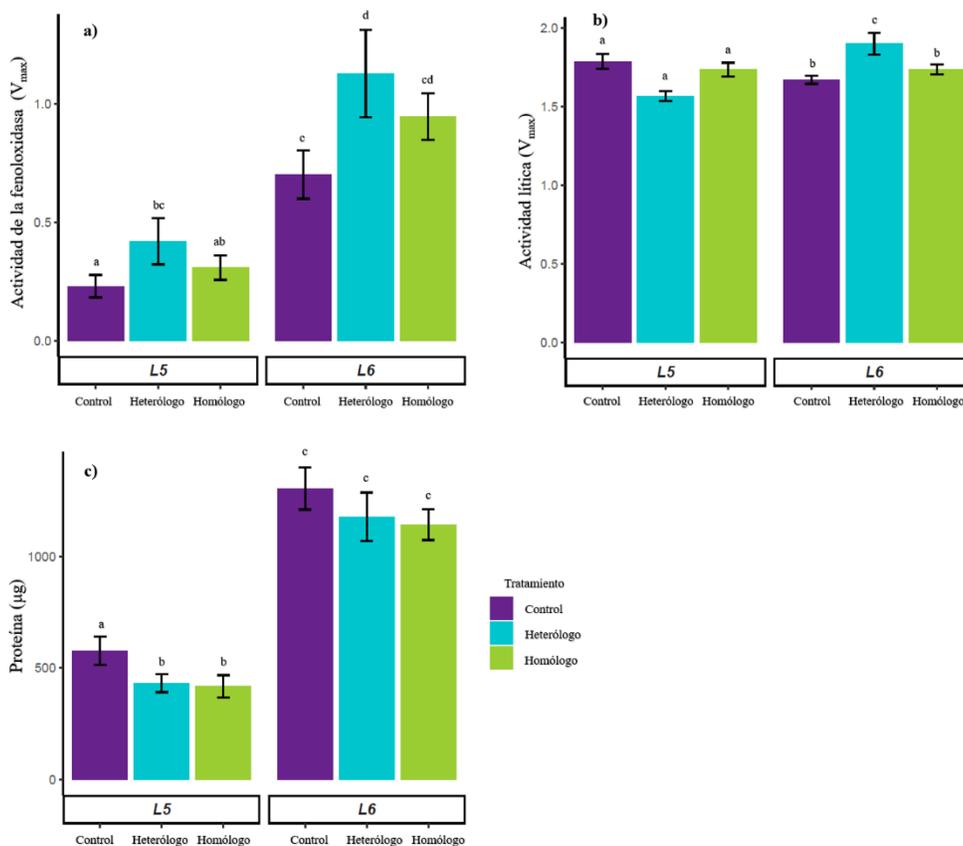


Figura 9. Parámetros de la respuesta inmunitaria en la descendencia en etapas L5 y L6. En todos los análisis se incluyeron los tratamientos *control* (padres e hijos control), *heterólogo* (padres control e hijos retados) y *homólogo* (padres e hijos retados), estos tratamientos se aplicaron en ambas etapas. Se muestran los análisis de los parámetros de: **a)** la actividad de la fenoloxidasa, **b)** la actividad lítica y **c)** de proteína.

No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos homólogo y heterólogo ($p = 0.79$). En la etapa L6, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos control, heterólogo y homólogo. Al comparar entre las etapas L5 y L6 todos los tratamientos en etapa L5 tuvieron un menor contenido de proteína que todos los tratamientos en etapa L6. (**figura 9c**).

5.3.1. Defensa antioxidante

En cuanto a la capacidad antioxidante total, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos control, heterólogo y homólogo ($X^2 = 298.38$, g.l. = 2, $p < 0.0001$), entre las etapas L5 y L6 ($X^2 = 385.69$, g.l. = 1, $p < 0.001$), y en la interacción tratamiento*desarrollo ($X^2 = 371.04$, g.l. = 5, $p < 0.0001$). En la etapa L5, el tratamiento control tuvo una menor capacidad antioxidante total en comparación con el tratamiento heterólogo ($p < 0.001$) y homólogo ($p < 0.001$). No se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento heterólogo y homólogo ($p = 0.83$). En la etapa L6 no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos control, heterólogo y homólogo. Al comparar los tratamientos entre las etapas L5 y L6, se encontró que el tratamiento control en la etapa L5 tuvo una capacidad antioxidante total similar que los tratamientos control ($p = 0.77$), heterólogo ($p = 0.17$) y homólogo ($p = 0.79$) en la etapa L6. Sin embargo, el tratamiento homólogo y heterólogo en la etapa L5 tuvieron una mayor capacidad antioxidante total en comparación con los tratamientos control, heterólogo y homólogo en la etapa L6 (**figura 10a; tabla A2**).

En el contenido de catalasa (nmol) no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos control, heterólogo y homólogo ($X^2 = 3.32$, g.l. = 2, $p = 0.19$); pero si se encontraron diferencias significativas entre las etapas L5 y L6 ($X^2 = 8.69$, g.l. = 1, $p = 0.003$) y en la interacción tratamiento*desarrollo ($X^2 = 12.35$, g.l. = 5, $p = 0.03$). No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos control, heterólogo y homólogo en la etapa L5 ni en la etapa L6. Al comparar la etapa L5 con la etapa L6, se encontró que el tratamiento homólogo en

etapa L5 tiene menor cantidad de catalasa que el tratamiento homólogo en la etapa L6 ($p = 0.04$). Además, el tratamiento heterólogo en etapa L5 tiene una menor cantidad de catalasa que los tratamientos control ($p = 0.01$) y homólogo ($p = 0.01$) en etapa L6. Aunque el tratamiento heterólogo en la etapa L5 no difiere estadísticamente en el contenido de catalasa en comparación con el tratamiento heterólogo en etapa L6 ($p = 0.10$; **figura 10b**; **tabla A2**).

Para la actividad de la SOD, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos control, heterólogo y homólogo ($X^2 = 7.29$, g.l. = 2, $p = 0.03$); también se encontraron diferencias entre las etapas L5 y L6 ($X^2 = 51.19$, g.l. = 1, $p < 0.0001$) y en la interacción tratamiento*desarrollo ($X^2 = 70.92$, g.l. = 5, $p < 0.0001$). En la etapa L5 los tratamientos control, homólogo y heterólogo tuvieron la misma actividad de la SOD. Mientras que, en la etapa L6, el control tuvo una mayor actividad de la SOD en comparación con los tratamientos heterólogo ($p = 0.02$) y homólogo ($p < 0.001$). Los tratamientos heterólogo y homólogo no difirieron en la actividad de la SOD ($p = 0.21$). Al comparar los tratamientos entre las etapas L5 y L6, se encontró que los tratamientos control, heterólogo y homólogo en etapa L5 tuvieron una mayor actividad de la SOD que los tratamientos control, heterólogo y homólogo en etapa L6 (**figura 10c**; **tabla A2**).

Finalmente, en la cantidad de H_2O_2 (nmol) no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, control, heterólogo y homólogo ($X^2 = 4.22$, g.l. = 2, $p = 0.12$); pero sí se encontraron diferencias significativas entre las etapas L5 y L6 ($X^2 = 18.92$, g.l. = 1, $p < 0.0001$), al igual que en la interacción tratamiento*desarrollo ($X^2 = 30.49$, g.l. = 5, $p < 0.0001$). En la etapa L5, el

tratamiento control tuvo significativamente una mayor cantidad de H₂O₂ que el tratamiento homólogo (p = 0.02) y que el tratamiento heterólogo (p = 0.04). Entre el tratamiento heterólogo y homólogo en etapa L5 no se encontraron diferencias significativas (p = 0.66). En la etapa L6 no se encontraron diferencias entre los tratamientos control, heterólogo y homólogo. Al comparar los tratamientos entre las etapas L5 y L6, se encontró que el tratamiento control en etapa L5 y todos los tratamientos en etapa L6 tuvieron la misma cantidad de H₂O₂. Los tratamientos heterólogo y homólogo en la etapa L5 tuvieron una menor cantidad de H₂O₂ que los tratamientos control, heterólogo y homólogo en la etapa L6 (**figura 10d**; **tabla A2**).

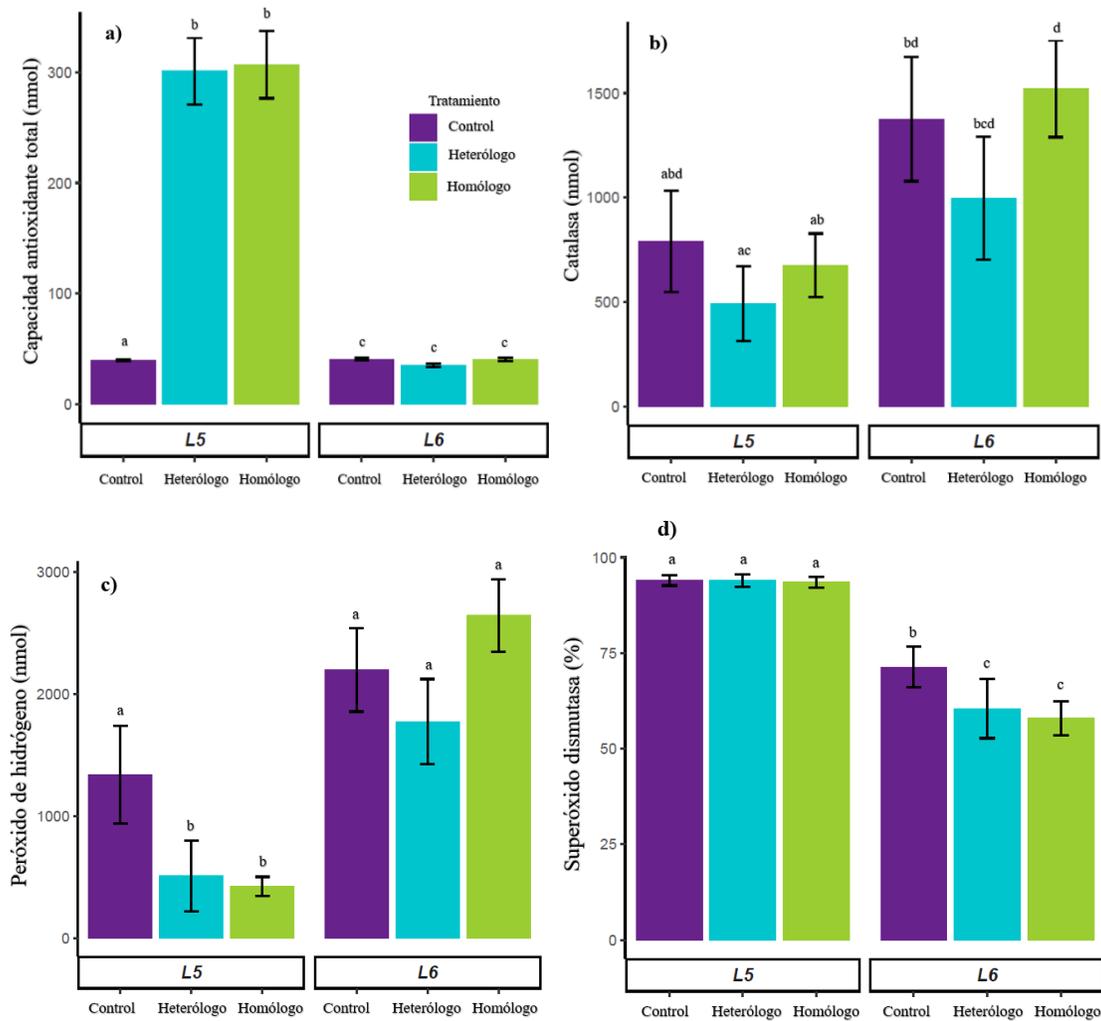


Figura 10. Parámetros de la respuesta inmunitaria, en específico, de la defensa antioxidante en la descendencia en etapas L5 y L6. En todos los análisis se incluyeron los tratamientos *control* (padres e hijos control), *heterólogo* (padres control e hijos retados) y *homólogo* (padres e hijos retados), estos tratamientos se aplicaron en ambas etapas. Se muestran los análisis de los parámetros de: a) la capacidad antioxidante total, b) catalasa, c) peróxido de hidrógeno y d) superóxido dismutasa.

6. Discusión

El objetivo de este estudio fue analizar los costos y beneficios de la memoria transgeneracional del lepidóptero *S. frugiperda* en dos etapas de desarrollo (L5 y L6). Los resultados de la primera fase del experimento (F₀), indicaron que los padres que activaron la respuesta inmunitaria sobrevivieron menos que el grupo control, no obstante, esto ocurrió en la fase de pupa. En las fases de larva y adulto no se detectaron costos en supervivencia, ni en el desarrollo o la fertilidad. De manera importante, durante la segunda fase del experimento (F₁), la memoria innata transgeneracional varió, dependiendo del instar en el que se indujo. Cuando padres e hijos fueron retados en la etapa L5, hubo memoria transgeneracional en términos de supervivencia (**figura A4**). Sin embargo, no hubo memoria transgeneracional en la etapa L6 (**figura A5**). La descendencia en etapa L6 sobrevivió menos que en la etapa L5 (**figura A6**).

Por otra parte, tanto en la etapa L5 como en la L6, no se encontraron diferencias significativas en el tiempo de desarrollo ni en los parámetros de la respuesta inmunitaria (PO, actividad lítica, H₂O₂, catalasa, TAC, SOD; **tablas A3 y A4**). En la etapa L5 hubo una mayor respuesta en catalasa y actividad del SOD; en los demás parámetros hubo una mayor respuesta en la etapa L6 (**tabla A5**). Cabe resaltar que en *Spodoptera* solamente se había puesto a prueba la memoria transgeneracional tomando en cuenta un instar. Wilson & Graham (2015) investigaron la memoria transgeneracional en el instar L3 y Wilson et al. (2021), en el instar L4.

Los resultados de este trabajo muestran por primera vez que la memoria innata

transgeneracional depende del momento de desarrollo en el que se aplique el reto a los padres e hijos. Se registró memoria transgeneracional en términos de supervivencia cuando los padres y sus hijos fueron retados en la etapa L5. Esto apoya diversos estudios que proponen la existencia de la memoria transgeneracional (Little *et al.*, 2003; Moret, 2006; Sadd & Schmid-Hempel, 2006; Roth *et al.*, 2009; Tate *et al.*, 2017). Sin embargo, en algunas especies de invertebrados, no se ha encontrado memoria transgeneracional (Voordouw *et al.*, 2008; Pifeault *et al.*, 2015). La inconsistencia entre los estudios que apoyan o no la memoria podría deberse a la probabilidad de encuentro con un parásito o patógeno a través de las generaciones, a restricciones en los mecanismos o a los costos en adecuación (Little & Kraaijeveld, 2004; Contreras-Garduño *et al.*, 2016; Dhinaut *et al.*, 2018; Roth *et al.*, 2018).

En esta tesis, la probabilidad de encuentro con los patógenos fue la misma en retos homólogos y retos heterólogos. Sin embargo, no se puede descartar que en las etapas L5 y L6 hubiera mecanismos diferentes que condujeran a distintos costos. Por ejemplo, la hormona juvenil, controla distintos procesos fisiológicos, desarrollo, reproducción, conducta y envejecimiento (Rantala *et al.*, 2020). Su expresión afecta negativamente la proliferación de hemocitos, la actividad de la fenoloxidasa, la expresión de genes de péptidos antimicrobianos (Lavine & Strand, 2002; Rolff & Siva-Jothy, 2002; Amaro-Sánchez *et al.*, 2023). Por lo tanto, se ha propuesto que la hormona juvenil juega un papel importante en la asignación de recursos y costos entre la inmunidad y otras funciones en los insectos (Flatt *et al.*, 2005; Amaro-Sánchez *et al.*, 2023). Además, no en todas las etapas existe la misma

inversión de energía en reproducción, desarrollo y mantenimiento, por lo tanto, podría haber costos diferenciales en cada etapa (Tate & Rudolf, 2012), si es que los niveles hormonales y su impacto en la respuesta inmunitaria cambian con las fases del desarrollo.

En este trabajo, la descendencia en la etapa L6 sobrevivió menos que en la etapa L5. Precisamente podría deberse a que en la etapa L6 lidian tanto con el costo de la respuesta inmunitaria y con el de la metamorfosis. Finalmente, respecto a los costos, es importante destacar que la metamorfosis implica un alto costo energético: por ejemplo, *D. melanogaster* se incrementa la densidad de mitocondrias durante la formación del tejido de adulto en pupas (Merkey *et al.*, 2011). Además, la metamorfosis trae costos en la exposición a los depredadores, parásitos y patógenos, por lo que hay alteraciones en la respuesta inmunitaria (Rolff *et al.*, 2019; Russell & Dunn, 1996). Se sabe que uno de los costos de la activación de la respuesta inmunitaria, en términos energéticos, es el incremento de la tasa metabólica basal (Ardia *et al.*, 2012). Aunque no se midieron parámetros de la respuesta inmunitaria en los padres, se encontró que, a partir de la pupa, la supervivencia es menor en los individuos retados en ambas etapas. Independientemente de lo que esté afectando la memoria en diferentes etapas, este es el primer estudio en el que se demuestra que la memoria transgeneracional depende del instar en el que se induce.

Es importante destacar que, hasta el momento, los estudios de memoria transgeneracional solamente toman en cuenta la supervivencia en una etapa del desarrollo (Wilson & Graham, 2015; Wilson *et al.*, 2021). Al evaluar la supervivencia

en un solo estadio se podría perder información relevante sobre la plasticidad en otras etapas del desarrollo. En esta tesis, en la etapa larval hubo un costo en supervivencia en la descendencia en etapa L6 debido a que el grupo homólogo sobrevivió menos que el grupo heterólogo. Mientras que, en la etapa L5, las larvas del grupo homólogo sobrevivieron más que las del grupo heterólogo. De forma interesante, en pupas y en adultos no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. Por una parte, en cada fase del desarrollo podría haber una asignación de recursos diferentes. Además, estas diferencias también podrían estar relacionadas con la variación de la respuesta inmunitaria a lo largo del ciclo de vida. Por ejemplo, en mosquitos y en tenebrios, se ha visto que la respuesta inmunitaria es mejor en las larvas y va disminuyendo en la edad adulta (League & Hillyer, 2016; Amaro-Sánchez *et al.*, 2023).

Se ha propuesto que los cambios en el desarrollo son costosos, y una forma de analizar los costos evolutivos es mediante el tiempo de desarrollo. Si los organismos tardan menos en desarrollarse, podrían tener tamaño pequeño. Esto afectaría el tamaño de los adultos y sería costoso en términos de reproducción (Metcalf & Monaghan, 2001; Roth *et al.*, 2010). No obstante, algunos organismos aceleran el desarrollo y si sufren metamorfosis, escapan de las infecciones (Carmona *et al.*, 2022). En *T. molitor*, los individuos del grupo de memoria tardaron más en desarrollarse durante la etapa de larva, pero al llegar a la fase de pupa, adelantaron el desarrollo, reduciendo los costos en la etapa adulta (Contreras-Garduño *et al.*, 2019). Los resultados indican que en la etapa L6 hay un costo en el tiempo de desarrollo en comparación con la etapa L5. Contrario a la hipótesis de *bet-hedging*,

en la etapa L6, aunque se encontró que en esta fase pasan menos días en la etapa larval, esta estrategia es costosa debido a que no tienen una mayor supervivencia en comparación con los individuos retados en la etapa L5. Tal vez, esta disminución en los días que pasan los individuos en la fase de larva más los costos asociados a la formación de pupa impactaron en que ninguno llegara a la etapa adulta. Este resultado muestra un costo importante en la etapa L6 por la falta de memoria innata, y los mecanismos y costos asociados deberán investigarse a futuro.

Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas entre el grupo homólogo y heterólogo en los parámetros de la respuesta inmunitaria (PO, actividad lítica, H₂O₂, catalasa, TAC, SOD) en ninguna de las etapas. Sin embargo, hubo una mayor respuesta en catalasa y actividad del SOD en el grupo homólogo en la etapa L5 y en el resto de los parámetros hubo una mayor respuesta en el grupo homólogo en la etapa L6. Esto apoya la idea de medir distintos parámetros de la respuesta inmunitaria al mismo tiempo porque no todos correlacionan con la memoria (Roth *et al.*, 2018; Lanz-Mendoza & Contreras-Garduño, 2022). Por ejemplo, en *Manduca sexta* se encontró que las diferencias en la memoria transgeneracional dependieron del gen analizado (Trauer-Kizilelma & Hilker, 2015). Es posible que los parámetros evaluados no hayan sido los mejores indicadores de la memoria inmunitaria. Por lo tanto, se propone incluir en trabajos futuros el análisis de hemocitos, péptidos antimicrobianos o pro-oxidantes. Se conoce que la vía de señalización Toll promueve la producción de péptidos antimicrobianos, y se induce con infecciones por hongos o por bacterias Gram (+). Además, los hemocitos poseen componentes de señalización de Toll (Lemaitre & Hoffmann, 2007). Por ejemplo, en *S. exigua*, se

ha visto que individuos infectados con *Beauveria bassiana*, indujeron la expresión de péptidos antimicrobianos del tipo atacinas, cecropinas, gallerimicinas, gloverinas, hemolinas y transferinas (Park & Kim, 2012).

Durante un reto microbiano, los ROS y RNS actúan matando al parásito o patógeno mediante la modificación de la integridad funcional y estructural de diferentes moléculas derivada de su actividad citotóxica (Eleftherianos *et al.*, 2021). En específico, se propone investigar el óxido nítrico, el cual es producido por células fagocíticas activadas. El óxido nítrico puede dañar las membranas celulares, las proteínas y los ácidos nucleicos mediante el proceso de difusión. Este gas defiende al hospedero por sí mismo o en asociación con otras moléculas: si se asocia con anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) puede formar peroxinitrito ($ONOO^-$) y con H_2O_2 forma el radical hidroxilo ($\cdot OH$) (Nappi, *et al.*, 2000). Se ha visto que el óxido nítrico defiende a distintos invertebrados de virus, hongos, bacterias y protozoarios (Rivero, 2006). Por lo tanto, sería interesante analizar el papel de los hemocitos, radicales libres y péptidos antimicrobianos en la memoria innata de *Spodoptera*.

La supervivencia no correlacionó con la mayoría de los parámetros de la respuesta inmunitaria, ni en la etapa L5 o en la etapa L6. Al comparar entre las etapas, la respuesta inmunitaria en la etapa L6 es mayor que en L5, aunque la descendencia en la etapa L6 sobrevivió menos. Se ha propuesto que uno de los costos de la respuesta inmunitaria es el auto daño al hospedero cuando se defiende de una infección (Moret, 2003). En *T. molitor* se han reportado daños fenotípicos y funcionales en el tejido del hospedero cuando los individuos activan la cascada de la fenoloxidasa (Sadd & Siva-Jothy, 2006). Por lo tanto, mantener una respuesta

inmunitaria exacerbada es costoso y esto podría explicar la falta de memoria y la menor supervivencia en la descendencia en la etapa L6.

Finalmente, se ha propuesto que el éxito de la plaga de *S. frugiperda* se debe a factores como su ciclo de vida corto, su alta fecundidad, su dieta generalista, su habilidad de migrar distancias largas, y su alta resistencia a insecticidas y a algunos agentes de control biológico (Wan *et al.*, 2021). A pesar de que se han utilizado agentes de control no han sido efectivos, por ejemplo, con *B. thuringiensis*, y con sus virus endémicos, *nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) y *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV; Martinez *et al.*, 2004; Haas-Stapleton *et al.* 2005; Storer *et al.* 2010). En parte, esto se puede atribuir a que no se ha considerado la memoria innata transgeneracional en estos estudios ni en el control biológico. En esta tesis se comprobó que *S. frugiperda* tiene una respuesta de memoria innata transgeneracional y esta varía dependiendo del instar afectado. Por lo tanto, en *S. frugiperda*, otro factor relevante que contribuye a su éxito podría ser su respuesta inmunitaria, aunque faltaría comparar su la respuesta inmunitaria con otro lepidóptero de un linaje cercano que no sea plaga.

Cabe destacar que este es el primer estudio que demuestra que la memoria innata transgeneracional depende del instar en el que se induce. Además, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que la memoria innata transgeneracional es costosa en términos de supervivencia. Por lo tanto, también es costosa en reproducción porque pocos individuos del grupo de memoria en la etapa L5 logró sobrevivir hasta adulto y ninguno de ellos logró dejar descendencia. Los resultados muestran que la memoria innata parece ser más plástica de lo que se pensaba y

abre nuevas vías de investigación ligadas a evaluar cuáles son los mecanismos detrás de esta plasticidad. Además, proponemos que se tome en cuenta el estadio de desarrollo como factor relevante en la memoria innata.

7. Referencias

- Amaro-Sánchez, T., Ruiz-Guzmán, G., Hernández-Martínez, S., Krams, I., Rantala, M. J., & Contreras-Garduño, J. (2023). Effect of juvenile hormone on phenoloxidase and hemocyte number: The role of age, sex, and immune challenge. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 265, 110827.
- Ardia, D. R., Gantz, J. E., & Strebel, S. (2012). Costs of immunity in insects: an induced immune response increases metabolic rate and decreases antimicrobial activity. *Functional Ecology*, 26, 732-739.
- Beaumont, H. J., Gallie, J., Kost, C., Ferguson, G. C., & Rainey, P. B. (2009). Experimental evolution of bet hedging. *Nature*, 462, 90-93.
- Brehélin M., & Roch P. (2008). Specificity, learning and memory in the innate immune response. *Invertebrate Survival Journal*, 5, 103–109.
- Brown, L. D., Shapiro, L. L., Thompson, G. A., Estévez-Lao, T. Y., & Hillyer, J. F. (2019). Transstadial immune activation in a mosquito: Adults that emerge from infected larvae have stronger antibacterial activity in their hemocoel yet increased susceptibility to malaria infection. *Ecology and Evolution*, 9, 6082-6095.
- Browne, N., Heelan, M., & Kavanagh, K. (2013). An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. *Virulence*, 4, 597-603.
- Boots, M. (2004). Modelling insect diseases as functional predators. *Physiological Entomology*, 29, 237-239.
- Buchon, N., Silverman, N., & Cherry, S. (2014). Immunity in *Drosophila melanogaster* from microbial recognition to whole-organism physiology. *Nature Reviews Immunology*, 14, 796-810.

- Carmona-Peña, S. P., Vázquez-Chagoyán, J. C., Castro, D. P., Genta, F. A., & Contreras-Garduño, J. (2022). Benefits and costs of immune memory in *Rhodnius prolixus* against *Trypanosoma cruzi*. *Microbial Pathogenesis*, 165, 105505.
- Carter, V., & Hurd, H. (2010). Choosing anti-Plasmodium molecules for genetically modifying mosquitoes: focus on peptides. *Trends in Parasitology*, 26, 582-590.
- Casmuz, A., Juárez, M. L., Socías, M. G., Murúa, M. G., Prieto, S., Medina, S., ... & Gastaminza, G. (2010). Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 69, 209-231.
- Castro-Vargas, C., Linares-López, C., López-Torres, A., Wrobel, K., Torres-Guzmán, J. C., Hernández, G. A., Wrobel, K., Lanz-Mendoza, H., & Contreras-Garduño, J. (2017). Methylation on RNA: a potential mechanism related to immune priming within but not across generations. *Frontiers in Microbiology*, 8, 473.
- Cadavid, L. F. (2009) La evolución de sistemas complejos: el caso del sistema inmune en animales. *Acta Biológica Colombiana*, 14, 247–254.
- Contreras-Garduño, J., Lanz-Mendoza, H., Franco, B., Nava, A., Pedraza-Reyes, M., & Canales-Lazcano, J. (2016). Insect immune priming: Ecology and experimental evidences. *Ecological Entomology*, 41, 351–366.
- 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, 59.
- Contreras-Garduño, J., Rodríguez, M.C., Rodríguez, M.H., Alvarado-Delgado, A. & Lanz- Mendoza, H. (2014) Cost of immune priming within generations: trade-

- off between infection and reproduction. *Microbes and Infection*, 16, 261–267.
- Deshmusk, S., C. M. Kalleshwaraswamy, R. Asokan, H. M. Mahadeva Swamv, M. S. Marutid, H. B. Pavithra, K. Hegde, S. Navi, S. T. Prabhu, & G. Goergen. (2018). First report of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), an alien invasive pest on maize in India. *Pest Management in Horticultural Ecosystems* 24, 23–29.
- Dhinaut, J., Chogne, M., & Moret, Y. (2018). Immune priming specificity within and across generations reveals the range of pathogens affecting evolution of immunity in an insect. *Journal of Animal Ecology*, 87, 448-463.
- Dubuffet, A., Zanchi, C., Boutet, G., Moreau, J., Teixeira, M., & Moret, Y. (2015). Trans-generational immune priming protects the eggs only against gram-positive bacteria in the mealworm beetle. *PLoS Pathogens*, 11, e1005178.
- Dupuy, C., Virion, A., Ohayon, R., Kaniewski, J., Deme, D., & Pommier, J. (1991). Mechanism of hydrogen peroxide formation catalyzed by NADPH oxidase in thyroid plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 266, 3739-3743.
- Eleftherianos, I., Heryanto, C., Bassal, T., Zhang, W., Tettamanti, G., & Mohamed, A. (2021). Haemocyte-mediated immunity in insects: Cells, processes, and associated components in the fight against pathogens and parasites. *Immunology*.
- Flajnik, M. F. (2002). Comparative analyses of immunoglobulin genes: surprises and portents. *Nature Reviews Immunology*, 2, 688-698.
- Fridovich, I. (2004). Mitochondria: are they the seat of senescence? *Aging cell*, 3, 13-16.
- Goergen, G., P. Lava Kumar, Sankung, S. B., Togola, A., & Tamò, M. (2016). First report of outbreaks of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera, Noctuidae), a new alien invasive pest in West and Central Africa. *PLoS One*, 11, 1–9.

- Goh, H. G., Lee, S. G., Lee, B. P., Choi, K. M., & Kim, J. H. (1990). Simple mass rearing of beet armyworm *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), on an artificial diet. *Korean Journal of Applied Entomology*, 29, 180-183.
- Haas-Stapleton, E. J., Washburn, J. O., & Volkman, L. E. (2005). *Spodoptera frugiperda* resistance to oral infection by *Autographa californica* multiple *nucleopolyhedrovirus* linked to aberrant occlusion-derived virus binding in the midgut. *Journal of General Virology*, 86, 1349-1355.
- Khan, I., Prakash, A., & Agashe, D. (2016). Divergent immune priming responses across flour beetle life stages and populations. *Ecology and Evolution*, 6, 7847-7855.
- Koella, J. C., & Boëte, C. (2002). A genetic correlation between age at pupation and melanization immune response of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Evolution*, 56, 1074-1079.
- Kodrík, D., Bednářová, A., Zemanová, M., & Krishnan, N. (2015). Hormonal regulation of response to oxidative stress in insects—an update. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 25788-25816.
- Kumar, D., & Klessig, D. F. (2003). High-affinity salicylic acid-binding protein 2 is required for plant innate immunity and has salicylic acid-stimulated lipase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 16101-16106.
- Kurtz J (2005) Specific memory within innate immune systems. *Trends Immunology* 26, 186–192.
- Kurtz, J., & Franz, K. (2003). Evidence for memory in invertebrate immunity. *Nature*, 425, 37-38.
- Lanz-Mendoza, H., & Contreras-Garduño, J. (2018). Insect Innate Immune Memory. *Advances in Comparative Immunology*, 193–211.

- Lanz-Mendoza, H., & Contreras-Garduño, J. (2022). Innate immune memory in invertebrates: Concept and potential mechanisms. *Developmental & Comparative Immunology*, 127, 104285.
- Lavine, M. D., & Strand, M. R. (2002). Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32, 1295-1309.
- Lemaitre, B., & Hoffmann, J. (2007). The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology*, 25, 697-743.
- Little, T. J., O'Connor, B., Colegrave, N., Watt, K., & Read, A. F. (2003). Maternal transfer of strain-specific immunity in an invertebrate. *Current Biology*, 13, 489-492.
- Little T. J., Colegrave N., Sadd B. M., Schmid-Hempel P. (2008) Studying immunity at the whole organism level. *Bio Essays* 30, 404–405.
- Little, T. J., O'Connor, B., Colegrave, N., Watt, K., & Read, A. F. (2003). Maternal Transfer of Strain-Specific Immunity in an Invertebrate. *Current Biology*, 13, 489–492.
- Little, T. J., & Kraaijeveld, A. R. (2004). Ecological and evolutionary implications of immunological priming in invertebrates. *Trends in Ecology & Evolution*, 19, 58-60.
- Loker, E. S., Adema, C. M., Zhang, S. M., & Kepler, T. B. (2004). Invertebrate immune systems—not homogeneous, not simple, not well understood. *Immunological Reviews*, 198, 10-24.
- de la Luz Sierra-Ruiz, M., García-Rodríguez, Y. M., Torres-Martínez, R., Delgado-Lamas, G., & Espinosa-García, F. J. (2022). Procedimientos para establecer y mantener una cría del gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) en condiciones de laboratorio. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 26, 134-154.

- Martínez, A. M., Caballero, P., Villanueva, M., Miralles, N., San Martín, I., López, E., & Williams, T. (2004). Formulation with an optical brightener does not increase probability of developing resistance to *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus in the laboratory. *Journal of Economic entomology*, 97, 1202-1208.
- Maya-Maldonado, K., Cime-Castillo, J., Maya-Lucas, O., Argotte-Ramos, R., Rodríguez, M. C., & Lanz-Mendoza, H. (2021). Transcriptome analysis uncover differential regulation in cell cycle, immunity, and metabolism in *Anopheles albimanus* during immune priming with *Plasmodium berghei*. *Developmental & Comparative Immunology*, 120, 104046.
- 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.
- Melcarne, C., Lemaitre, B., & Kurant, E. (2019). Phagocytosis in *Drosophila*: From molecules and cellular machinery to physiology. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 109, 1-12.
- Menu, F., Ginoux, M., Rajon, E., Lazzari, C. R., & Rabinovich, J. E. (2010). Adaptive developmental delay in Chagas disease vectors: an evolutionary ecology approach. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4, e691.
- Merkey, A. B., Wong, C. K., Hoshizaki, D. K., & Gibbs, A. G. (2011). Energetics of metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 57, 1437-1445.
- Milutinovic B., Kurtz J. (2016) Immune memory in invertebrates. *Seminars in Immunology* 28, 328– 342
- Molina-Ochoa, J., Lezama-Gutierrez, R., Gonzalez-Ramirez, M., Lopez-Edwards, M., Rodriguez-Vega, M. A., & Arceo-Palacios, F. (2003). Pathogens and

parasitic nematodes associated with populations of fall armyworm (Lepidoptera: noctuidae) larvae in Mexico. *Florida Entomologist*, 86, 244–253.

Mondotte, J. A., Gausson, V., Frangeul, L., Suzuki, Y., Vazeille, M., Mongelli, V., Blanc, H., Failloux, A., & Saleh, M. C. (2020). Evidence for long-lasting transgenerational antiviral immunity in insects. *Cell Reports*, 33, 108506.

Moret, Y. (2003). Explaining variable costs of the immune response: selection for specific versus non-specific immunity and facultative life history change. *Oikos*, 102, 213-216.

Moret, Y. (2006). 'Trans-generational immune priming': specific enhancement of the antimicrobial immune response in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273, 1399-1405.

Moret, Y., & Moreau, J. (2012). The immune role of the arthropod exoskeleton. *Invertebrate Survival Journal*, 9, 200-206.

Müller, U., Vogel, P., Alber, G., & Schaub, G. A. (2008). The innate immune system of mammals and insects. *Trends in Innate Immunity*, 15, 21-44.

Mylonakis, E., Podsiadlowski, L., Muhammed, M., & Vilcinskis, A. (2016). Diversity, evolution and medical applications of insect antimicrobial peptides. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371, 20150290.

Nappi, A. J., & Vass, E. (1998). Hydrogen peroxide production in immune-reactive *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Parasitology*, 1150-1157.

Nappi, A. J., Vass, E., Frey, F., & Carton, Y. (2000). Nitric oxide involvement in *Drosophila immunity*. *Nitric Oxide*, 4, 423-430.

Nishide, Y., Kageyama, D., Yokoi, K., Jouraku, A., Tanaka, H., Futahashi, R., & Fukatsu, T. (2019). Functional crosstalk across IMD and Toll pathways:

insight into the evolution of incomplete immune cascades. *Proceedings of the Royal Society B*, 286, 20182207.

Pancer, Z., Amemiya, C. T., Ehrhardt, G. R., Ceitlin, J., Gartland, G. L., & Cooper, M. D. (2004). Somatic diversification of variable lymphocyte receptors in the agnathan sea lamprey. *Nature*, 430, 174-180.

Park, J. A., & Kim, Y. (2012). Eicosanoid biosynthesis is activated via Toll, but not Imd signal pathway in response to fungal infection. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110, 382-388.

Pogue, M. G. (2002). A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée: (Lepidoptera: Noctuidae). Philadelphia: American Entomological Society. Vol. 43, pp. 1-202.

Pigeault, R., Garnier, R., Rivero, A., and Gandon, S. (2016). Evolution of transgenerational immunity in invertebrates. *Proceedings of Royal Society*, 283, 20161136.

Rantala, M. J., Dubovskiy, I. M., Pölkki, M., Krama, T., Contreras-Garduño, J., & Krams, I. A. (2020). Effect of juvenile hormone on resistance against entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii* differs between sexes. *Journal of Fungi*, 6, 298.

Reber, A., & Chapuisat, M. (2012). No evidence for immune priming in ants exposed to a fungal pathogen. *PloS one*, 7, e35372.

Rivero, A. (2006). Nitric oxide: an antiparasitic molecule of invertebrates. *Trends in Parasitology*, 22, 219-225.

Rolff, J., & Siva-Jothy, M. T. (2002). Copulation corrupts immunity: a mechanism for a cost of mating in insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 9916-9918.

Roth, O., Sadd, B. M., Schmid-Hempel, P., & Kurtz, J. (2009). Strain-specific priming

- of resistance in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 276, 145-151.
- Roth, O., Joop, G., Eggert, H., Hilbert, J., Daniel, J., Schmid-Hempel, P., & Kurtz, J. (2010). Paternally derived immune priming for offspring in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. The Journal of Animal Ecology, 79, 403–413.
- Roth, O., Beemelmans, A., Barribeau, S. M., & Sadd, B. M. (2018). Recent advances in vertebrate and invertebrate transgenerational immunity in the light of ecology and evolution. Heredity, 121, 225-238.
- Sadd, B. M., Kleinlogel, Y., Schmid-Hempel, R., & Schmid-Hempel, P. (2005). Trans-generational immune priming in a social insect. Biology Letters, 1, 386-388.
- Sadd, B. M., & Schmid-Hempel, P. (2006). Insect immunity shows specificity in protection upon secondary pathogen exposure. Current Biology, 16, 1206-1210.
- Sadd, B. M., & Siva-Jothy, M. T. (2006). Self-harm caused by an insect's innate immunity. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 273, 2571-2574.
- Schmidt-Duran, A., Villalba-Velasquez, V., Chacon-Cerdas, R., Martinez, K., & Flores-Mora, D. (2015). Larval stage prediction model of *Spodoptera frugiperda* collected in fig (*Ficus carica*) and discovery of *Apanteles* sp. as its parasitoid. Revista Tecnología en Marcha, 28, 47-58.
- Schmid-Hempel, P. (2005). Evolutionary ecology of insect immune defenses. Annual Review of Entomology, 50, 529-551.
- Schmid-Hempel P (2011). Evolutionary parasitology. Oxford University Press.
- Sheehan, G., Garvey, A., Croke, M., & Kavanagh, K. (2018). Innate humoral immune defences in mammals and insects: The same, with differences? Virulence, 9, 1625-1639.

- Sheldon, B. C., & Verhulst, S. (1996). Ecological immunology: costly parasite defenses and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends in Ecology & Evolution*, 11, 317-321.
- Schulz, N. K., Sell, M. P., Ferro, K., Kleinhölting, N., & Kurtz, J. (2019). Transgenerational developmental effects of immune priming in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Frontiers in Physiology*, 10, 98.
- Siva-Jothy, M. T., Moret, Y., & Rolff, J. (2005). Insect immunity: an evolutionary ecology perspective. *Advances in Insect Physiology*, 32, 1-48.
- Starks, P. T., Blackie, C. A., & Seeley, T. D. (2000). Fever in honeybee colonies. *The Science of Nature - Naturwissenschaften*, 87, 229-231.
- Storer, N. P., Babcock, J. M., Schlenz, M., Meade, T., Thompson, G. D., Bing, J. W., & Huckaba, R. M. (2010). Discovery and characterization of field resistance to *Bt* maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. *Journal of Economic Entomology*, 103, 1031-1038.
- Strand, M. R. (2008). The insect cellular immune response. *Insect science*, 15, 1-14.
- Sugumaran, M., & Barek, H. (2016). Critical analysis of the melanogenic pathway in insects and higher animals. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 1753.
- Tanji, T., Hu, X., Weber, A. N., & Ip, Y. T. (2007). Toll and IMD pathways synergistically activate an innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and Cellular Biology*, 27, 4578-4588.
- Tate, A. T., & Graham, A. L. (2015). Trans-generational priming of resistance in wild flour beetles reflects the primed phenotypes of laboratory populations and is inhibited by co-infection with a common parasite. *Functional Ecology*, 29, 1059-1069.

- Tate, A. T., & Rudolf, V. H. (2012). Impact of life stage specific immune priming on invertebrate disease dynamics. *Oikos*, 121, 1083-1092.
- Tate, A. T., Andolfatto, P., Demuth, J. P., & Graham, A. L. (2017). The within-host dynamics of infection in trans-generationally primed flour beetles. *Molecular Ecology*, 26, 3794-3807.
- Trauer-Kizilelma, U., & Hilker, M. (2015). Insect parents improve the anti-parasitic and anti-bacterial defence of their offspring by priming the expression of immune-relevant genes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 64, 91-99.
- Tetreau, G., Dhinaut, J., Gourbal, B., & Moret, Y. (2019). Trans-generational immune priming in invertebrates: Current knowledge and future prospects. *Frontiers of Immunology*, 10, 1938.
- Voordouw, M. J., Lambrechts, L., & Koella, J. (2008). No maternal effects after stimulation of the melanization response in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Oikos*, 117, 1269-1279.
- Wan, J., Huang, C., Li, C., Zhou, H., Ren, Y., Li, Z., Xing, L., Zhang, B., Qiao, X., Liu, B., Liu, C., Xi, Y., Liu, W., Wang, W., Qian, W., Mckirdy, S., & Wan, F. (2021). Biology, invasion and management of the agricultural invader: Fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Integrative Agriculture*, 20, 646-663.
- Wilson, K., & Graham, R. I. (2015). Transgenerational effects modulate density-dependent prophylactic resistance to viral infection in a lepidopteran pest. *Biology Letters*, 11.
- Wilson, K., Grzywacz, D., Cory, J. S., Donkersley, P., & Graham, R. I. (2021). Trans-generational viral transmission and immune priming are dose-dependent. *Journal of Animal Ecology*, 90, 1560-1569.
- Zhang, L., Ringbauer Jr, J. A., Goodman, C. L., Reall, T., Jiang, X. F., & Stanley, D.

(2018). Prostaglandin-mediated recovery from bacteremia delays larval development in fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Archives of insect Biochemistry and Physiology*, 97, e21444.

Zhang, W., Tettamanti, G., Bassa, T., Heryanto, C., Eleftherianos, I., & Mohamed, A. (2021). Regulators and signalling in insect antimicrobial innate immunity: Functional molecules and cellular pathways. *Cellular Signalling*, 110003.

Zug, R., & Hammerstein, P. (2015). Wolbachia and the insect immune system: what reactive oxygen species can tell us about the mechanisms of Wolbachia–host interactions. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1201.



8. Apéndice

8.1. Experimento piloto

La dosis subletal correspondió a 5 conidios, con esta concentración no se encontraron diferencias significativas al compararlo con el grupo control ($X^2 = 0.4$, $p = 0.53$). La dosis letal fue de 2,000 conidios (**fig. A1**), ya que este grupo sobrevivió significativamente menos que el control ($X^2 = 64$, $p < 0.0001$) e incluso menos que con la dosis de 200 conidios ($X^2 = 10.19$, $p = 0.001$; **fig. A2**).

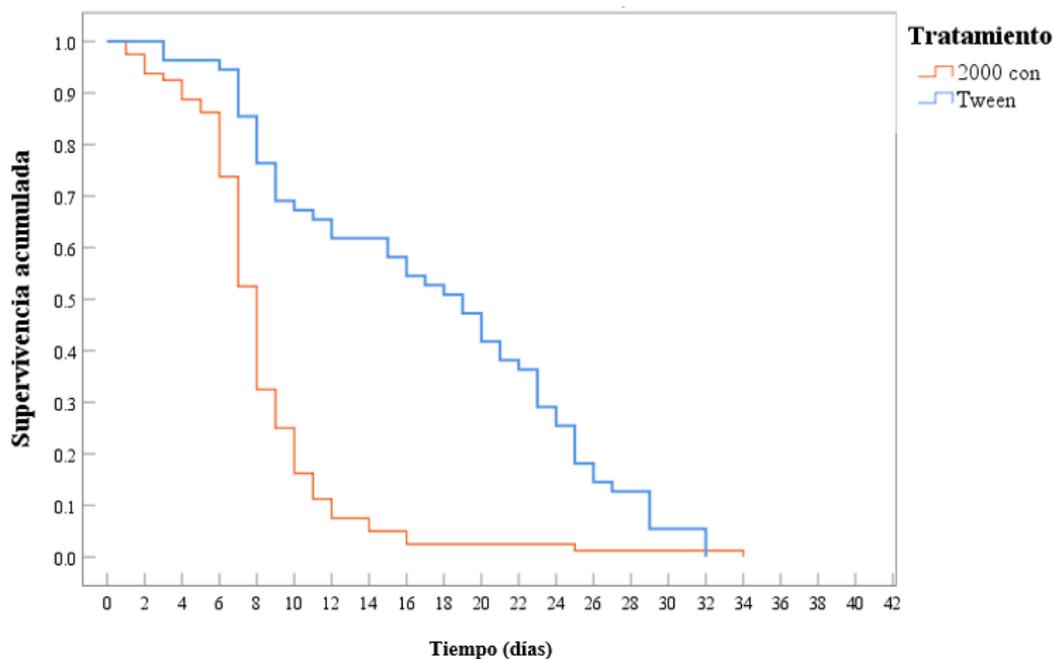


Figura A1. Funciones de supervivencia de individuos retados con 5 conidios/ μL e individuos inyectados con un μL de Tween.

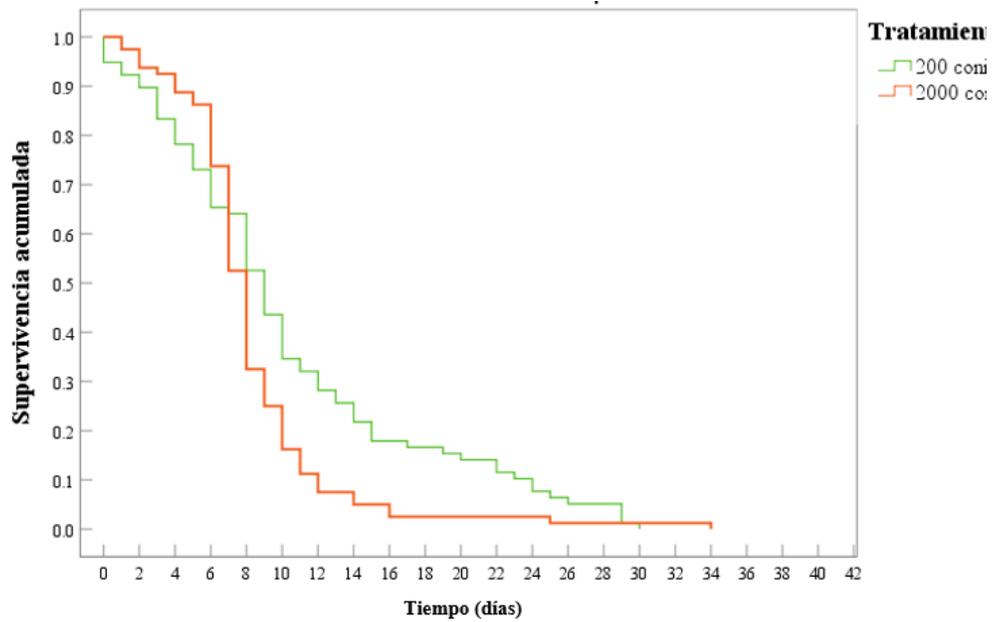


Figura A2. Funciones de supervivencia de individuos retados con 200 conidios/ μL y retados con 2,000 conidios/ μL .

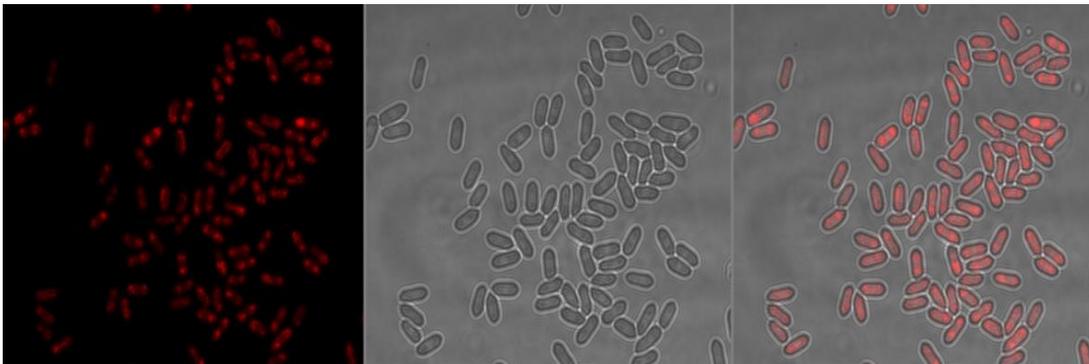


Figura A3. Conidios recuperados de larvas infectadas del grupo homólogo en etapa L6 vistos desde un microscopio de fluorescencia.

	L5 heterólogo	L5 homólogo	
Supervivencia *	30 días	36 días	Supervivencia
Desarrollo (prob. pupar)	9 días	11 días	Desarrollo (prob. pupar)
Proteína	432.09 µg/mL	417.21 µg/mL	Proteína
Actividad de la fenoloxidasa	0.42 (V _{max})	0.31 (V _{max})	Actividad de la fenoloxidasa
Actividad litica	1.61 (V _{max})	1.60 (V _{max})	Actividad litica
Capacidad antioxidante total	301.17 nmol	307.08 nmol	Capacidad antioxidante total
Catalasa	520.14 nmol	712.02 nmol	Catalasa
SOD	93.99%	93.56%	SOD
H ₂ O ₂	508.42 nmol	422.05 nmol	H ₂ O ₂

Figura A4. Resumen de resultados en la etapa L5 comparando el tratamiento homólogo y heterólogo. En esta etapa se encontró evidencia de memoria innata transgeneracional, debido a que el grupo homólogo sobrevivió más días que el heterólogo. Aunque no hubo diferencias significativas en los demás parámetros medidos. El asterisco indica que hay diferencias significativas.

	L6 heterólogo	L6 homólogo	
Supervivencia	12 días	16 días	Supervivencia
Desarrollo (prob. pupar)	7 días	8 días	*Desarrollo (prob pu)
Proteína	1177.64 µg/mL	1142.68 µg/mL	Proteína
Actividad de la fenoloxidasa	113 (V _{max})	0.95 (V _{max})	Actividad de la fenoloxidasa
Actividad lítica *	2.08 (V _{max})	1.87 (V _{max})	* Actividad lítica
Capacidad antioxidante total	34.75 nmol	40.38 nmol	Capacidad antioxidante total
Catalasa	998.33 nmol	152115 nmol	Catalasa
SOD	64.48%	57.97%	SOD
H ₂ O ₂	1774.55 nmol	2645.65 nmol	H ₂ O ₂

Figura A5. Resumen de resultados en la etapa L6 comparando el tratamiento homólogo y heterólogo. En esta etapa se sugiere que no hay memoria innata transgeneracional debido a que el grupo homólogo y heterólogo tuvieron la misma probabilidad de supervivencia. Solamente se encontraron diferencias significativas en la probabilidad de pasar a pupa y en la actividad de la fenoloxidasa. El asterisco indica que hay diferencias significativas.



Figura A6. Resumen de resultados comparando los tratamientos homólogos en las etapas L5 y L6. En la etapa L5 (memoria), los individuos tuvieron una mayor probabilidad de supervivencia, mayor actividad antioxidante total y mayor actividad de la SOD en comparación con el tratamiento homólogo en la etapa L6. Aunque de forma general, en la etapa L6 hubo una mejor respuesta inmunitaria. El asterisco indica que hay diferencias significativas.

Tabla A1. Estadísticos descriptivos de proteína, fenoloxidasa (PO) y actividad lítica en ambas etapas (L5 y L6). Se incluyen los tratamientos control, homólogo y heterólogo.

Desarroll o	Tratamient o	Proteína	PO	Actividad lítica
		media (\pm DE), n	media (\pm DE), n	media (\pm DE), n
L5	Control	576.28 (353.9), 31	0.23 (0.26), 31	1.68 (0.15), 31
	Heterólogo	432.09 (228.5), 31	0.42 (0.54), 31	1.61 (0.12), 31
	Homólogo	417.21 (300.78), 36	0.31 (0.31), 36	1.6 (0.11), 36
L6	Control	1305.05 (501.19), 28	0.7 (0.53), 28	1.79 (0.25), 28
	Heterólogo	1177.64 (510.53), 22	1.13 (0.87), 22	2.08 (0.48), 22
	Homólogo	1142.68 (417.63), 37	0.95 (0.59), 36	1.87 (0.22), 37

Tabla A2. Estadísticos descriptivos de los parámetros de la defensa antioxidante: capacidad antioxidante total (CAT), catalasa, superóxido dismutasa (SOD) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en ambas etapas (L5 y L6) se incluyeron los tratamientos control, homólogo y heterólogo.

Etap pa	Tratamiento	CAT	Catalasa	SOD	H ₂ O ₂
		media (± DE), n	media (± DE), n	media (± DE), n	media (± DE), n
L5	Control	39.43 (3.23), 17	831.49 (205.79), 19	93.99 (5.4), 19	1340.11 (383.91), 15
	Heterólogo	301.17 (124.15), 17	520.14 (136.99), 17	93.99 (5.55), 18	508.42 (162.84), 12
	Homólogo	307.08 (125.67), 17	712.02 (176.22), 19	93.56 (5.24), 15	422.05 (107.43), 19
L6	Control	40.465 (4.59), 18	1376.45 (309.63), 23	78.14 (4.27), 21	2199.14 (532.45), 21
	Heterólogo	34.75 (6.13), 17	998.33 (161.22), 17	64.48 (4.17), 15	1774.55 (526.21), 14
	Homólogo	40.38 (6.69), 17	1521.15 (366.95), 20	57.97 (3.25), 20	2645.65 (656.38), 20

Tabla A3. Resumen de los resultados obtenidos en los análisis de la respuesta inmunitaria. Se muestran las comparaciones entre los tratamientos de la descendencia en etapa L5.

Parámetros inmunitarios	Interacción Etapa*Tratamiento
Proteína	<p>L5 Control > L5 Heterólogo</p> <p>L5 Control = L5 Homólogo</p> <p>L5 Heterólogo = L5 Homólogo</p>
PO	<p>L5 Control < L5 Heterólogo</p> <p>L5 Control = L5 Homólogo</p> <p>L5 Heterólogo = L5 Homólogo</p>
Actividad lítica	<p>L5 Control = L5 Heterólogo = L5 Homólogo</p>
CAT	<p>L5 Control < L5 Heterólogo, L5 Homólogo</p> <p>L5 Heterólogo = L5 Homólogo</p>
Catalasa	<p>L5 Control = L5 Heterólogo = L5 Homólogo</p>
SOD	<p>L5 Control = L5 Heterólogo = L5 Homólogo</p>
H₂O₂	<p>L5 Control > L5 Heterólogo, L5 Homólogo</p> <p>L5 Homólogo = L5 Heterólogo</p>

Tabla A4. Resumen de los resultados obtenidos en los análisis de la respuesta inmunitaria. Se muestran las comparaciones entre los tratamientos de la descendencia en etapa L6.

Parámetros inmunitarios	Interacción Etapa*Tratamiento
Proteína	L6 Control = L6 Heterólogo = L6 Homólogo
PO	L6 Heterólogo > L6 Control L6 Control = L6 Homólogo L6 Heterólogo = L6 Homólogo
Actividad lítica	L6 Heterólogo > L6 Control, L6 Homólogo L6 Control = L6 Homólogo
CAT	L6 Control = L6 Heterólogo = L6 Homólogo
Catalasa	L6 Control = L6 Heterólogo = L6 Homólogo
SOD	L6 Control > L6 Heterólogo, L6 Homólogo L6 Heterólogo = L6 Homólogo
H₂O₂	L6 Control = L6 Heterólogo = L6 Homólogo

Tabla A5. Resumen de los resultados obtenidos en los análisis de la respuesta inmunitaria. Se muestran las comparaciones entre las etapas, los tratamientos y la interacción etapa desarrollo comparando las etapas L5 y L6.

Parámetros inmunitarios	Etapas (Etapas L5 y L6)	Tratamiento (Control, Heterólogo, Memoria)	Interacción Desarrollo*Tratamiento
Proteína	L5 < L6	Control > Memoria, Heterólogo Heterólogo = Memoria	L5 Control, Heterólogo, Homólogo < L6 Control, Heterólogo, Homólogo
PO	L5 < L6	Heterólogo > Control, Memoria Control = Memoria	L5 Control, Heterólogo, Homólogo < L6 Control, Heterólogo, Homólogo
Actividad lítica	L5 < L6	Heterólogo > Control, Memoria Control = Memoria	L5 Control, Heterólogo, Homólogo < L6 Control, Heterólogo, Homólogo
CAT	L5 > L6	Control < Heterólogo, Memoria Heterólogo = Memoria	L5 Control = L6 Control, L6 Heterólogo, L6 Homólogo L5 Heterólogo, L5 Homólogo > L6 Control, L6 Heterólogo, L6 Homólogo

Catalasa	L5 < L6	Control = Heterólogo = Memoria	L5 Heterólogo < L6 Control, L6 Homólogo L5 Heterólogo = L6 Heterólogo L5 Control, L5 Homólogo = L6 Control, L6 Heterólogo, L6 Homólogo
SOD	L5 > L6	Control > Memoria Heterólogo = Memoria Heterólogo = Control	L5 Control, Heterólogo, Homólogo > L6 Control, Heterólogo, Homólogo
H₂O₂	L5 < L6	Control = Heterólogo = Memoria	L5 Control = L6 Control, L6 Heterólogo, L6 Homólogo L5 Heterólogo, L5 Homólogo < L6 Control, L6 Heterólogo, L6 Homólogo