



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

ECOLOGÍA

**CARACTERIZACIÓN E INTERACCIONES TRÓFICAS DE
INSECTOS ASOCIADOS A AGALLAS DE *Coccoloba barbadensis* Jacq.
(Polygonaceae)**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:
IVÓN ANGÉLICA RODRÍGUEZ CIFUENTES**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Alejandro Zaldívar-Riverón
Instituto de Biología**

**COMITÉ TUTOR: Dr. Gerardo Adolfo Salazar Chavez
Instituto de Biología
Dra. Ek del Val de Gortari
Centro de Investigaciones en Ecosistemas (CIEco)**

MÉXICO, D.F.

MAYO, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

ECOLOGÍA

**CARACTERIZACIÓN E INTERACCIONES TRÓFICAS DE
INSECTOS ASOCIADOS A AGALLAS DE *Coccoloba barbadensis* Jacq.
(Polygonaceae)**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

IVÓN ANGÉLICA RODRÍGUEZ CIFUENTES

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Alejandro Zaldívar-Riverón
Instituto de Biología**

**COMITÉ TUTOR: Dr. Gerardo Adolfo Salazar Chavez
Instituto de Biología**

**Dra. Ek del Val de Gortari
Centro de Investigaciones en Ecosistemas (CIEco)**

MÉXICO, D.F.

MAYO, 2015

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité por Campo de Conocimiento de Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 23 de marzo de 2015, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **RODRÍGUEZ CIFUENTES IVÓN ANGÉLICA** con número de cuenta **513452895** con la tesis titulada "**Caracterización e interacciones tróficas de insectos asociados a agallas de *Coccoloba barbadensis* Jacq. (Polygonaceae)**", realizada bajo la dirección del **DR. ALEJANDRO ZALDÍVAR RIVERÓN**:

Presidente: DR. CARLOS RAFAEL CORDERO MACEDO
Vocal: DR. DAVID SEBASTIAN GERNANDT
Secretario: DR. GERARDO ADOLFO SALAZAR CHÁVEZ
Suplente: DR. RICARDO AYALA BARAJAS
Suplente: DRA. VIRGINIA LEÓN REGAGNÓN

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

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 8 de mayo de 2015.



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por el apoyo brindado, por la preparación académica recibida y por las oportunidades de crecimiento académico.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de los estudios de Maestría durante el periodo 2013-2015.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) de la UNAM por los apoyos económicos otorgados para la participación en el “8th International Congress of Hymenopterists” en Julio de 2014 y para la impresión de la tesis.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica Convocatoria PAPIIT 2013. Proyecto No. 200213.

Al Dr. Alejandro Zaldívar Riverón por su confianza y apoyo en cada una de las etapas de la maestría; por la motivación y exigencia para cumplir, tanto con las metas académicas como con muchos retos personales. A los miembros del comité tutorial, Dr. Gerardo Salazar por sus comentarios, la objetividad de sus críticas y aportes al proyecto y la Dra. Ek del Val, por su colaboración y paciencia en el análisis de datos.

Agradecimientos a título personal

A la Madre Naturaleza por su magnificencia y por sorprenderme día a día; por su generosidad y bondad para conmigo. Por permitirme comprender que todos somos uno y que vivimos bajo el mismo manto protector, independientemente del lugar geográfico que habitemos.

Al Ser de la Vida por el camino en el que me ha puesto, por las dificultades y por los aciertos, por las alegrías y por las tristezas, por los momentos de soledad que me han permitido descubrirme y descubrir compañía en mí misma y comprender que realmente nunca estoy sola, por los aprendizajes y por los ángeles que cruza en mi camino día a día.

Al territorio vibrante que me ha permitido conocerme y crecer espiritualmente; al país que me ha brindado invaluable oportunidades y me ha permitido crecer académica y profesionalmente, al país que me abrió sus puertas junto con su gente amable y me ha permitido crecer como persona, al país que llevo en el corazón como un segundo hogar, México.

Al ser que me dio la vida y que a pesar de que no está de cuerpo presente, siempre me consiente, nunca me abandona, ilumina mi andar, me protege, hace parte de mí y cada vez soy más consciente de su presencia en mí vida, el mayor ángel que puedo tener, Mi Madre.

A la maravillosa persona que ha cumplido el deber de ser padre y madre a la vez, que con su ejemplo ha sabido guiar mi camino y con su apoyo y confianza ha logrado tallar mi carácter; lo amo con todo lo que soy, es el motivo de mis logros y el mayor orgullo de mi vida, su amor infinito me ha permitido abrir mis alas, volar y descubrir mi andar, Mi Padre.

A aquellos que silenciosamente apoyan mis días y mis decisiones, Rocío, Daniel y Benjamín.

A los que asumieron la responsabilidad de moldear mi ser y son mi pilar, mi esencia, lo que soy. Sin saberlo son representación de amor, nobleza, entrega y compromiso y que más que sobrina o nieta, me han hecho parte de su vida como hija, Mis Abuelos y mis Tías.

A la persona que depositó su confianza en mí sin conocerme y me permitió medirme lejos de casa, a quién a lo largo de este periodo ha exigido lo mejor de mí y me ha permitido comenzar a descubrir el mundo que él recorre tan cotidianamente y a quién le tengo un gran respeto como profesional y una gratitud infinita por ser un apoyo invaluable en un país ajeno desde el primer día que pisé estas tierras, Alejandro Zaldívar.

A mujeres maravillosas que me han recibido en sus hogares, no como una amiga más de sus hijas, sino como parte de sus familias. Son ustedes ejemplo de amor y generosidad y sin su valiosa ayuda en uno de los momentos más críticos antes de comenzar este viaje, esta aventura nunca hubiera sido la bonita realidad que disfruto hoy. Ese momento lo llevo grabado en mí y siento por ustedes una enorme gratitud por esa luz, ese compartir, ese apoyo, esa confianza, Clemencia Martínez y Patricia Villamil.

A quien a la distancia, ha acompañado cada uno de los días lejos de casa. Todo este tiempo no habría sido tan fácil de sobrellevar sin su amistad, sin su apoyo. Días de mucho hacer, noches de tareas y silencios, palabra en los momentos precisos, confianza de hermanas, compañía cuando hay mucho que hacer, cuando no hay nada que hacer y simplemente estamos. Un lazo de amistad fuerte y profundo, Kelly Luengas.

A quienes tuve el gusto de conocer durante este periodo. A Chamela y su gente, compañeros de posgrado, compañeros de laboratorio. A Andrea Jiménez y Carlos Pedraza por su constante ayuda y aportes significativos a mi aprendizaje. A Valeria Salinas por su confianza y su amistad. A Mónica, Carolina, Ana Belén.

Un agradecimiento especial a los doctores Ricardo Ayala, Carlos Cordero, David Gernandt, Virginia León y Gerardo Salazar por ser parte del jurado evaluador y por sus comentarios, sugerencias, correcciones y aportes constructivos en la finalización del texto de la tesis.

“Sólo la confianza en el Camino, hace que el camino se manifieste”

Paulo Coelho

ÍNDICE

1	Resumen	1
2	Abstract	2
3	Introducción	3
3.1	Interacciones tróficas	3
3.2	Agallas	6
3.3	Órdenes de insectos asociados a agallas	9
3.3.1	<i>Diptera</i>	11
3.3.2	<i>Hymenoptera</i>	13
3.4	Mecanismo de inducción de agallas	16
3.5	Técnicas moleculares para el estudio de interacciones tróficas	17
3.6	Código de barras de ADN	19
3.7	Métodos de delimitación de especies	20
4	Justificación del estudio	23
5	Objetivos	24
5.1	Objetivo general	24
5.2	Objetivos particulares	24
6	Métodos	25
6.1	Área de estudio	25
6.2	Especie hospedera de estudio	25
6.3	Muestreo de agallas e insectos asociados	26
6.4	Identificación morfológica de los insectos	28
6.5	Obtención de secuencias de ADN de los insectos	29
6.6	Delimitación de especies de insectos con base en secuencias de ADN	30
6.7	Identificación taxonómica de insectos con base en secuencias de ADN	32
6.8	Análisis estadísticos	32
7	Resultados	34
7.1	Descripción y abundancia de agallas	34
7.2	Delimitación de especies de insectos	38

7.3	Análisis de secuencias de ADN	42
7.4	Insectos asociados a las agallas.....	44
7.5	Biología de los taxones obtenidos	48
8	Discusión	53
8.1	Fenología de las agallas	53
8.2	Características estructurales de las agallas	54
8.3	Interacción agalla-insecto	55
8.4	Comunidad de insectos asociados a las agallas	57
8.4.1	<i>Métodos de delimitación de especies</i>	57
8.4.2	<i>Insectos asociados a agallas</i>	58
8.5	Inferencias sobre interacciones tróficas	60
9	Conclusiones	65
10	Literatura Citada	67

Lista de Figuras

- Figura 1.** Agallas de *Coccoloba barbadensis*. Estación de Biología Chamela (ECBH) México-Jalisco, 2013. Fotografía de I.A. Rodríguez-Cifuentes.....6
- Figura 2.** (A) Corte transversal de agalla de *Eucalyptus saligna*. nt: tejido nutritivo. (B) Agallas en la parte abaxial de la hoja de la misma especie vegetal, hospedando una larva madura (flechas) en microscopía electrónica de barrido. Fotografías extraídas de Raman y Withers, 2003.....7
- Figura 3.** (A) Agallas en tallos del olmo *Ulmus minor* inducidas por el ácaro *Eriophyes populi*; (B) hojas con agalla inducida por un himenóptero de la especie *Pontania viminalis*; (C) agallas de forma lenticular sobre hojas de roble producidas por un cinípido (Hymenoptera); (D) agallas algodonosas en los tallos de *Artemisia herba-alba* producidas por dípteros cecidómidos. Todas las fotografías fueron extraídas de Nieves-Aldrey, 1998.....8
- Figura 4.** Larva de cecidómido en una agalla de *Coccoloba barbadensis*. Estación de Biología Chamela (ECBH) México-Jalisco, 2013. Fotografía de I.A. Rodríguez-Cifuentes.....12
- Figura 5.** Miembros de familias de Hymenoptera inductores de agallas junto con los tipos de agallas que inducen. (A) Cynipidae. Fotografías de M. Kummel, 2012; (B) Eulophidae. Fotografías de José Marín, 2014; (C) Agaonidae. Fotografías de S. van Noort (Iziko Museums of South Africa).....14
- Figura 6.** Diferentes familias de Hymenoptera parasitoides o inductoras de agallas. (A) Eurytomidae. Fotografía de C. Eiseman, 2012; (B) Pteromalidae. Fotografía de A. Burguers, 2014; (C) Braconidae. Fotografía de A. Zaldívar- Riverón, 2013.....16
- Figura 7.** Ubicación de los árboles de *Coccoloba barbadensis* trabajados en los senderos de la Estación de Biología Chamela (ECBH) México-Jalisco, 2013. Esquema realizado por I.A. Rodríguez-Cifuentes.....27

Figura 8. Relación entre el periodo de muestreo por semanas y el número promedio de todas las agallas recolectadas y disectadas. Las 10 semanas de muestreo se nombraron de acuerdo a los dos primeros días de cada semana.....	35
Figura 9. Cuatro de los cinco morfotipos de las agallas presentes en las hojas de <i>Coccoloba barbadensis</i> (morfotipos1-4; veáse texto). Estación de Biología Chamela (ECBH) México-Jalisco, 2013. Fotografías de I.A. Rodríguez-Cifuentes.....	36
Figura 10. Porcentaje de morfotipos de agallas (M) presentes en las hojas de <i>Coccoloba barbadensis</i> durante el muestreo febrero-mayo de 2013.....	37
Figura 11. Morfotipos de agallas de las hojas de <i>Coccoloba barbadensis</i> con respecto al tiempo de muestreo.....	38
Figura 12. Fenograma obtenido con el método Neighbour-Joining empleando el modelo de evolución de 2 parámetros Kimura. Las morfoespecies de las diferentes familias están resaltadas con distintos colores. En los recuadros negros dentro del mapa están señaladas las morfoespecies incongruentes entre los análisis de delimitación de especies. Al final del nombre de cada morfoespecie se encuentra señalado con un número el tipo de agalla del que fue recolectado (1, 2, 3, 4 y 5) y el estado de desarrollo en que fue recolectado: Individuo adulto o pupa=A; larva=L. Escala 20.0 sust/sitio.....	40
Figura 13. Árbol ultramétrico reconstruido a partir de la delimitación de especies por el modelo general mixto de coalescencia de Yule (GMYC). Las especies delimitadas con este método están diferenciadas por colores. Las letras a la derecha de cada taxón terminal corresponden al tipo de agalla del que fue recolectado (1, 2, 3, 4 y 5) y el estado de desarrollo en que fue recolectado: Individuo adulto o pupa=A; larva=L.....	41
Figura 14. Fenogramas obtenidos en MEGAN indicando la identificación taxonómica de las 41 MOTUS obtenidas en el programa QUIIME. La búsqueda empleó dos valores de “Top Percent” (5 y 2%). Las identificaciones taxonómicas se restringieron tanto a nivel de familia, A) 5% y B) 2%, como de género, C) 5% y D) 2%.....	42
Figura 15. Familias de insectos asociados a las agallas de <i>C. barbadensis</i> a lo largo de todo el periodo de muestreo.....	46

Figura 16. Análisis de correspondencia entre los tipos de agallas y las especies de insectos delimitadas. Los puntos en azul corresponden a los tipos de agallas y los cuadrados rojos corresponden a las especies de insectos organizadas: 1 a 5 Especies de Platigastridae 01-05; 6 Especie Telenominae 01; 7 a 15 Especies de Eurytomidae 01- 09; 16 a 20 Especies de Tetrastichinae 01- 05; 21 a 27 Especies de Entedoninae 01- 07; 28 Especie de Allorhogas 01; 29 Especie de Torymidae 01; 30 a 36 Especies de Cecidomyiidae 01- 07.....47

Figura 17. Posibles interacciones entre las familias de Diptera e Hymenoptera encontradas en el estudio de acuerdo a la biología general de los grupos. La línea continua refiere a las familias de Hymenoptera que son parasitoides de los diferentes estadios de Cecidomyiidae, mientras que la línea punteada refiere a las posibles interacciones de hiperparasitoidismo o predación entre las de familias de Hymenoptera. Esquema realizado por I.A. Rodríguez-Cifuentes.....63

Lista de Tablas

Tabla 1. Órdenes de la Clase Insecta formadores de agallas.....	10
Tabla 2. Lista de ordenes, familias y subfamilias identificadas con el número de especies delimitado por el criterio de distancias corregidas del 2% (CDC) y el modelo general mixto de coalescencia de Yule (GMYC).....	39
Tabla 3. Riqueza de especies asociadas a los diferentes tipos de agallas encontrados en <i>C. barbadensis</i>	45
Tabla 4. Familias, tribus, subfamilias y géneros de Diptera e Hymenoptera y número de especies encontradas en el estudio con información sobre su biología de acuerdo con la literatura.....	51

RESUMEN

Las agallas vegetales se definen como el crecimiento anormal de tejidos u órganos de plantas en respuesta a actividad o presencia de un organismo inductor. Mediante la formación de la agalla, el inductor asegura alimento y protección frente a enemigos naturales y al medio por determinados periodos de tiempo. Además de los formadores de agallas, otros insectos también están asociados a estas formaciones, incluyendo inquilinos y parasitoides. En este estudio, se caracterizaron las especies de insectos asociados a agallas de hojas de *Coccoloba barbadensis* (Polygonaceae) en la Estación Biológica de Chamela, Jalisco, en la costa del Pacífico de México, con el fin de inferir sus asociaciones tróficas. Se distinguieron cinco morfotipos de agallas y se recolectaron larvas y adultos de insectos presentes en éstas durante febrero-mayo y noviembre de 2013. Los insectos fueron identificados utilizando morfología externa y secuencias de ADN del gen mitocondrial COI. A partir de estas últimas, se distinguieron 35 y 39 especies putativas con el criterio de 2% de divergencia genética y el modelo de GMYC, respectivamente. Las especies encontradas pertenecen a Lepidoptera (3 spp.), a una familia de Diptera (Cecidomyiidae, 7 spp.) y a cinco de Hymenoptera (Platygastridae, 6 spp.; Braconidae, 1 sp.; Eulophidae, 10 spp.; Eurytomidae, 7 spp.; Torymidae, 1 sp.). Las relaciones tróficas de estos insectos sugeridas a partir de la literatura disponible indica que los dípteros cecidómidos pueden ser los responsables de la inducción de las agallas de *C. barbadensis*, mientras que las especies de Hymenoptera podrían ser inquilinas de las agallas, parasitoides de los dípteros, o hiperparasitoides. La presencia de diferentes morfotipos de agallas en las hojas de *C. barbadensis* muestra la gran variedad de características estructurales asociadas a las agallas en general, y que la comunidad de insectos asociados a ellas es mucho mayor de lo que se esperaba. El presente estudio representa la primera investigación sistemática acerca de la fenología de agallas y la riqueza de especies de insectos asociados en una especie de la familia Polygonaceae.

ABSTRACT

Galls are defined as abnormal growth of tissue or organs of plants in response to activity or presence of an inducing arthropod. Through gall formation, the galler ensures its food and protection from natural enemies and the environment during specific periods of its life. Besides gall formers, other insects are also associated with galls, including those that feed on gall tissue (inquilines) and parasitoids. In this study, the insect species associated with leaf galls of *Coccoloba barbadensis* (Polygonaceae) at the Biological Station of Chamela, Jalisco, were characterized in order to infer their trophic associations. Five different types of galls were discriminated, and insects (larvae and adults) occurring in them were collected during a five months period (February-May 2013). Insects were identified using both morphology and sequences of the COI mitochondrial DNA gene. A total of 35 and 39 putative species were delimited with the 2% divergence criterion and the GMYC model, respectively. These species belong to Lepidoptera (3 spp.) and one dipteran (Cecidomyiidae, 7 spp.) and five hymenopteran (Platygastridae, 6 spp.; Braconidae, 1 sp.; Eulophidae, 10 spp.; Eurytomidae, 7 spp.; Torymidae, 1 spp.) families. The presumed trophic association of this species based on the available literature suggests that cecidomyiids might be responsible for inducing leaf galls on *C. barbadensis*, whereas among the hymenopteran species there are inquilines, galler parasitoids and hyperparasitoids. The presence of various types of leaf galls on *C. barbadensis* reveals their great variety of structural features and an unexpected species richness of insect associated to this system. This represents the first study that seeks to investigate the phenology of galls and their associated insect species richness in a plant species of the family Polygonaceae.

INTRODUCCIÓN

1.1 Interacciones tróficas

La mayoría de los organismos en cualquier ecosistema interactúan simultáneamente de manera directa o indirecta con más de una especie. Las interacciones entre múltiples especies pueden suceder de manera sinérgica o antagónica e influir en los resultados ecológicos y evolutivos de la interacción entre cada par de especies, por lo cual el estudio de las redes de interacciones emergen como una herramienta apropiada para estudiar la complejidad de la naturaleza (Bascompte, 2007; Boege y Carmona, 2012). En una comunidad, las especies se encuentran conectadas mediante relaciones tróficas donde los individuos pueden verse perjudicados, beneficiados o no afectados, de manera que en la obtención de recursos necesarios para sobrevivir sucede un intercambio de bienes y servicios que incluyen alimentación, transporte y protección, entre otros (del Val y Boege, 2012).

Las interacciones bióticas se clasifican de acuerdo al efecto que causan sobre los individuos que están implicados en ellas. La interacción en la que los individuos de dos especies resultan afectados negativamente de manera simultánea y existe una limitación del crecimiento y la reproducción de los mismos por la limitación de recursos es un antagonismo que se conoce como competencia (Schoonhoven *et al.*, 1998; Gotelli, 2008). Durante la competencia interespecífica, los individuos de una especie sufren una reducción en su supervivencia, crecimiento o fecundidad como resultado de la reducción de recursos, causada por individuos de otra especie (Holway, 1999). Por su parte, la competencia intraespecífica sucede cuando una población crece más allá de la capacidad de carga del ambiente que habita y los recursos comienzan a escasear (Gotelli, 2008). Los efectos de las interacciones competitivas se expresan en la dinámica de poblaciones y pueden influir en la distribución y evolución de las especies (Gaxiola y Armesto, 2012).

Otra interacción antagónica se refiere a la depredación, que implica el consumo de un organismo presa por parte del depredador, encontrándose la presa viva cuando éste la ataca por primera vez (Gotelli, 2008). Dentro de los depredadores se encuentran los que son

generalistas, quienes consumen una amplia variedad de recursos, y los especialistas, que se concentran en un tipo determinado de recurso (Begon y Harper, 1996).

Existen diferentes formas de depredación, entre ellas el parasitismo, que se define como una relación íntima y unidireccionalmente obligatoria entre dos organismos heteroespecíficos durante la cual el parásito, usualmente más pequeño, depende metabólicamente del hospedero. El tiempo de interacción entre el parásito y el hospedero es alto, y por lo general el parásito se alimenta de una o pocas presas durante toda su vida y consume una o pocas partes de su presa (Gotelli, 2008). El parasitoidismo, por otra parte, es una relación interespecífica intermedia entre el parasitismo y la depredación (Begon y Harper, 1996). Los parasitoides pueden interactuar con sus presas como endo- o ectoparásitos y pueden paralizar el desarrollo de sus presas en el momento de la puesta, dejando un huevo dentro o cerca de sus presas para que la larva, después de que eclosiona el huevo, consuma al huésped inmóvil e indefenso, actuando como *parasitoides idiobiontes* ó, una vez que la hembra adulta del parásito ha efectuado la puesta sobre los hospederos, permiten que la larva de hospedador continúe desarrollándose mientras el parásito se va alimentando de sus órganos no vitales, actuando como *parasitoides koinobiontes* (fernández y Sharkey, 2006).

Los parasitoides adultos son animales de vida libre que pueden ser tanto herbívoros como depredadores específicos y pueden dispersarse activamente en busca de sus presas (Godfray, 1994). Sin embargo, se ha reportado que en insectos sociales pueden existir relaciones de parasitoidismo intraespecífico, donde las colonias son vulnerables al parasitoidismo reproductivo por parte de la casta obrera de la colonia o de colonias vecinas (Oldroyd *et al.*, 1994; Härtel *et al.*, 2006), ya que los machos pueden fecundar tanto los huevos de la reina, como los de otras obreras (Beekman y Oldroyd, 2008).

Finalmente, dentro de las interacciones antagónicas se encuentra la herbivoría, la cual es una interacción entre plantas y animales donde los animales consumen el tejido de las plantas para cubrir sus requerimientos energéticos y la planta pierde tejido con repercusiones frecuentemente negativas para su desempeño o adecuación (Coley y Barone, 1996; Schoonhoven *et al.*, 1998). La herbivoría representa una presión de selección para la evolución de la respuesta de defensa de la planta contra el ataque de animales herbívoros

(Belsky *et al.*, 1993). En ocasiones, este tipo de interacción no causa efectos sobre la planta en general o por sobrecompensación, pueden suceder efectos positivos como el incremento en la cantidad de biomasa de la planta, luego del ataque del herbívoro; el aumento de la producción de semillas y la supervivencia de las plántulas (Paige y Whitham, 1987).

Cuando dos individuos de diferentes especies se ven beneficiados por su presencia mutua y la relación no es ni permanente ni obligatoria, esta interacción se conoce como mutualismo (Gotelli, 2008). El mutualismo presenta diferentes categorías, como por ejemplo la polinización, donde se busca el traspaso de granos de polen desde los estambres de una flor hasta el estigma de otras flores, tras lo cual el polen germina y fecunda los óvulos de la flor, permitiendo la producción de semillas y frutos (Begon y Harper, 1996). Además del transporte del polen, otra de las relaciones mutualistas que desempeña un papel fundamental en la estructura de la vegetación y en el mantenimiento de la diversidad es la dispersión de semillas (Herrera y Pellmyr, 2002). En la dispersión, la formación de la semilla y el establecimiento de una nueva plántula está influenciada por una serie de factores que juegan un papel determinante en el destino de la semilla, ya que tienen el potencial de influir en la adecuación de una planta, en la dinámica poblacional de una especie y en la estructuración de las comunidades vegetales (Andresen, 2012).

Cuando los efectos positivos o negativos de las interacciones bióticas se ven reflejados en la adecuación de los individuos al entorno, es probable que estas relaciones afecten procesos demográficos, ecológicos o evolutivos, por lo que para entender los diferentes aspectos de las especies y el funcionamiento de los ecosistemas es indispensable considerar las interacciones tróficas (Montoya *et al.*, 2006). Además, el hecho de que las interacciones sean importantes factores de selección natural (Cattin *et al.*, 2004) y promuevan la evolución de múltiples soluciones adaptativas las coloca como una de las causas más importantes de la gran biodiversidad que se observa en el planeta en la actualidad (Bascompte, 2007; Cagnolo y Valladares, 2011; del Val y Boege, 2012).

Dentro de la biodiversidad del planeta, los artrópodos en general están involucrados en la mayoría de las interacciones multiespecíficas (Triplehorn y Johnson, 2005). Los artrópodos desempeñan un papel determinante en todas las comunidades biológicas, ya que interactúan de diferentes maneras con otros animales y con las plantas, siendo éstas las

principales productoras de materia orgánica (Papaj y Lewis, 1993). Los artrópodos establecen relaciones alimenticias, de supervivencia, transporte, protección, etc., de diferente grado entre ellos mismos y con el ambiente, interactuando con otros animales que se alimentan de plantas, con animales que se alimentan de otros animales o incluso con materia orgánica en descomposición, convirtiéndose en consumidores secundarios, terciarios y cuaternarios dependiendo del caso (Basset *et al.*, 2003). Las relaciones ecológicas de los artrópodos con otros miembros de una comunidad constituyen redes de interacción donde cada especie se alimenta y es consumida por otras especies debido a que en cada una de las categorías de interacción las especies varían de acuerdo a sus preferencias alimenticias y a su nicho ecológico (Triplehorn y Johnson, 2005).

1.2 Agallas

Entre muchas especies de artrópodos que dependen de las plantas para su alimentación, un gran número de ellos interactúa muy estrechamente con las plantas, induciendo el desarrollo de estructuras de encierro conocidas como “agallas” (Raman *et al.*, 2005). Las agallas vegetales (Figura 1) se definen como el crecimiento anormal de tejidos u órganos de plantas en respuesta a la actividad o presencia de un organismo inductor (Nieves-Aldrey, 1998; Redfern y Shirley, 2002; Price, 2005). La formación de la agalla sucede por la modificación de los tejidos de la planta hospedera, de manera que el artrópodo inductor o cecidógeno (*i.e.* organismo que produce la agalla) asegura su alimento y protección frente a enemigos naturales y al medio ambiente por determinados periodos de tiempo de su historia de vida (Nieves-Aldrey, 1998; Raman y Withers, 2003).



Figura 1 Agallas de *Coccoloba barbadensis*. Estación de Biología Chamela (ECBH) México-Jalisco, 2013. Fotografía de I.A. Rodríguez-Cifuentes

Para la planta, la modificación de tejidos por parte de la estimulación de los insectos formadores de agalla resulta en modificaciones que van desde la remoción de los tejidos o daño físico de los tejidos vasculares (Raman y Dhileepan, 1999) hasta la manipulación y alteración de la síntesis y transporte de los nutrientes de la planta, afectando el ciclo de vida de la planta en desarrollo (Rohfritsch, 1988). En plantas jóvenes, las agallas reducen considerablemente las tasas fotosintéticas y de transpiración, mientras que en plantas maduras afecta la conductancia de los estomas y reduce el potencial hídrico (Flinn *et al.*, 1990; Larson, 1998), especialmente cuando estas se encuentran en etapa de floración. Las agallas interfieren en la concentración de minerales como el boro, cloro, magnesio y zinc y compuestos fotosintéticos, lo que provoca estrés en la planta (Paquette *et al.*, 1992). De cierta manera, las agallas secuestran nutrientes que la planta utilizaría en su crecimiento y reproducción (Florentine *et al.*, 2005).

Durante la cecidogénesis (*i.e.* desarrollo de la agalla), el artrópodo inhibe el crecimiento normal de la planta hospedera e induce respuestas morfogénicas y fisiológicas en ella (Inbar *et al.*, 2004) (Figura 2A y 2B). Debido a que éstas respuestas son específicas, el organismo que induce la agalla obtiene una nutrición adecuada en un ambiente limitado (Raman *et al.*, 2005).

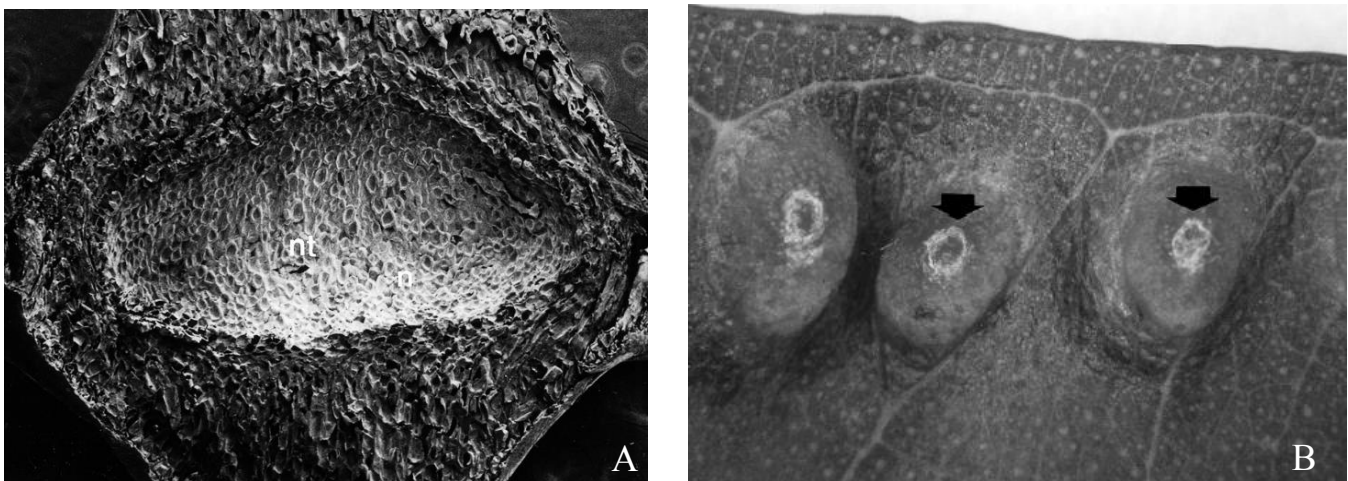


Figura 2. (A) Corte transversal de agalla de *Eucalyptus saligna*. nt: tejido nutritivo. (B) Agallas en la parte abaxial de la hoja de la misma especie vegetal, hospedando una larva madura (flechas) en microscopía electrónica de barrido. Fotografías extraídas de Raman y Withers, 2003

Las agallas producidas por artrópodos son variables en forma, presentan diferentes tipos de crecimiento, tanto positivo como negativo, y causan una diferenciación anormal en los tejidos de la planta hospedera (Redfern y Shirley, 2002). Esta gran variedad de estructuras y complejidad de las agallas (Figura 3) se debe en parte a que son producidas por un gran número de organismos. Las agallas inducidas por artrópodos son las más frecuentes, debido a que esta asociación ha surgido independientemente un gran número de veces, aunque no sucede en todos los órdenes de Arthropoda (Nieves-Aldrey, 1998).

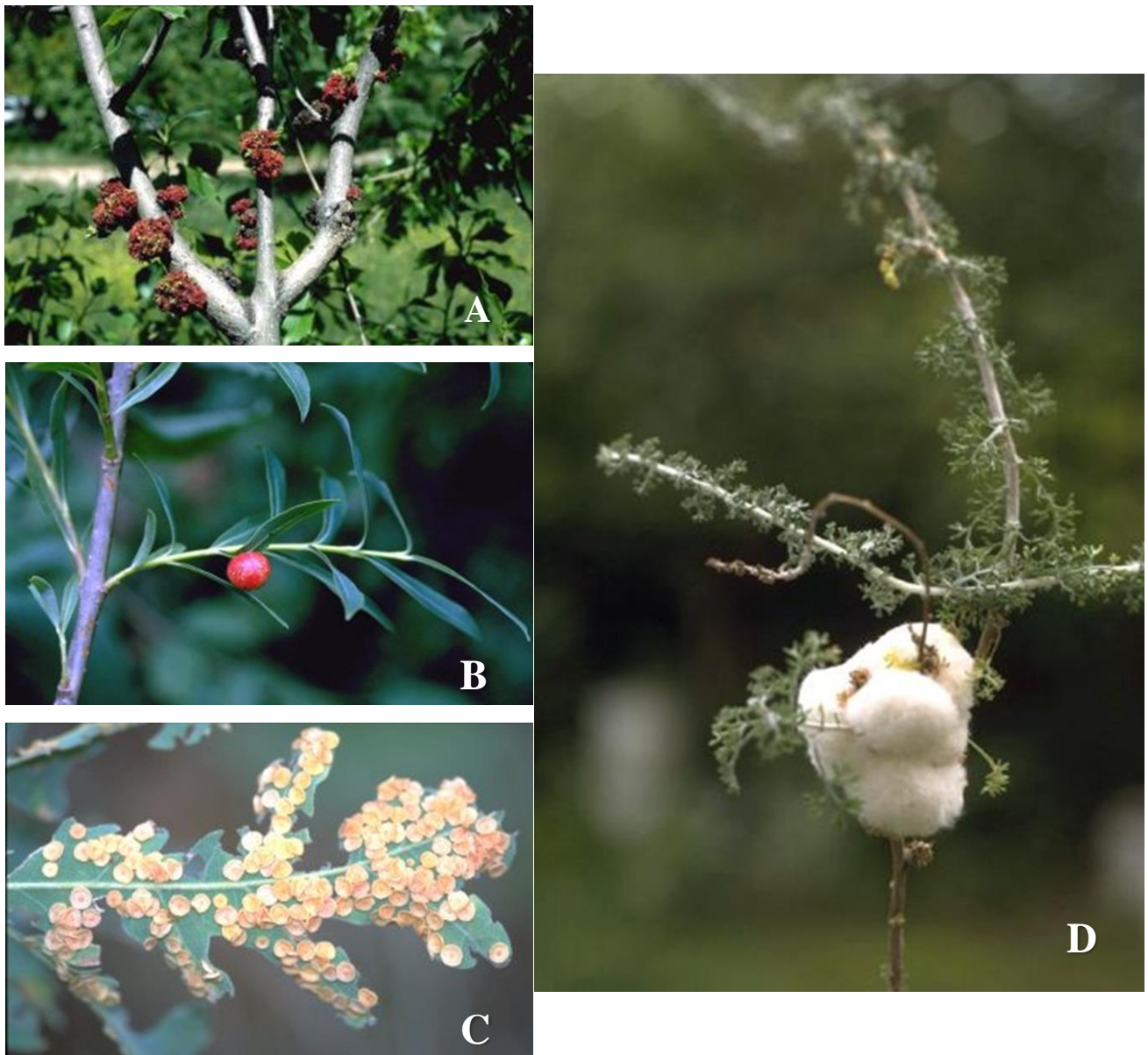


Figura 3. (A) Agallas en tallos del olmo *Ulmus minor* inducidas por el ácaro *Eriophyes populi*; (B) hojas con agalla inducida por un himenóptero de la especie *Pontania viminalis*; (C) agallas de forma lenticular sobre hojas de roble producidas por un cinípido (Hymenoptera); (D) agallas algodonosas en los tallos de *Artemisia herba-alba* producidas por dipteros cecidómidos. Todas las fotografías fueron extraídas de Nieves-Aldrey, 1998

Las agallas son sistemas sutiles y complejos que involucran dos participantes, el inductor de la agalla y la planta hospedera. El comportamiento alimenticio especializado del agallero hace que éste se limite a atacar una sola especie de planta y logre una eficiente utilización del recurso al inducir la agalla (Florentine *et al.*, 2005). Además al estar ocultos, los inductores de agallas presentan características especializadas en su fisiología y sus dinámicas poblacionales (Schoonhoven *et al.*, 1998).

El sistema agalla-artrópodo se caracteriza por: (1) la correcta selección del estado de desarrollo del órgano o tejido de la planta hospedera; (2) la colonización altamente especializada y/o comportamiento de ovoposición de la hembra grávida; (3) la activación a tiempo de las modificaciones fisiológicas en la agalla; y (4) la dehiscencia o ruptura de la agalla, sincronizada con la maduración del artrópodo permitiendo su emergencia (Raman, 1994). El contexto ecológico del desarrollo de la agalla se puede explicar como un proceso equilibrado entre los estímulos del inductor y la respuesta de defensa de la planta hospedera (Rohfritsh, 1992). Por lo tanto, una agalla representa el cumplimiento de una serie de interacciones complejas y coordinadas entre la planta y el artrópodo (Florentine *et al.*, 2005).

Las agallas pueden ser buenos indicadores de la calidad del hábitat en determinados lugares (Fernández *et al.*, 2005), debido a que la riqueza de especies inductoras de agallas será mayor en en hábitats que presentan mayores condiciones de estrés como sequía, déficit de nutrientes, estrés hídrico y desecación atmosférica (Fernández *et al.*, 1993). Además, la modificación del hábitat por procesos antropogénicos puede cambiar significativamente la distribución espacial de las agallas a escala local (Juliaô *et al.*, 2005).

1.3 Órdenes de insectos asociados a agallas

Actualmente se conocen más de 15,000 especies de organismos capaces de inducir la formación de agallas entre los que se cuentan virus, bacterias, algas, hongos, protozoos, rotíferos, nemátodos, ácaros e insectos (Nieves-Aldrey, 1998). En los diferentes órdenes de Arthropoda que se alimentan o están estrechamente relacionados con plantas, los inductores

de agallas difieren entre sí por sus mecanismos de inducción, sus efectos sobre los sus hospederos, sus métodos de alimentación, así como por sus ciclos de vida (Inbar *et al.*, 2004; Raman *et al.*, 2005). Además, es interesante resaltar la capacidad desarrollada independientemente en muchos taxones de reproducir los procesos de crecimiento de la planta hospedera, orientándolos para proporcionar cobijo y nutrición adecuados para el artrópodo gallicola (Nieves-Aldrey, 1998).

A la fecha, se conocen unas 13,000 especies de insectos formadores de agallas, de las que un 98% están asociadas a angiospermas (Triplehorn y Johnson, 2005). Los insectos gallicolas se agrupan en dos grandes grupos (Tabla 1): uno de ellos comprende los insectos picadores (p. ej. tisanópteros, hemípteros y homópteros), para quienes la formación de una agalla se relaciona esencialmente con la alimentación. El segundo grupo incluye órdenes como Coleoptera, Lepidoptera, Diptera e Hymenoptera, para quienes la inducción de la agalla es consecutiva a la puesta y al desarrollo de las larvas (Nieves-Aldrey, 1998).

Tabla 1. Órdenes de la Clase Insecta formadores de agallas

Gallicolas por picadura alimenticia			
<i>Orden</i>	<i>Familia</i>		
Thysanoptera	---		
Hemiptera	Tingidae		
Homoptera	Cercopidae		
	Cicadellidae		
	Psyllidae		
	Aphididae		
	Coccidae		
Gallicolas por ovoposición			
<i>Orden</i>	<i>Familia</i>	<i>Orden</i>	<i>Familia</i>
Lepidoptera	Tortricidae	Diptera	Cecidomyiidae
	Gelechiidae		Tephritidae
Coleoptera	Curculionidae	Hymenoptera	Cynipidae
	Apionidae		Eurytomidae
	Buprestidae		Braconidae
			Agaonidae
	Tenthredinidae		

Además de los inductores de agallas, otros insectos también están asociados a este tipo de formación, entre los que se encuentran especies inquilinas o cleptoparásitas, que crecen en agallas inducidas por otros organismos y se alimentan principalmente del tejido de la agalla (Hanson y Gauld, 2006). Los cleptoparásitos pueden o no causar la muerte del insecto inductor de la agalla, además de producir modificaciones en la estructura de la planta a pesar de que no pueden inducir la formación de su propia agalla (Fernández y Sharkey, 2006). También se pueden encontrar en las agallas parasitoides de los insectos gallícolas como de los inquilinos, así como hiper-parasitoides, es decir, parasitoides de parasitoides (Hanson y Gauld, 2006).

1.3.1 Diptera

Dentro de los insectos formadores de agallas, los dípteros de la familia Cecidomyiidae son uno de los grupos más abundantes y con mayor riqueza de especies (Raman, 2011) (Figura 4). Si bien el hábitat del insecto agallero no muestra un patrón específico de distribución, la mayoría de dípteros cecidómidos están adaptados a áreas que presentan una sequía estacional marcada (Fernández *et al.*, 1993; 1994). La riqueza de estas especies se incrementa a medida que el ambiente se torna más seco, sugiriendo una estrecha asociación entre la diversidad de especies formadoras de agallas y la vegetación de climas mesofíticos (Yukawa y Rohfritsch, 2005).

Las especies de dípteros agalleros pueden ser monófagas, parasitando sólo una especie de planta hospedera u oligófagas, donde el desarrollo larval está restringido a dos o más especies de plantas dentro de un mismo género o a diferentes especies de plantas que pertenecen a más de un género, pero siempre dentro de una misma familia (Yukawa y Masuda, 1996).

Independientemente de la planta, al momento de emerger la hembra puede colocar de 40 a 400 huevos maduros, razón por la cual muchas de las hembras de varias especies de la familia Cecidomyiidae comienzan la ovoposición tan pronto se aparean (Kolesik, 1993). Estos huevos pueden ser ovopositados dentro o fuera del tejido vegetal, de manera gregaria o individual y permanecen en este estadio de 4 a 8 días (Raman *et al.*, 2005). Aquellas larvas que eclosionan de los huevos que fueron puestos en la parte exterior de la hojas y

que logran sobrevivir, se mueven a otros lugares de la planta de donde puedan alimentarse (Yukawa y Rohfritsch, 2005).



Figura 4. Larva de cecidómido en una agalla de *Cocoloba barbadensis*. Estación de Biología Chamela (ECBH) México-Jalisco, 2013. Fotografía de I.A. Rodríguez-Cifuentes

Las historias de vida de los dípteros agalleros están estrechamente relacionadas con la fenología de su planta hospedera (Raman, 1994). Por ejemplo, en regiones templadas, muchos árboles producen nuevos brotes y flores una vez al año, haciendo que sus agalleros sean univoltinos (Yukawa y Rohfritsch, 2005). Los patrones de historia de vida de los dípteros agalleros se pueden dividir en dos grandes grupos, cada uno dividido en dos subgrupos (Yukawa, 1987):

- (1) **Tipo IA.** La larva madura rápidamente, sale de la agalla y cae al suelo, generalmente antes del verano.
- (2) **Tipo IB.** La larva madura no abandona la agalla, pero la agalla se desprende y cae al suelo, generalmente a comienzos del verano o finalizando el otoño.
- (3) **Tipo IIA.** La larva completamente desarrollada permanece en la agalla adherida a la hoja de la planta durante el invierno y pupa dentro de la agalla hasta la siguiente primavera. Este tipo de crecimiento es el más lento.
- (4) **Tipo IIB.** La larva no madura hasta la próxima primavera y la duración del primer estadio larval es el más largo de los cuatro tipos.

1.3.2 *Hymenoptera*

Por su parte, los agalleros en el orden Hymenoptera están representados por grupos con especies fitófagas que se alimentan de las hojas de manera externa, por minadores de hojas y por especies gallícolas (*i.e.* formadores de agallas) (Hanson y Gauld, 2006). Las especies gallícolas, pertenecientes a familias como Cynipidae, Agaonidae, Eulophidae, Eurytomidae, Pteromalidae, Tanaostigmatidae, Torymidae y Braconidae, son usualmente específicas con respecto a su hospedero y por lo general cada especie induce la formación de agallas en un lugar determinado de la planta (Fernández y Sharkey, 2006). A continuación se mencionan las características generales de cada una de estas familias de himenópteros agalleros:

Cynipidae. Las especies inductoras de agallas en Hymenoptera pertenecen en su mayoría a la familia Cynipidae. Las agallas inducidas por estas avispas son las más especializadas y estructuralmente complejas de todas las zoocecidias (*i.e.* agallas producidas por animales) y son el segundo grupo con mayor riqueza de agalleros después de Cecidomyiidae (Diptera) (Gómez *et al.*, 2006). Una de las características distintivas de Cynipidae es que presenta una asociación obligatoria con diversas plantas fanerógamas en las que inducen la formación de agallas, las cuales presentan estructuras morfológicas anormales, cualitativamente diferentes de los órganos de la planta de donde se originan, y con alto grado de diferenciación tisular que depende de la especie de cinípido inductora (Figura 5A). Las agallas de los cinípidos pueden formarse sobre hojas, tallos, yemas, flores o frutos y también en las partes subterráneas de la planta como raíces o estolones (Nieves-Aldrey, 2001).

Eulophidae. Los eulófidos cuentan con una gran riqueza de especies. Son principalmente parasitoides de estadios inmaduros de insectos holometábolos, sobre todo de hospederos que viven ocultos dentro del tejido vegetal, como minadores, enrrolladores de hojas y productores de agallas (Fernández y Sharkey, 2006). Las especies de Eulophidae que son parasitoides atacan los estadios larvales y pre-pupales de sus hospederos, aunque algunos parasitan huevos, pupas e incluso individuos adultos (La Salle, 2005) (Figura 5B). Algunos miembros de la subfamilia Tetrastichinae son fitófagos, y en su mayoría se

desarrollan como inquilinos de agallas hospederas, aunque algunos pueden ser productores de agallas (Hanson y Gauld, 2006).

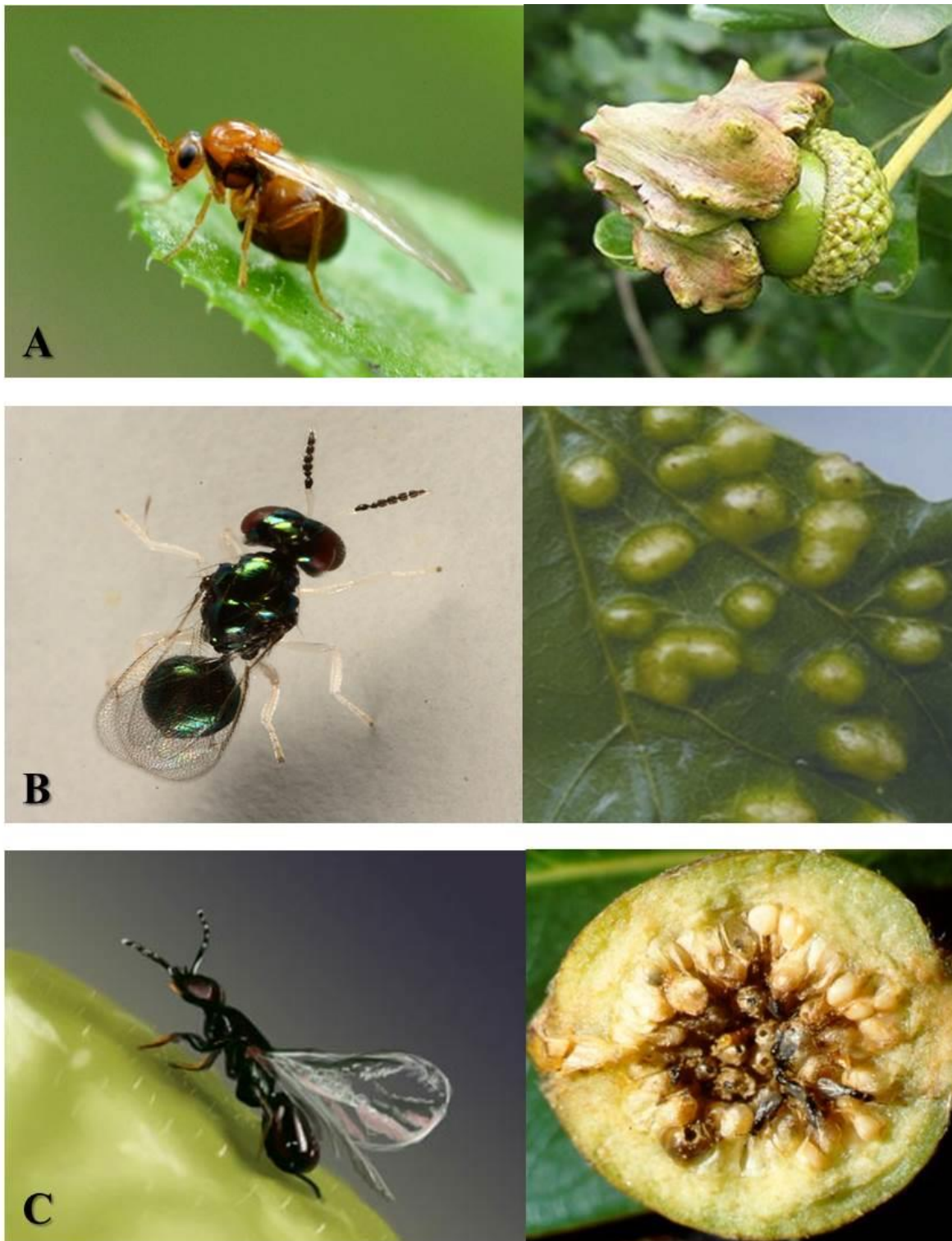


Figura 5. Miembros de familias de Hymenoptera inductores de agallas junto con los tipos de agallas que inducen. (A) Cynipidae. Fotografías de M. Kummel, 2012; (B) Eulophidae. Fotografías de José Marín, 2014; (C) Agaonidae. Fotografías de S. van Noort (Iziko Museums of South Africa)

Agaonidae. Las avispas agalleras de la familia Agaonidae (Figura 5C) han coevolucionado junto con su planta hospedera para explotar la asociación Agaonidae-*Ficus* como formadores de agallas, parasitoides y cleptoparásitos. Todas las avispas agaónidas se desarrollan a partir de larvas colocadas dentro de los embriones del higo. En este grupo, los machos emergen primero y copulan a la hembra que permanece dentro de las agallas; éstas al salir colectan el polen de las flores macho y polinizan las flores hembra dónde van a ovipositar (Fernández y Sharkey, 2006).

Eurytomidae. Las larvas de Eurytomidae (Figura 6A) pueden ser fitófagas o entomófagas. Estas últimas parasitan estadios larvales o pupas de Coleoptera, Diptera e Hymenoptera que viven ocultos dentro del tejido vegetal y es probable que sean idiobiontes parasitoides solitarios. La mayor parte de las especies pertenecientes al género más grande de esta familia, *Eurytoma*, suelen ser idiobiontes ectoparasitoides de insectos formadores de agallas, donde la larva luego de devorar al hospedero también devora tejidos de la agalla, de manera que también puede desarrollarse como inquilina (Gates y Hanson, 2006).

Pteromalidae. Las especies de la familia Pteromalidae (Figura 6B) en su mayoría son parasitoides de larvas y pupas de insectos holometábolos como Coleoptera y Diptera que viven ocultas, como en los tejidos de las plantas (Hanson y Gauld, 2006). Sin embargo, el conocimiento de la biología de este grupo es aún muy limitado y no se sabe con precisión si muchas de sus especies son inductores de agallas, inquilinos o parasitoides (La Salle, 2005).

Braconidae. En décadas recientes se ha descubierto la existencia de algunas especies fitófagas dentro de la familia Braconidae, particularmente de las subfamilias Braconinae (Flores *et al.*, 2005), Mesostoinae (Austin y Dangerfield, 1998) y Doryctinae (Wanderley *et al.*, 2011) (Figura 6C). Algunas de estas especies se ha observado que son inductoras de agallas, aunque existen otras que son inquilinas y se alimentan del tejido de las agallas inducidas por cinípidos o cecidómidos (Wharton y Hanson, 2005). Sin embargo esta familia incluye fundamentalmente especies parasitoides de larvas de varios órdenes de insectos (Shaw, 2006).



Figura 6. Diferentes familias de Hymenoptera parasitoides o inductoras de agallas. (A) Eurytomidae. Fotografía de C. Eiseman, 2012; (B) Pteromalidae. Fotografía de A. Burguers, 2014; (C) Braconidae. Fotografía de A. Zaldivar- Riverón, 2013

En Hymenoptera, existen dos estrategias contrastantes de parasitoidismo con respecto a los diferentes estadios de los dípteros agalleros de la familia Cecidomyiidae. Las especies de las familias Platygasteridae, Eupelmidae y Eurytomidae atacan huevos y primeros instares de insectos agalleros (Yukawa y Rohfritsch, 2005). Estos parasitoides, cuyo tiempo de vida es relativamente corto y gastan mucha energía en producir más prole, son usualmente monófagos y endoparasitoides que sincronizan sus historias de vida con la de sus hospederos. En contraste, las especies de las familias Torymidae y Braconidae que atacan estadios tardíos y pupas de dípteros agalleros, son usualmente univoltinas, polífagos (*i.e.* parasitan un amplio rango de especies hospederas) y ectoparasitoides. El ciclo de vida en estas especies es un poco más largo y pasan la mayor parte de su tiempo buscando un hospedero (larva o pupa) adecuado (Yukawa y Rohfritsch, 2005).

1.4 Mecanismo de inducción de agallas

El mecanismo de formación de agallas causadas por insectos ha sido poco estudiado (Inbar *et al.*, 2004). Sin embargo, se sabe que existe una relación directamente proporcional entre la complejidad estructural de la agalla, la diversidad del taxón inductor y la complejidad de la comunidad asociada de insectos (Nieves-Aldrey, 1998; Hrcek *et al.*, 2011).

En Diptera, la larva del cecidómido en sus primeros estadios ataca las células epidérmicas de las hojas de las plantas y se encierra en una masa de tejidos de crecimiento cerca al lugar donde fueron puestos los huevos antes de penetrar en el tejido de la hoja

(Rohfritsch, 1992). Las larvas modifican los tejidos vegetales con las mandíbulas y la saliva y algunas larvas de insectos agalleros martillan las células epidérmicas sin dañar la pared celular para alimentarse de la periferia del área atacada, donde la agalla comienza a crecer (Raman, 1994). El comportamiento de alimentación de la larva durante el desarrollo de la agalla estimula el crecimiento celular (Ollerstam *et al.*, 2002).

Por otro lado, el proceso de formación de la agalla en los himenópteros difiere entre los diferentes grupos ya que, por ejemplo, muchos organismos gallícolas necesitan la presencia de tejidos meristemáticos para inducir la formación de agallas (Raman y Withers, 2003). Sin embargo, al igual que los dípteros, las avispas formadoras de agallas suelen ser muy específicas con respecto a su hospedero y por lo general cada especie induce la formación de agallas en un lugar determinado de la planta (Hanson y Gault, 2006). La estructura de la agalla también varía de una especie a otra aunque prácticamente en todos los casos el insecto “obliga” a la planta a canalizar proteínas y nutrientes hacia las capas de tejido que se encuentran rodeando la larva (Rohfritsch, 1992).

1.5 Técnicas moleculares para el estudio de interacciones tróficas

El conocimiento que se tiene sobre la relación planta-animal, y específicamente las asociaciones tróficas hospedero-parasitoide, permiten suponer que en los lugares en donde existe una mayor diversidad de especies existe también una cantidad mayor de interacciones (Bascompte, 2007). No obstante, a la fecha se conoce muy poco sobre las relaciones hospedero-parasitoide y, en general, sobre las interacciones que se establecen entre insectos. Esto se debe principalmente a que es muy difícil conocer con certeza todas las especies presentes en el sistema estudiado, así como al conocimiento limitado sobre la taxonomía de muchos de los grupos de insectos involucrados, lo que conlleva en muchas ocasiones a identificaciones incorrectas (Cagnolo y Valladares, 2011; Rougerie *et al.*, 2011).

Una alternativa prometedora para el estudio de las asociaciones entre insectos es el uso de técnicas moleculares, las cuales permiten obtener secuencias de ADN tanto de tejido

animal como vegetal. Utilizando herramientas moleculares es posible conocer que especies se alimentan de materia vegetal y cuales son ingeridas por parasitoides, confirmándose así sus relaciones tróficas (Zhou *et al.*, 2012). El uso de secuencias de ADN también es utilizado para investigar la diversidad de especies de grupos de insectos con morfologías conservadas (Monaghan *et al.*, 2009; Hreck *et al.*, 2011; Ceccarelli *et al.*, 2012), y permite la identificación de insectos en diferentes estadios de su ciclo de vida, ya que las claves taxonómicas generalmente solo sirven para identificar estadios determinados o solo un género (hembra o macho), por lo que muchos individuos no pueden ser identificados (Hebert *et al.*, 2003).

En años recientes se han desarrollado técnicas que permiten la obtención de secuencias de ADN de tejido vegetal y animal a partir de contenidos estomacales de insectos (Jurado-Rivera *et al.*, 2009; Rougerie *et al.*, 2011; Wirta *et al.*, 2014). A partir del análisis de secuencias de ADN de los contenidos estomacales de insectos adultos, específicamente avispas, Rougerie *et al.* (2011) identificaron de que se alimentaban especies de avispas parasitoides en sus estadios larvales. En otro estudio, realizado con coleópteros de la subfamilia Chrysomelinae, Jurado-Rivera *et al.* (2009) identificaron las especies de plantas hospederas a partir de extracciones de ADN del tracto digestivo de estos insectos. La similitud entre las secuencias y los resultados de análisis filogenéticos permitieron lograr una identificación precisa de cada hospedero a nivel de tribu, género o especie de acuerdo a la información disponible de cada uno de los linajes en las bases de datos de secuencias de referencia. Así, la complementariedad entre análisis morfológicos y nuevos análisis moleculares permite considerar diferentes aspectos de las redes tróficas, descubrir interacciones de especies crípticas y en general, documentar más interacciones que las que se detectan al utilizar metodologías tradicionales, identificar correctamente las plantas hospederas y establecer una auténtica asociación trófica (Jurado-Rivera *et al.*, 2009; Wirta *et al.*, 2014).

A la fecha, los pocos trabajos que han hecho uso de técnicas moleculares para investigar asociaciones de himenópteros presentes en agallas se han enfocado al grupo gallícola más diverso, la familia Cynipidae. Kaartinen *et al.* (2010) trabajaron con cinípidos inductores de agallas del roble común, sistema en el que existen un gran número de

especies de insectos agalleros sin identificar y en el que se encontraron incongruencias en la delimitación de especies al utilizar caracteres morfológicos o moleculares. A través del uso de las herramientas moleculares, los autores lograron identificar especies, incluso especies crípticas, a través de umbrales de divergencia genética. A partir de sus identificaciones, construyeron redes tróficas que les permitieron entender el rol de cada una de las especies en las interacciones en las que estaban involucradas. De esta manera, la inclusión de técnicas moleculares aumenta la precisión de casi cualquier estudio respecto a la estructura de una comunidad de insectos (Kaarinen *et al.*, 2010).

1.6 Código de barras de ADN

Los sistemas de identificación microgenómica, ampliamente conocidos como “Códigos de barras del ADN”, permiten la discriminación de especies a través del análisis de un pequeño segmento del genoma. En el caso de los animales, se ha seleccionado para tal fin un fragmento de un gen mitocondrial que, debido a su falta de intrones, a su baja recombinación, alta tasa de sustitución nucleotídica y a su herencia haploide tiene ventajas sobre los genes nucleares (Saccone *et al.*, 1999; Hebert *et al.*, 2003). Además, el genoma mitocondrial es más abundante en la célula, por lo que es fácil de recuperar, sobre todo cuando existen muestras de tejido animal pequeñas o degradadas (Stoeckle y Hebert, 2008; Hebert *et al.*, 2004).

En particular, un fragmento de 658 pares de bases del gen mitocondrial citocromo oxidasa I (COI), ha sido adoptado como el marcador estandar para la identificación de la mayoría de los grupos animales (Hebert *et al.*, 2003). Este marcador genético cuenta con primers universales robustos, lo que permite su recuperación en la mayoría de los grupos de animales. Tiene además un alta tasa de sustitución nucleotídica en comparación con otros genes mitocondriales como el 12S o 16S y su tasa de evolución es lo suficientemente rápida para permitir no solo la diferenciación de especies estrechamente relacionadas, sino también, en muchos casos, la diferenciación de poblaciones filogeográficas dentro de una sola especie (Cox y Hebert, 2001; Wares y Cunningham, 2001). La asignación de diferentes OTUs (Unidades Taxonómicas Operacionales, por sus siglas en inglés) a una especie por el

gen COI en animales, dependerá del porcentaje de similitud en las distancias génicas de las secuencias analizadas, de manera que si dicho porcentaje es menor a 2%, pertenecen a una misma especie (Hebert *et al.*, 2003). El código de barras de ADN ha demostrado ser una herramienta rápida y generalmente eficaz para identificar muchas especies, detectar especies crípticas, asociar diferentes estadios del ciclo de vida o para asociar sexos de la misma especie (Miller *et al.*, 2005; Ward *et al.*, 2005; Sheffield *et al.*, 2009; Pauls *et al.*, 2010).

Aunque COI puede ser combinado con otros genes mitocondriales para resolver casos de reciente divergencia, este gen es más adecuado que, por ejemplo, el *citocromo b*, para construir relaciones filogenéticas (Simmons y Weller, 2001) debido a que los cambios en su secuencia de aminoácidos suceden más pausadamente (Lynch y Jarrell, 1993). Por consiguiente, al examinar la composición de aminoácidos es posible asignar, soportado en bases de datos existentes, cualquier organismo sin identificación a una categoría taxonómica mayor (p. ej. phylum, clase, orden) antes de examinar cuidadosamente las sustituciones de nucleótidos para la identificación a especie (Hebert *et al.*, 2003; Hebert *et al.*, 2004).

1.7 Métodos de delimitación de especies

Se han propuesto varias aproximaciones para la delimitación de especies con base en secuencias de ADN y un criterio muy empleado es mediante el uso de umbrales de divergencia genética. El criterio de divergencia del 2% tiene como premisa principal que la variación intraespecífica siempre será menor a la interespecífica para un marcador genético en particular (Hebert *et al.*, 2003). No obstante, este criterio ha sido criticado debido a la arbitrariedad en la suposición de una misma tasa de evolución para dicho marcador en diferentes grupos de organismos, además de que el uso de distancias genéticas no es apropiado en especies de reciente divergencia (Drummond *et al.*, 2006; Burns *et al.*, 2008).

En años recientes se han desarrollado métodos más rigurosos que toman en cuenta los procesos que han dado lugar a la especiación, tales como aislamiento reproductivo o

selección por divergencia (Barraclough, 2010). Dentro de estos métodos se encuentran los métodos de coalescencia para la delimitación de especies, los cuales pueden detectar linajes que son evolutivamente diferentes en escalas de tiempo recientes (Maddison y Knowles, 2006).

Los métodos de coalescencia pueden desempeñar un papel importante al momento de estabilizar la taxonomía de los grupos de especies, debido a que tienen el potencial de reducir los sesgos establecidos por los investigadores al momento de definir las especies (Fujita *et al.*, 2012). Esta delimitación proporciona un marco diferente para identificar especies crípticas y/o alopátricas por medio de datos genéticos para inferir dinámicas de divergencia, la interacción de los procesos evolutivos y las relaciones entre taxones (McCormack *et al.*, 2009). Sin embargo, la aplicación del método resulta limitante cuando no se cuenta con un número abundante de individuos de las especies, lo que influye en la selección del número de loci a trabajar, ya que al utilizar pocos ejemplares se puede perder información en grupos que sean de reciente especiación (Fujita *et al.*, 2012).

El modelo general mixto de coalescencia de Yule (Pons *et al.*, 2006; GMYC por sus siglas en inglés) es un método que ha sido empleado recientemente para la delimitación de especies usando un solo locus. Este método de coalescencia busca identificar linajes que han evolucionado de manera independiente a partir de patrones de ramificación en un árbol filogenético ultramétrico (*i.e.*, un árbol con longitudes de rama escaladas en tiempo absoluto o relativo), desde el punto más probable de transición de la coalescencia a la especiación (Pons *et al.*, 2006; Monaghan *et al.*, 2009; Fujisawa y Barraclough, 2013; Talavera *et al.*, 2013). En otras palabras, GMYC estima los límites entre especies a partir de secuencias de ADN identificando en un árbol filogenético los patrones de las ramas como una transición entre fenómenos de coalescencia y de especiación en linajes que han evolucionado independientemente buscando mayores valores de verosimilitud en cada transición (Fernández-García, 2012). Sin embargo, la utilización de éste método en taxonomía requiere la aplicación de pruebas de congruencia con loci genéticos adicionales y que la especie esté reconocida taxonómicamente (Monaghan *et al.*, 2009).

Por las características enumeradas anteriormente, el empleo del criterio de divergencia del 2% y la utilización del modelo general mixto de coalescencia resultan

métodos adecuados al momento de discriminar especies y las relaciones entre taxones a partir de la generación de secuencias de ADN ya que estos métodos reducen sesgos generados por identificaciones taxonómicas incorrectas y proporcionan información relevante respecto a la variación intra- e interespecífica.

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

El presente estudio investiga la riqueza de especies de la entomofauna asociada a las agallas de *Coccoloba barbadensis* Jacquin (Polygonaceae) en una zona de bosque tropical caducifolio de la región de Chamela, Jalisco, a partir de identificaciones basadas tanto en morfología como en secuencias de ADN del código de barras estándar para animales (COI). Este estudio pretende conocer de una manera más rápida y precisa el número de especies de insectos presentes en el sistema de estudio, lo cual facilitará conocer las posibles asociaciones tróficas existentes entre las especies identificadas. También se investiga la morfología y fenología de las agallas examinadas, lo cual ayudará a conocer la manera en que interactúan las diferentes especies de insectos encontrados y la temporalidad de dichas interacciones. A la fecha no se han realizado estudios sobre la riqueza de especies de insectos asociados a agallas que consideren especies pertenecientes a la familia Polygonaceae.

OBJETIVOS

1.8 Objetivo general

- Identificar las especies de insectos asociados a agallas de *Coccoloba barbadensis* (Polygonaceae) e investigar sus interacciones tróficas.

1.9 Objetivos particulares

- Caracterizar la morfología y fenología de los diferentes tipos de agallas presentes en hojas de *C. barbadensis*, así como la fenología de la entomofauna asociada.
- Identificar las especies de insectos presentes en los tipos de agallas encontrados con base en información de morfología externa y molecular (secuencias del código de barras del ADN).
- Inferir asociaciones tróficas entre las especies de insectos identificadas con base en la información disponible en la literatura sobre la historia natural de cada grupo taxonómico.

MÉTODOS

1.10 Área de estudio

La Estación de Biología Chamela (EBCH) del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México, está ubicada dentro de la Reserva de la Biosfera de Chamela-Cuixmala en el estado de Jalisco, sobre la costa del Pacífico mexicano y se encuentra en la zona intertropical del hemisferio norte entre los 19°29' de latitud norte y los 105°01' de longitud oeste (Noguera *et al.*, 2002).

La región de Chamela presenta una marcada estacionalidad, con dos temporadas climáticas bien definidas: una estación seca que va de noviembre a mayo y una temporada de lluvias de junio a octubre (Noguera *et al.*, 2002; Fernández-Florez *et al.*, 2013). La vegetación dentro de la Estación está compuesta en su mayoría por bosque tropical caducifolio (BTC) también conocido como selva baja caducifolia, el cual domina el paisaje e influye en los procesos biológicos y bioquímicos del ecosistema. El BTC cubre el 60% del área ocupada por bosques tropicales en México (Trejo y Dirzo, 2000), y se caracteriza porque la vegetación pierde sus hojas durante un periodo de cinco a ocho meses del año, presenta generalmente sólo un estrato arbóreo y sus árboles tienen una altura de 8 a 12 m., ramificándose a baja altura. El clima de las regiones donde ocurre es cálido y semiárido a subhúmedo. La temperatura promedio es de 22 a 26°C y la precipitación total anual varía de 400 a 1300 mm, distribuyéndose en un periodo de cuatro a seis meses, lo que determina su marcada estacionalidad. Además del bosque tropical caducifolio, la reserva incluye pequeñas áreas de selva mediana subperennifolia, manglar, vegetación acuática de lagunas y esteros, vegetación riparia, dunas costeras y matorral xerófilo (Noguera *et al.*, 2002).

1.11 Especie hospedera de estudio

La familia Polygonaceae cuenta con aproximadamente 40 a 50 géneros representados en 1100 especies (Frye y Kron, 2003). Presenta una distribución cosmopolita pero es particularmente diversa en las regiones de clima templado del hemisferio norte y cuenta

con algunas especies representantes en los trópicos y subtropicos, aunque es poco frecuente en el bosque tropical subcaducifolio (Castillejos-Cruz y Solano, 2008; Olson, 2013). Es una familia de importancia económica debido a que algunas de sus especies son maderables y otras son utilizadas en la horticultura. En algunas regiones, las plantas de esta familia tienen usos medicinales (Anjen *et al.*, 2003; Morris, 2009).

Los árboles del género *Coccoloba* P. Browne (Polygonaceae) son propios de las regiones tropicales y subtropicales de América. Se encuentran desde las Islas Bermudas y Florida, en Norteamérica, a través de México y Centroamérica hasta Suramérica, con varias especies en la cuenca amazónica y pocas especies más hacia el sur, con su límite meridional en Argentina (Howard, 1949). El género incluye 120 a 150 especies, de las cuales unas 17 habitan en México. Son plantas que pueden alcanzar los 18 m de alto, perennifolias, con hojas de tamaño y forma variable e inflorescencias en forma de racimos terminales (Howard, 1949; Castillejos y Solano, 2008).

Coccoloba barbadensis Jacq. se distribuye a lo largo de ambas vertientes de México y hacia el sur hasta El Salvador y también en las Antillas. Es un árbol perennifolio de copa redonda y gruesa que puede alcanzar los 12 m de altura, cuyo tronco es recto y del cual nacen muchas ramas colgantes (Castillejos-Cruz y Solano, 2008). Las láminas foliares están dispuestas en espiral, son coriáceas y glabras en ambas superficies, de tamaño o forma variable y miden de 10 a 30 cm de largo y 3.5 a 17 cm de ancho. Las inflorescencias son racimos terminales de hasta 30 cm de largo; las flores masculinas son color crema, mientras que las flores femeninas son verdes o pardas y el fruto de la planta es ovoide con una sola semilla. Florece de enero a agosto y fructifica de junio a noviembre (Castillejos-Cruz y Solano, 2008).

1.12 Muestreo de agallas e insectos asociados

Las agallas de *C. barbadensis* fueron muestreadas en 15 árboles ubicados en cuatro senderos (Arroyo, Búho, Calandría y Eje Central) dentro de la Estación de Biología de Chamela (EBCH). Estos senderos están ubicados hacia la parte más húmeda y se

encuentran cerca o sobre los arroyos que cruzan la estación en la época de lluvias. El sendero de Eje Central es el más lejano de estas condiciones ambientales y es el camino principal dentro de la estación, por lo que es frecuente el tránsito de personas, animales y vehículos.



Figura 7. Ubicación de los árboles de *Coccoloba barbadensis* trabajados en los senderos de la Estación de Biología Chamela (ECBH) México-Jalisco, 2013. Esquema realizado por I.A. Rodríguez-Cifuentes

En total se hicieron dos viajes a la Estación en diferentes temporadas del año. La primera fase de campo se llevó a cabo a partir de la última semana de marzo hasta mediados de junio de 2013 (temporada de secas). Observaciones realizadas con anterioridad permitieron identificar durante este periodo la presencia de agallas en la planta de estudio, así como la emergencia de dípteros cecidómidos y de himenópteros parasitoides (Zaldívar-Riverón, com. pers.).

Durante la primera semana de muestreo se ubicaron, identificaron y marcaron 15 árboles de *C. barbadensis* (Figura 7). Para cada árbol se evaluó el estado general de las hojas (*i.e.* coloración, tamaño, si estaban frescas, muertas, deterioradas, infestadas de agallas) y se realizó el registro fotográfico *in situ* de las agallas para su posterior análisis y clasificación. Se recolectaron de diferentes partes del árbol un número variable de hojas de

los diferentes árboles marcados de acuerdo con la metodología propuesta por Santos de Araújo *et al.* (2011) con el fin de evaluar características generales de las agallas tales como forma, tamaño, color, pubescencia, entre otras, para determinar el número de morfotipos de agallas presentes.

Los niveles de infestación, la presencia y estado de las agallas, así como la identificación de insectos presentes en las agallas se evaluó revisando las plantas cada semana (Medianero *et al.*, 2010). Una vez cada semana se recolectaron de una a cinco hojas por árbol debido a que los árboles presentan una cantidad variable de hojas y a que a través del tiempo de muestreo, los árboles fueron perdiendo sus hojas como consecuencia de la estacionalidad de la zona de estudio. En cada hoja recolectada se contó el número de agallas total y por morfotipo, se disectaron todas las agallas presentes, estuvieran secas o no con el fin de recolectar los insectos presentes en las agallas y se tomaron medidas de longitud de las hojas recolectadas.

La segunda etapa de campo se realizó durante la primera semana de noviembre de 2013 (temporada de lluvias) para revisar el estado de las hojas, observar la posible presencia de agallas y en su caso recolectar insectos.

Todos los insectos obtenidos en las dos etapas del muestreo fueron sacrificados, codificados y separados de acuerdo al árbol individual del que provenían, la morfología externa de la agalla, el número de hoja, así como por su estado de desarrollo (larva o adulto) (Medianero *et al.*, 2010). Todos los insectos recolectados fueron preservados en alcohol absoluto y conservados a una temperatura de -20 °C.

1.13 Identificación morfológica de los insectos

Los ejemplares recolectados fueron organizados de acuerdo con sus características morfológicas; los insectos adultos, larvas y pupas en los últimos estadios identificados a nivel de orden. Subsecuentemente, para los ejemplares adultos, los dípteros fueron identificados a nivel de familia y los himenópteros tanto a nivel de familia como de subfamilia, con la ayuda de las claves taxonómicas de Goulet y Huber (1993), Hanson y

Gault (2006) y Fernández y Sharkey (2006). En algunos casos se logró identificar ejemplares adultos hasta nivel de género empleando la literatura especializada para cada grupo. Todos los ejemplares fueron después separados en morfoespecies, contados y fotografiados bajo un estereomicroscopio Zeiss.

1.14 Obtención de secuencias de ADN de los insectos

Para cada morfotipo de agalla se escogieron de uno a cinco individuos, de acuerdo a la cantidad de ejemplares recolectados, de cada morfoespecie (larvas, pupas y adultos), para la obtención de secuencias de ADN del locus del código de barras animal (658 pares de bases del gen mitocondrial COI). Las extracciones de ADN se realizaron con el kit “Tissue and tissue plus SV mini” (Gene All®) empleando una técnica no destructiva, en donde el individuo completo se incubó en 20 µl de proteinasa K y 200 µl de Buffer TL durante 8 horas a 56 °C con el fin de lisar sus tejidos blandos. Durante la extracción, las larvas fueron degradadas completamente, mientras que los exoesqueletos de las pupas y los individuos adultos se lavaron con agua destilada, se colocaron de nuevo en alcohol absoluto y se mantuvieron a una temperatura de -20 °C para luego montarlos en seco.

La amplificación de COI se realizó con los primers LCO 1490 (5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3') y HCO 2198 (5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3') (Folmer *et al.*, 1994) bajo las siguientes condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés): desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 40 s, hibridación de oligonucleótidos (primers) a 45 °C por 40 s, extensión a 72 °C por 40 s, y una extensión final a 72 °C por 7 min. Las muestras para la PCR fueron preparadas en un volumen final de 15 µl de mezcla de reacción, que incluyó 1.5 µl de tampón 10X, 0.75 µl de MgCl₂ (50 mM), 0.3 µl de dNTPs (10 mM), 0.24 µl de cada primer (10 µM), 0.12 µl de polimerasa Taq Platinum (Invitrogen®), 8.85 µl de agua y 3µl del extracto de ADN. Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% teñido con GelRed y fueron enviados sin purificar, junto con el primer LCO, a la “High-Throughput Genomics

Unit” de la Universidad de Washington, Seattle, EEUU ([http:// www.htseq.org/](http://www.htseq.org/)) para ser secuenciados

Todas las secuencias se editaron manualmente en un editor de texto tomando en cuenta su traducción a aminoácidos y se compararon de manera individual con las secuencias disponibles en GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), utilizando el programa en línea BLAST (Altschup *et al.*, 1990; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) utilizando la opción “nucleotide blast” en la cual se realiza, a través del algoritmo “blastn”, una búsqueda de coincidencias entre los nucleótidos de las secuencias de tamaño corto trabajadas y los nucleótidos de la base de datos del programa, para excluir una posibles contaminaciones o secuenciación de pseudogenes, así como para corroborar la identificación taxonómica a nivel de familia del individuo correspondiente.

1.15 Delimitación de especies de insectos con base en secuencias de ADN

La delimitación de especies con base en secuencias de ADN se realizó por medio de dos aproximaciones diferentes. Primero se empleó el modelo General Mixto de Coalescencia de Yule (GMYC) (Pons *et al.*, 2006; Fontaneto *et al.*, 2007), el cual considera patrones de ramificación que discriminan especies desde el punto más probable de transición de la coalescencia a especiación en un árbol ultramétrico. Este modelo ha sido recientemente empleado con éxito para delimitar especies en grupos de los que se tiene poco conocimiento taxonómico de los taxones involucrados como es el caso de los insectos (Monaghan *et al.*, 2009; Ceccarelli *et al.*, 2012).

La delimitación de especies con este modelo se obtuvo generando un árbol ultramétrico con longitudes de rama escaladas con BEAST versión 1.7.4 (Drummond *et al.*, 2012), utilizando la hipótesis del reloj molecular relajado, el principio de coalescencia como opción más conservadora y el modelo de evolución GTR + Γ + I, debido a que se asume un supuesto de homogeneidad en las tasas de sustitución a lo largo del tiempo y entre linajes (Monaghan *et al.*, 2009). Para el análisis se eliminaron de la matriz los haplotipos duplicados utilizando el programa Collapse 1.2 (Posada, 2004). El análisis se corrió por 10

millones de generaciones. Los primeros 5,000 árboles fueron eliminados como “*burn-in*” y los árboles restantes fueron utilizados para reconstruir un árbol de clados de máxima credibilidad colapsando los clados con una probabilidad posterior menor a 0.5 con el programa TreeAnnotator versión 1.7.4 (parte del paquete de BEAST 1.7.4). El cronograma así generado se utilizó para delimitar especies utilizando el modelo GMYC implementado en el paquete de SPLITS, el cual contiene herramientas que permiten la delimitación de especies y la asignación de categorías taxonómicas en muchos niveles de organización biológica a partir de información del ADN (Código de Barras de la Vida) o de morfometría, entre otras opciones (disponible en <http://r-forge.r-project.org/projects/splits/>) con el programa R version 2.10.1 (R core Development Team 2009).

El segundo método empleado fue el criterio de distancias corregidas $\geq 2\%$, generalmente empleado como umbral para considerar dos o grupos de secuencias como especies diferentes en animales (Hebert *et al.*, 2003). Las distancias entre las secuencias se corrigieron con el modelo de dos parámetros de Kimura o K2P (Kimura, 1980) y se calcularon mediante el método de “Neighbor Joining” (NJ) empleando el programa PAUP versión 4.0 (Swofford, 2002). Este análisis es utilizado para la determinación de unidades taxonómicas operativas moleculares o MOTUs (Jones *et al.*, 2011) y ha probado ser rápido y confiable para la identificación de especies en la mayoría de grupos de animales (Hebert *et al.*, 2003).

Los árboles resultantes de los dos métodos de delimitación de especies fueron editados en FigTree version 1.4.2 (Bouckaert *et al.*, 2014). Las delimitaciones realizadas con base en secuencias de ADN empleando los dos métodos arriba mencionados fueron comparadas con el número de morfoespecies discriminadas morfológicamente y se tuvieron en cuenta ejemplares de insectos obtenidos tanto en el muestreo realizado durante la época de secas (marzo-junio) como en la de lluvias (primera semana de noviembre).

1.16 Identificación taxonómica de insectos con base en secuencias de ADN

Con el fin de obtener una identificación taxonómica de los ejemplares a partir de las secuencias de ADN generadas, éstas fueron filtradas y agrupadas en MOTUs de acuerdo a un 98% de similitud utilizando el programa QIIME 1.7.0 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology; www.qiime.org) (Gibbons *et al.*, 2015). El script generado en formato FASTA fue después comparado con el banco de secuencias de COI depositadas en GenBank con BLAST bajo la opción “nucleotide blast” y el algoritmo “blastn”. Las 100 secuencias con mayor similitud obtenidas en BLAST para cada MOTU fueron almacenadas en un archivo, el cual posteriormente se analizó con el programa MEGAN versión 5 (Huson *et al.*, 2011). Este programa permite comparar las secuencias generadas con las obtenidas en GenBank, las cuales generalmente tienen una identificación taxonómica, para después seleccionar hasta qué nivel taxonómico puede ser identificado de manera confiable cada MOTU por este medio. Para este análisis se utilizaron dos valores del parámetro ‘Top Percent’, uno de 5% y otro de 2%. Estos dos porcentajes se emplearon para establecer un límite del máximo porcentaje por el cual el valor de un ‘hit’ (valor de una secuencia determinada seleccionada por BLAST) puede caer por debajo del mejor valor obtenido en una corrida. Cualquier ‘hit’ que cae por debajo de este límite es descartado (Huson y Mitra, 2012).

Luego de delimitar las morfoespecies e identificarlas con el procedimiento mencionado anteriormente hasta el nivel taxonómico de familia, subfamilia o género, según el caso, se consultó la información biológica disponible para taxón con el fin de inferir las posibles interacciones presentes en el sistema.

1.17 Análisis estadísticos

Se calcularon los porcentajes del número de agallas contadas y disectadas en total por tipo de agalla presentes en las hojas a lo largo de los periodos de trabajo de campo. Se realizó una regresión lineal simple utilizando el programa estadístico R (R Core Team,

2013) para evaluar las relaciones: promedio de agallas totales vs tiempo y promedio de agallas por tipos vs tiempo. Una vez delimitadas las especies y cotejadas con la identificación morfológica, se analizó la frecuencia de las familias a lo largo del periodo de muestreo. Con el fin de ver la asociación entre las diferentes especies de insectos con los tipos de agallas encontrados, se realizó un análisis de correspondencias canónicas utilizando el programa Statistica 12 (StatSoft, 2010). Este análisis parte de la construcción de una tabla de contingencia para obtener un diagrama cartesiano que muestra la asociación entre las variables analizadas a través de puntos representados en el espacio. La proximidad entre los puntos representados, está relacionada con el nivel de asociación entre los valores y las variables de la tabla de contingencia (Salvador- Figueras, 2003).

RESULTADOS

1.18 Descripción y abundancia de agallas

Durante el periodo comprendido entre el 25 de marzo y 21 de mayo de 2013 se recolectó un total de 480 hojas, de las cuales se disectaron 11,044 agallas provenientes de 15 árboles muestreados en cuatro senderos seleccionados de la estación. En la visita realizada en la primera semana de noviembre del mismo año, se recolectaron 50 hojas adicionales y se disectaron otras 1127 agallas.

En el periodo de muestreo en la temporada de secas (marzo-mayo de 2013) se observa que existe una relación significativa entre el número promedio de agallas totales colectadas y las semanas de muestreo ($R^2=0,731$; $F=21,796$; $p<0,001$). La presencia de agallas en las hojas aumentó paulatinamente a través de las semanas de muestreo. A lo largo de las cuatro primeras semanas del estudio (25-29 marzo al 8-9 abril), el aumento en el número de agallas presentes en los árboles fue constante. Sin embargo, a partir de la semana cinco (15-16 abril), el número de agallas aumentó considerablemente con respecto a los conteos iniciales (Figura 8). En el análisis estadístico no se incluyeron datos correspondientes al muestreo realizado durante la primera semana de noviembre debido a que corresponden a dos temporadas ambientales diferentes (temporada de secas y temporada de lluvias).

Se identificaron cinco tipos diferentes de agallas asociados a las hojas de *C. barbadensis* (Figura 9):

(a) Morfotipo 1: corresponde a agallas en forma de cápsula tanto en el haz como en el envés de la hoja, de color verde, sin pubescencia y con un solo canal central interno alargado (Figura 9-1).

(b) Morfotipo 2: este morfotipo de agalla es cónico y verde pálido, terminado en punta en la haz, sin pubescencia y con una cámara redonda interna donde se encuentra el individuo (Figura 9-2).

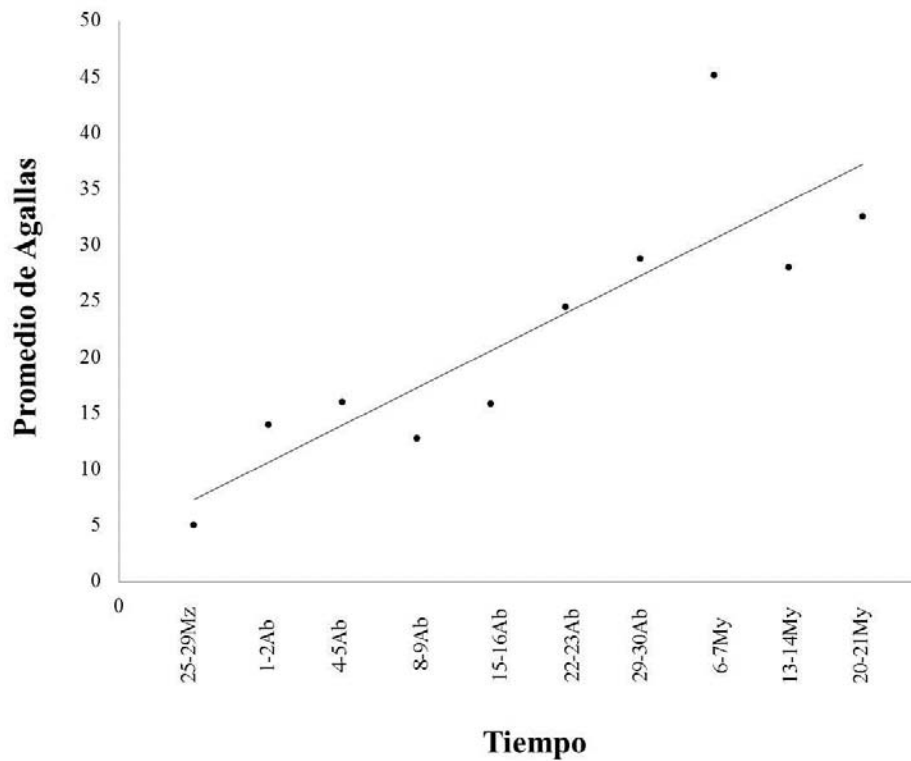


Figura 8. Relación entre el periodo de muestreo por semanas y el número promedio de todas las agallas recolectadas y disectadas. Las 10 semanas de muestreo se nombraron de acuerdo a los dos primeros días de cada semana.

(c) Morfotipo 3: en este morfotipo, las agallas no tienen pubescencia, son aplanadas por ambos lados de la hoja, de color verde-amarillo en la haz y café en el envés de la hoja, y presentan una cámara central horizontalmente alargada (Figura 9-3).

(d) Morfotipo 4: la agalla es esférica, café y solo se observa en el envés de la hoja, estando generalmente distribuidas de manera irregular a lo largo de la misma (Figura 9-4).

e) Morfotipo 5: este morfotipo de agalla es redondo, tiene pubescencia abundante color crema-café y se observa tanto en la haz como en el envés de la hoja. De este morfotipo no se obtuvo registro fotográfico.

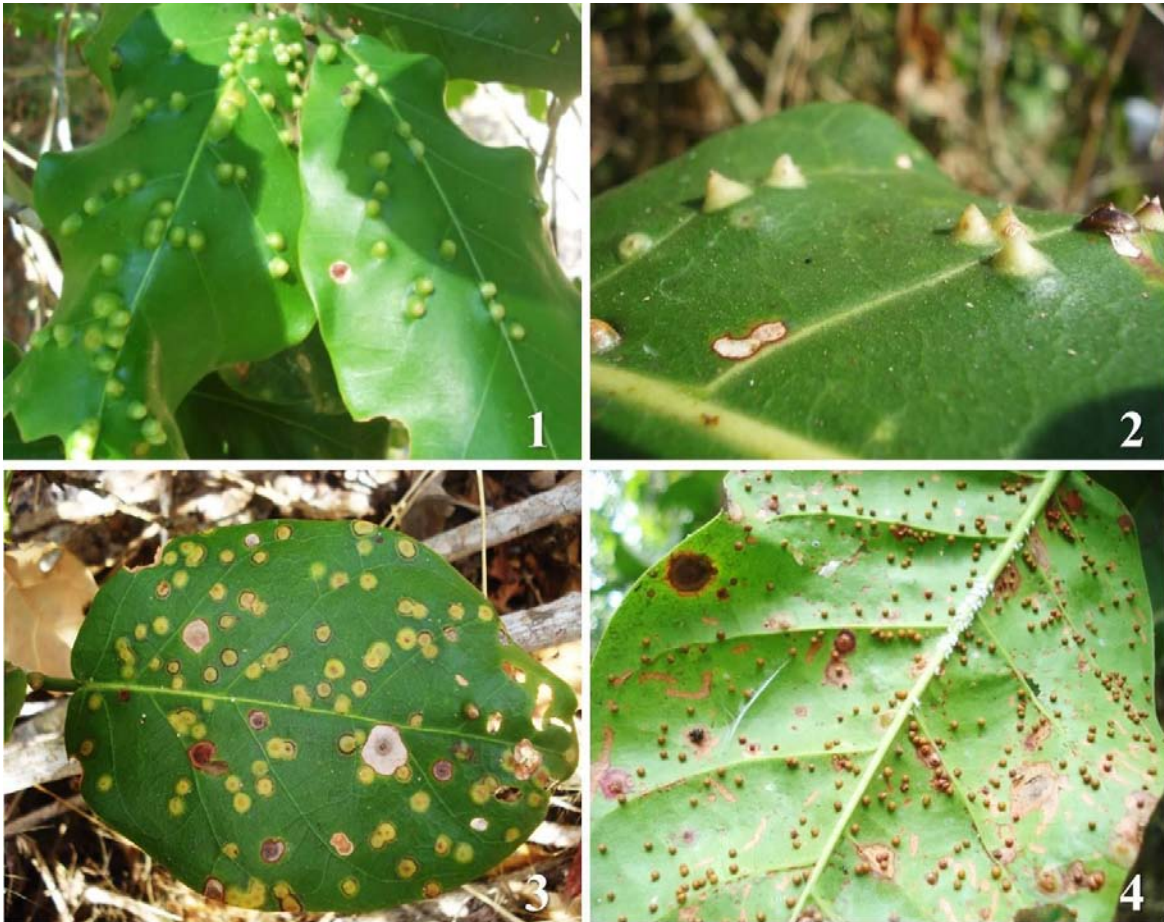


Figura 9. Cuatro de los cinco morfotipos de las agallas presentes en las hojas de *Coccoloba barbadensis* (morfotipos 1-4; véase texto). Estación de Biología Chamela (ECBH) México-Jalisco, 2013. Fotografías de I.A. Rodríguez-Cifuentes

De las agallas disectadas, el 35% correspondió al morfotipo 1 (Figura 10), estando presente en la mayor parte de las hojas del 87% de los árboles examinados. En este morfotipo de agalla se encontraron exuvias de dípteros cecidómidos durante las primeras semanas de muestreo (25 de marzo al 1 de abril). Otro 32% de las agallas recolectadas correspondió al morfotipo 4, el cual se encontró en el 80% de los árboles trabajados. En este tipo de agalla también se observó la presencia de exuvias de cecidómidos adheridas a las paredes externas de la agalla o en las hojas durante la última semana de febrero. El morfotipo 4 de agalla se presentó abundantemente en los árboles que están más cerca o sobre los arroyos. Por su parte, el morfotipo 5, fue observado en tres ocasiones sólo en el 13% de los árboles trabajados. Los morfotipos de agalla 2 y 3 fueron considerablemente menos frecuentes en las hojas (13% y 18.5%), a pesar de que se observaron en el 73% y 80% de los árboles, respectivamente (Figura 10).

En el muestro de noviembre, el único tipo de agalla que no se registró fue el morfotipo 5. Los porcentajes de agallas encontradas fueron diferentes a la primera temporada de campo. El morfotipo 3 se registró en un 30.7% de los registros, seguido del morfotipo 2 con un 26.4% y el morfotipo 4 con un 25.4%. Estas agallas se obtuvieron principalmente de las hojas de los árboles que estuvieron cerca o sobre los arroyos. El morfotipo de agalla tipo 1 fue la que presentó menor porcentaje en las hojas recolectadas, en ésta ocasión con un 17.5%. Este último tipo de agallas se observó principalmente en los árboles de las zonas distantes de los arroyos.

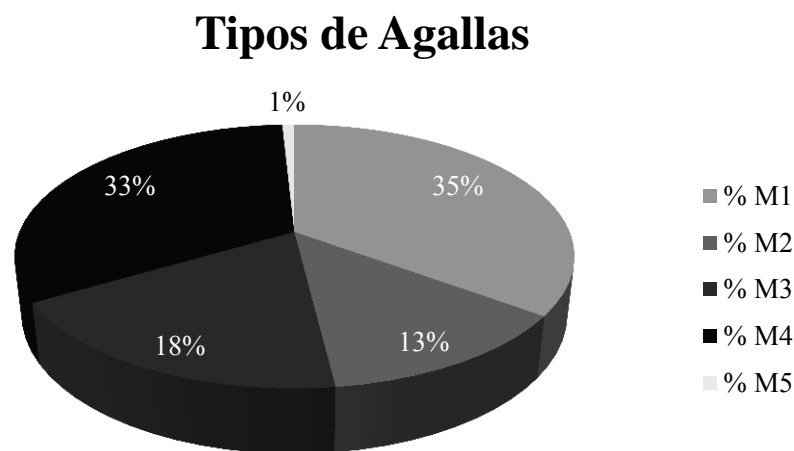


Figura 10. Porcentaje de morfotipos de agallas (M) presentes en las hojas de *Coccoloba barbadensis* durante el muestreo febrero-mayo de 2013

Durante el periodo de secas se observó que el promedio de agallas de cada uno de los morfotipos aumentó y varió a lo largo del tiempo, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre los tipos de agallas registrados ($F_{3,128}=8.616$; $p<0.001$) (Figura 11). En la primera fase de campo, el morfotipo 1 fue aumentando paulatinamente el número de agallas en las hojas y hacia la última semana de abril ya no se registraron. El morfotipo 2 presentó poca abundancia y se mantuvo relativamente constante a lo largo de todo el muestreo, mientras que el morfotipo 3 tuvo una baja frecuencia aunque mostró un aumento en el promedio de agallas hacia la primera semana de mayo. En esta misma semana, el morfotipo 4 mostró un aumento considerable en el promedio de agallas, así como en la transición de la semana 5 a la 6, hacia mediados de abril. Las agallas del morfotipo 5 solo se observaron hacia el final del muestreo, coincidiendo en la semana 6-7 mayo, con en el aumento del número de agallas 3 y 4. Hubo semanas en las que no se

registró ningún tipo agallas en las hojas recolectadas; hay que considerar, sin embargo que las hojas se colectaban al azar y no buscando la presencia o no de agallas.

Éste análisis fue hecho considerando solo los datos obtenidos en el muestreo del primer semestre de 2013 y no se incluyeron los datos de noviembre, debido principalmente a que corresponden a dos temporadas ambientales diferentes (temporada de secas y temporada de lluvias). La información obtenida en noviembre de 2013 se presenta solo de manera informativa, aunque no se analizó estadísticamente debido a que los datos obtenidos no son suficientes para incluirlos en las pruebas estadísticas.

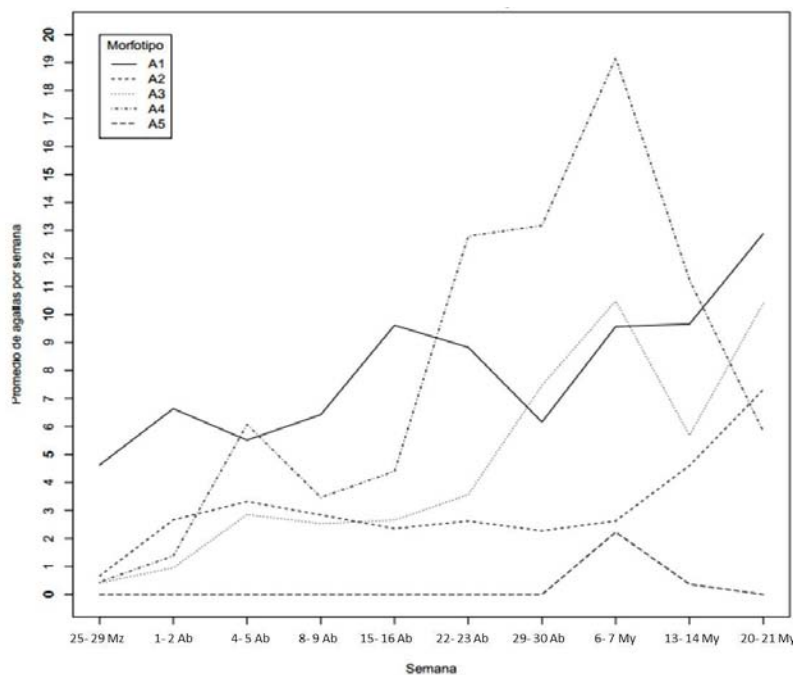


Figura 11. Morfotipos de agallas de las hojas de *Coccoloba barbadensis* con respecto al tiempo de muestreo

1.19 Delimitación de especies de insectos

Se generaron 243 secuencias COI para un total de 36 morfoespecies tanto de larvas y pupas como de adultos identificados de manera preliminar con base en las características de su morfología externa. Para cada una de estas 36 morfoespecies se secuenciaron entre uno y seis ejemplares dependiendo del número de individuos obtenidos por cada morfoespecie tanto en el muestreo de secas como el realizado en noviembre. Las secuencias generadas correspondieron a 123 haplotipos diferentes.

Los análisis de 2% de divergencia genética y de GMYC fueron en su mayoría congruentes entre sí en cuanto al número de especies delimitadas (Tabla 2), encontrándose únicamente tres incongruencias. El análisis del 2% discriminó 35 especies (Figura 12), mientras que el modelo de GMYC delimitó 39 especies (Figura 13). Esta incongruencia se debió a que para la subfamilia Entedoninae (Eulophidae, Hymenoptera) una de las especies determinada por el criterio del 2%, fue dividida en tres especies por el método GMYC. Además, en la subfamilia Eurytominae (Eurytomidae), dos de las especies delimitadas por el análisis del 2% se dividieron en dos especies cada una en el método de GMYC. No se encontraron diferencias de morfología externa entre los ejemplares de las especies delimitadas por GMYC para cada uno de los casos antes mencionados, por lo que podría tratarse de especies crípticas.

Para la familia Cecidomyiidae (Diptera), las especies delimitadas están representadas en su mayoría por secuencias de ADN de larvas, ya que se obtuvieron muy pocos ejemplares adultos de las agallas. Los análisis de las secuencias de los cinco morfotipos adultos de Diptera mostraron que cada uno corresponde a una especie diferente (Figura 12). Respecto a Hymenoptera, para cada familia, se obtuvieron individuos en diferentes estadios de desarrollo, por lo que la mayoría de las especies delimitadas se encuentran soportadas por larvas, pupas y adultos. La única excepción corresponde a la familia Torymidae, de la cual solo se obtuvieron dos individuos en estadio larval. Las tres especies delimitadas del orden Lepidoptera también están representadas únicamente por individuos en estadio larval.

Tabla 2. Lista de ordenes, familias y subfamilias identificadas con el número de especies delimitado por el criterio de distancias corregidas del 2% (CDC) y el modelo general mixto de coalescencia de Yule (GMYC)

ORDEN	FAMILIA	SUBFAMILIA	CDC 2%	GMYC
Diptera	Cecidomyiidae	---	7	7
Lepidoptera	---	---	3	3
	Platygastridae	Telenominae	1	1
		Platygastrinae	5	5
	Braconidae	Doryctinae	1	1
Hymenoptera	Eulophidae	Entedoninae	5	7
		Tetrastichinae	5	5
	Eurytomidae	Eurytominae	7	9
	Torymidae	---	1	1
		Total	35	39

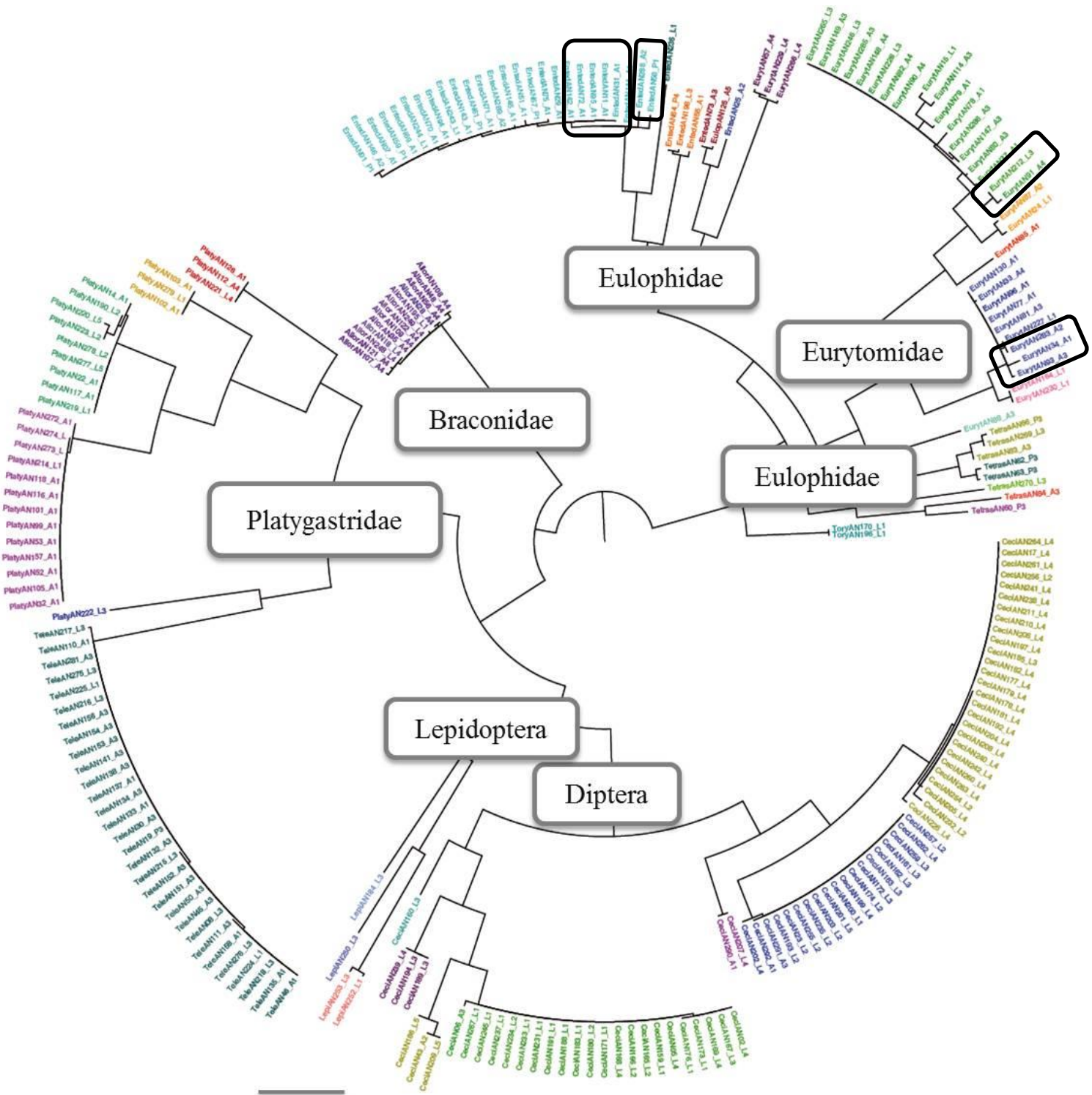


Figura 12. Fenograma obtenido con el método Neighbour-Joining empleando el modelo de evolución de 2 parámetros Kimura. Las morfoespecies de las diferentes familias están resaltadas con distintos colores. En los recuadros negros dentro del mapa están señaladas las morfoespecies incongruentes entre los análisis de delimitación de especies. Al final del nombre de cada morfoespecie se encuentra señalado con un número el tipo de agalla del que fue recolectado (1, 2, 3, 4 y 5) y el estado de desarrollo en que fue recolectado: Individuo adulto o pupa=A; larva=L. Escala 20.0 sust/sitio

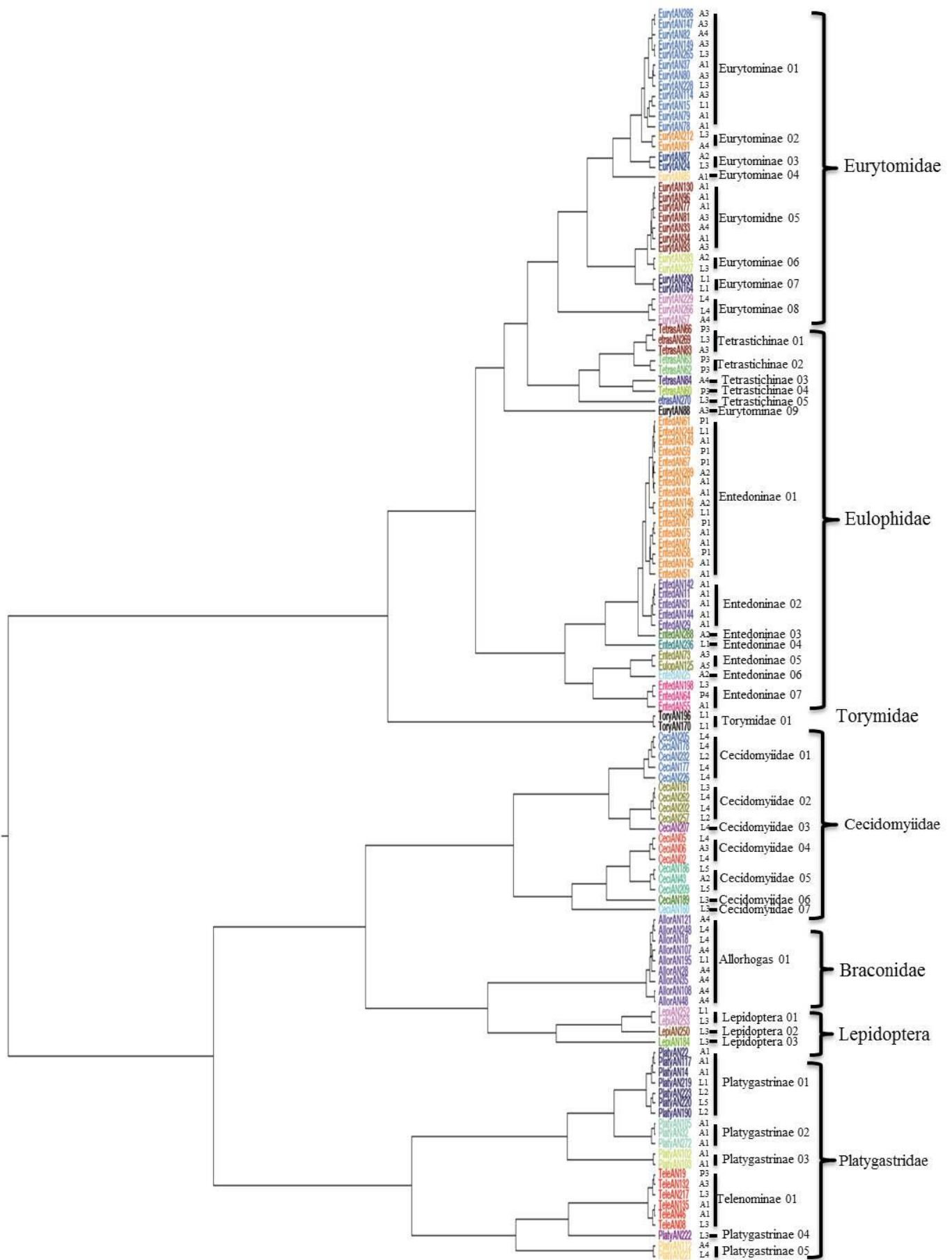


Figura 13. Árbol ultramétrico reconstruido a partir de la delimitación de especies por el modelo general mixto de coalescencia de Yule (GMYC). Las especies delimitadas con este método están diferenciadas por colores. Las letras a la derecha de cada taxón terminal corresponden al tipo de agalla del que fue recolectado (1, 2, 3, 4 y 5) y el estado de desarrollo en que fue recolectado: Individuo adulto o pupa=A; larva=L

1.20 Análisis de secuencias de ADN

El programa QIIME delimitó un total de 41 MOTUs. El análisis de identidad taxonómica se realizó mediante la búsqueda de BLAST y el programa MEGAN utilizando los parámetros de 5% y 2% de ‘Top percent’. En la Figura 14 se muestran los cuatro fenogramas obtenidos con los dos parámetros arriba mencionados, en donde se observan los diferentes tamaños de cada nodo de acuerdo al número de lecturas asignadas en cada caso y se constriñó la búsqueda tanto a nivel de familia como de género.

La figura 14A, que corresponde a la gráfica de 5% de “Top Percent”, arrojó una familia de Diptera (Cecidomyiidae), seis familias de Hymenoptera (Encyrtidae, Eulophidae, Eupelmidae, Eurytomidae, Braconidae y Platygastriidae) y un himenóptero no clasificado. En la figura 14B, que se obtuvo con un “Top Percent” de 2%, se obtuvieron solo cinco familias de Hymenoptera, eliminando la familia Eupelmidae. Con este último parámetro, el número de lecturas para Eulophidae aumentó al disminuir el valor de porcentaje máximo.

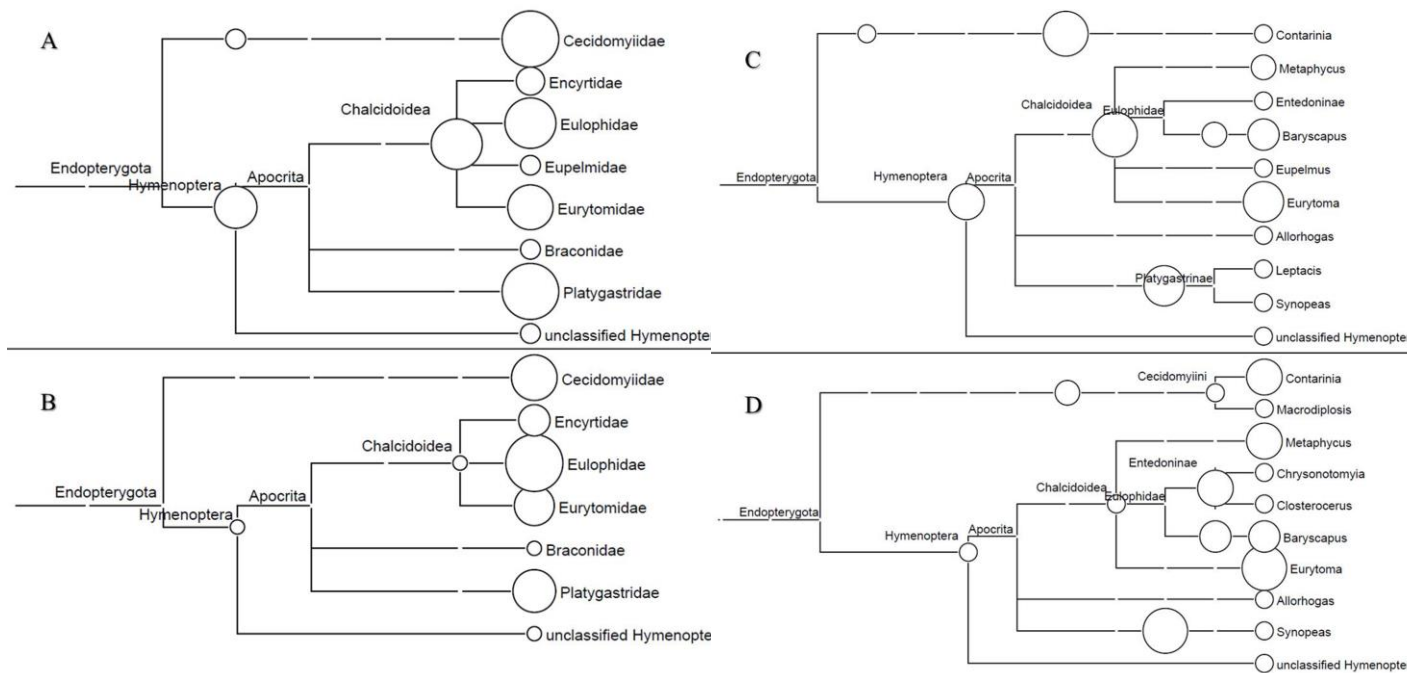


Figura 14. Fenogramas obtenidos en MEGAN indicando la identificación taxonómica de las 41 MOTUS obtenidas en el programa QIIME. La búsqueda empleó dos valores de “Top Percent” (5 y 2%). Las identificaciones taxonómicas se restringieron tanto a nivel de familia, A) 5% y B) 2%, como de género, C) 5% y D) 2%

A nivel de género, el número de lecturas para cada nodo aumenta con respecto a la disminución del valor del “Top Percent”. Para Diptera, un valor de 5% (Figura 14C) no asigna muchas lecturas a este nodo y muestra únicamente el género *Contarinia* Rondani, 1960 (Cecidomyiidae), mientras que el 2%, especifica la tribu a la que pertenecen (Cecidomyiini), asigna un mayor número de lecturas a los nodos correspondientes y muestra la existencia de dos géneros: *Contarinia* y *Macrodiplosis* Kieffer, 1895 (Figura 14D). En Hymenoptera, los valores del 5% asignan ocho géneros y los del 2% solo siete: *Metaphycus* Mercet, 1917 (Encyrtidae) se mantiene igual en los dos casos. En Eulophidae, *Baryscopus* Foerster, 1856 está presente en las dos aproximaciones, mientras que el otro género asignado por el valor del 5%, se divide en *Chrysonotomyia* Ashmead, 1904 y *Closterocerus* Westwood, 1833 en la representación del 2%. Los tres géneros corresponden a la subfamilia Entedoninae y esta última aproximación taxonómica coincide con las observaciones morfológicas que se realizaron de estos individuos.

El género *Eupelmus* Dalman, 1820 (Eupelmidae) solo se obtiene en el análisis del 5% de “Top Percent”. Con los dos porcentajes se obtienen los géneros *Eurytoma* Illiger, 1807 (Eurytomidae) y *Allorhogas* Gahan, 1912 (Docryctinae-Braconidae) con una especie cada uno. Estos géneros también coinciden con las identificaciones morfológicas de los individuos adultos realizadas por los métodos tradicionales. Para Platygastriidae se obtienen dos géneros con el 5% de “Top Percent”, *Leptacis* Forster, 1856 y *Synopeas* Forster, 1856 (Platigastrinae), mientras que este último género es el único representante de la familia empleando el 2%. Sólo existen coincidencias con las identificaciones morfológicas a nivel de subfamilia, ya que a través del uso de claves taxonómicas, los individuos de esta familia fueron identificados pertenecientes al género *Platygaster* Latrielle, 1809.

1.21 Insectos asociados a las agallas

El número de agallas en las hojas de *C. barbadensis* fue aumentando a lo largo del periodo de muestreo, así como el número de individuos que se obtuvieron de las agallas, el cual aumento hacia la semana del 15 de abril. De las agallas disectadas provenientes de hojas de los 15 árboles muestreados se obtuvieron 2008 larvas y 356 individuos adultos.

En la tabla 3 se presenta el número de especies por familia delimitadas tanto con la información de las secuencias de ADN como por morfología externa que se encontraron para cada tipo de agalla tanto en la temporada de secas como en la primera semana de noviembre.

El tipo de agalla que se observó con menor frecuencia fue el morfotipo 5, del cual sólo se obtuvo una especie de Eulophidae, una de Platygasteridae y dos de Cecidomyiidae; el morfotipo de agalla 3 fue el que presentó una mayor riqueza de especies con un total de 19 especies de las diferentes familias encontradas en el estudio a excepción de la familia Braconidae y Torymidae. De este morfotipo de agalla se obtuvo el mayor número de especies de Eulophidae y de las nueve especies de esta familia, siete de ellas corresponden a la subfamilia Tetrastichinae, las cuales sólo se obtuvieron de éste tipo de agalla. Por su parte el tipo 1 de agalla, a pesar de ser el más abundante y frecuente en las hojas de *C. barbadensis*, presentó 18 especies asociadas. La única familia que no se obtuvo en este tipo de agalla fue Braconidae y se encontró el mayor número de especies de Platygasteridae y Eurytomidae.

En las agallas tipo 4 se obtuvo una riqueza de 12 especies donde se registró el mayor número de especies de Cecidomyiidae y la única especie de Braconidae presente en el estudio. El tipo de agalla 2, al igual que el tipo de agalla 3, no registró especies de Braconidae ni de Torymidae y solo presento una riqueza de 10 especies. A excepción de las especies de Braconidae, Torymidae y de Tetrastichinae (Eulophidae), las otras especies estuvieron asociadas a más de un tipo de agalla. Las tres especies de Lepidoptera obtenidas en este estudio, sólo se encontraron en las agallas tipo 1, 2 y 3.

Tabla 3. Riqueza de especies asociadas a los diferentes tipos de agallas encontrados en *C. barbadensis*.

	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	Tipo 4	Tipo 5
Lepidoptera	1	1	1	---	---
Cecidomyiidae	3	4	4	5	2
Eurytomidae	5	2	3	2	---
Eulophidae	3	2	9	2	1
Braconidae	---	---	---	1	---
Torymidae	1	---	---	---	---
Platigastridae	5	1	2	2	1
Total	18	10	19	12	4

Respecto a la abundancia de individuos, se observa que las larvas de individuos de Cecidomyiidae (Díptera) se presentaron de manera abundante durante todo el periodo muestreado de secas (Figura 15). Hacia la sexta semana (22-23 abril), el número de larvas de este grupo aumentó considerablemente y aunque varió en las semanas posteriores, la frecuencia de los morfotipos de Cecidomyiidae fue mayor que al comienzo del muestreo. Las cinco morfoespecies de dípteros adultos no fueron incluidas en la construcción de ésta gráfica.

En las familias de Hymenoptera, los periodos de presencia de los morfotipos de larvas y adultos de Eurytomidae (7 spp.) y Braconidae (1 sp.) fué similar al de los dípteros, aumentando considerablemente hacia la sexta semana del muestreo en secas. Para Eulophidae, la presencia de estadios inmaduros fue más frecuente al inicio del muestreo (1-2 abril), mientras que los individuos adultos se observaron a lo largo del periodo de muestreo. Platygastridae fue la familia de Hymenoptera que se encontró más frecuentemente, tanto larvas como adultos, a lo largo del periodo de muestreo a excepción de la primera semana. Para la familia Torymidae solo se obtuvieron dos individuos inmaduros durante todo el periodo de muestreo, los cuales fueron recolectados en la semana del 15-16 abril. Para el orden Lepidoptera sólo se registraron tres larvas en la última semana de abril y la primera semana de mayo, por lo que no se incluyeron en los análisis de frecuencias de familias obtenidas en el muestreo.

De las agallas recolectadas en noviembre sólo se obtuvieron individuos en estadios inmaduros de las familias Cecidomyiidae (Diptera) y Eulophidae (Hymenoptera.)

Familias de Insectos Asociados

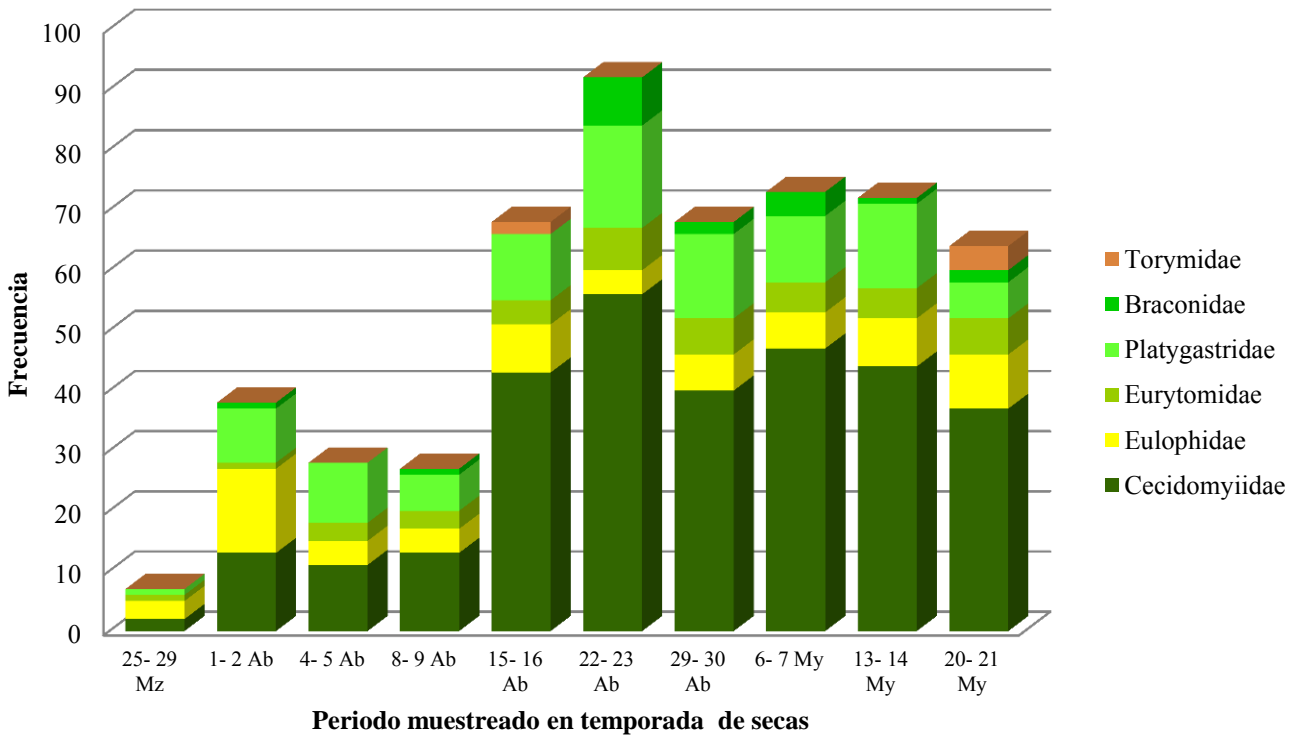


Figura 15. Familias de insectos asociados a las agallas de *C. barbadensis* a lo largo de todo el periodo de muestreo

En la Figura 16 se muestra un análisis de correspondencias canónicas en donde se observa la asociación de especies de insectos identificados con cuatro de los cinco tipos de agallas de acuerdo con la frecuencia de las mismas a lo largo del muestreo en secas. Las dimensiones de la gráfica explican el 86% de los datos y se observa una diferencia estadísticamente significativa entre los diferentes tipos de agallas y las especies asociadas a estas ($X^2= 912,989$; $df= 102$; $p<0.001$). De las 37 especies de insectos delimitadas por los dos tipos de evidencia se registraron seis especies putativas asociadas a un solo tipo de agalla: dos especies de Eurytomidae en los tipos de agalla 1 y 3, respectivamente; dos de Tetrastichinae (Eulophidae) en los tipos de agalla 2 y 3, la única especie de Torymidae y una de Cecidomyiidae en el tipo de agalla 1. En Cecidomyiidae, cinco de las siete especies representadas por más de un individuo secuenciado se presentaron en los cuatro tipos de agallas y solo una especie estuvo presente en los tipos de agalla 2, 3 y 4.

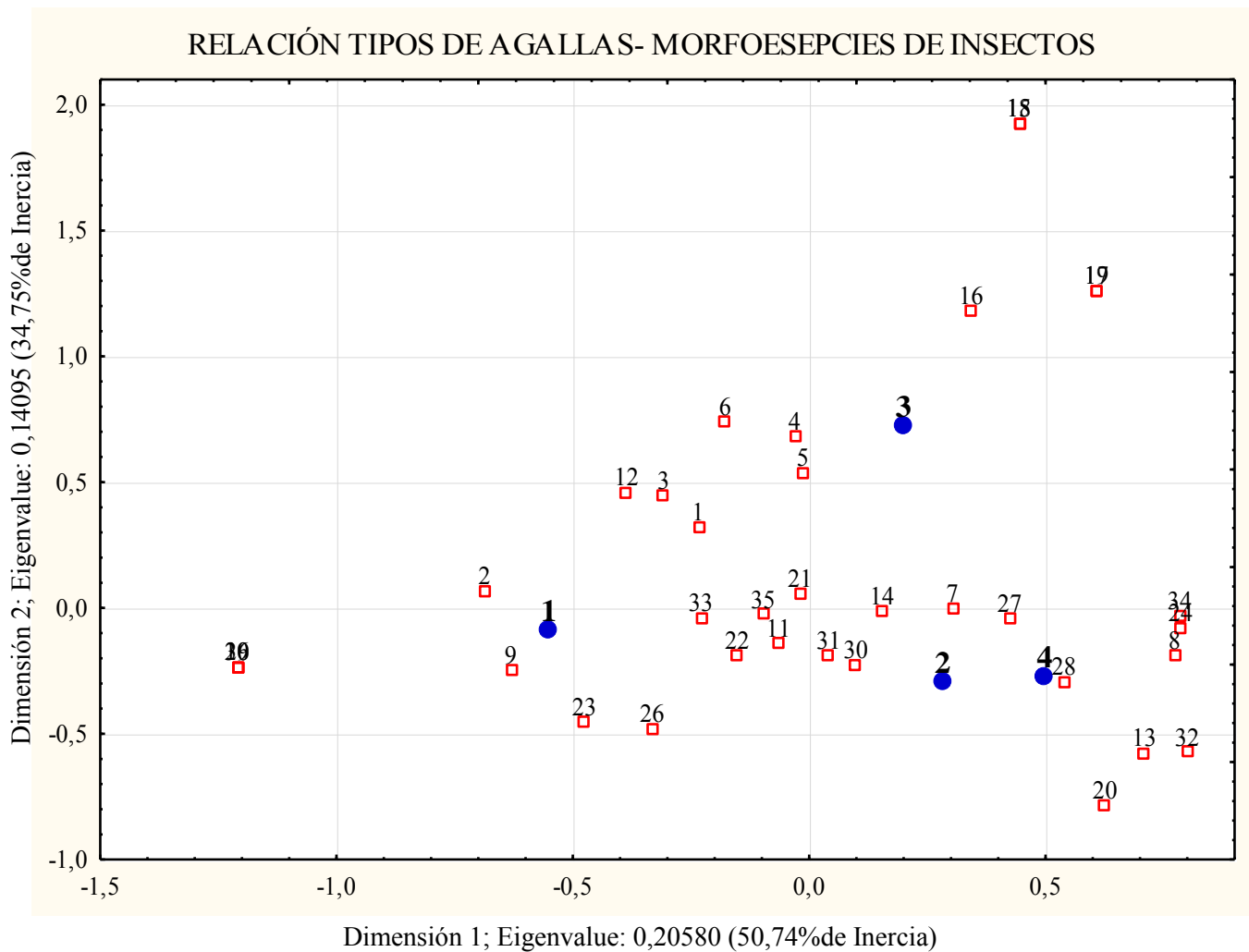


Figura 16. Análisis de correspondencia entre los tipos de agallas y las especies de insectos delimitadas. Los puntos en azul corresponden a los tipos de agallas y los cuadrados rojos corresponden a las especies de insectos organizadas: 1 a 5 Especies de Platygasteridae 01-05; 6 Especie Telenominae 01; 7 a 15 Especies de Eurytomidae 01- 09; 16 a 20 Especies de Tetrastichinae 01- 05; 21 a 27 Especies de Entedoninae 01- 07; 28 Especie de Allorhogas 01; 29 Especie de Torymidae 01; 30 a 36 Especies de Cecidomyiidae 01- 07

Para Hymenoptera, en la subfamilia Platygasterinae (Platygasteridae) dos de las especies estuvieron asociadas solo al tipo 1 de agalla (3 y 13 ejemplares secuenciados, respectivamente), y solo una especie de Platygasterinae se encontró en tres morfotipos de agalla distintos (9 ejemplares secuenciados). La subfamilia Telenominae (Platygasteridae) estuvo asociada a los tipos de agalla 1 y 3 con 30 ejemplares secuenciados entre pupas e individuos adultos (Figura 16).

Doce de los trece ejemplares secuenciados de la especie de Braconidae, *Allorhogas coccolobae* (Doryctinae), ocurrieron en el morfotipo de agalla 4, mientras que sólo una

larva de esta especie fue encontrada en el tipo 1 de agalla. En general, la subfamilia Entedoninae (Eulophidae) estuvo presente en los cuatro tipos de agallas. Para una de las especies se secuenciaron solo tres individuos y cada uno estuvo relacionado con un tipo de agalla diferente. De la especie de esta subfamilia de la que más se obtuvieron individuos se secuenciaron 26 ejemplares que estuvieron asociados a los tipos de agalla 1 y 2. De las otras especies se obtuvieron muy pocos individuos, de manera que solo se secuenció un individuo por especie, cada una por lo tanto relacionada con solo un tipo de agalla. La otra subfamilia de Eulophidae, Tetrastichinae, es la única que no tiene ninguna especie que esté presente en los cinco tipos de agallas. Se secuenciaron ocho ejemplares de las cinco especies de esta subfamilia y en su mayoría están asociados a la agalla tipo 3.

De las siete especies de la familia Eurytomidae, hay cuatro especies asociadas a un solo tipo de agalla: una al tipo de agalla 4 con tres ejemplares secuenciados, dos asociadas al tipo de agalla 1 con uno y dos ejemplares secuenciados respectivamente y una especie asociada al tipo de agalla 3 con solo un individuo secuenciado. De las especies restantes, una está asociada a los tipos de agallas 1, 3 y 4, de la cual se secuenciaron 18 individuos; otra, con solo dos individuos secuenciados, está asociada a los tipos de agalla 1 y 2 y por último, se secuenciaron 9 individuos de la única especie asociada a los cuatro tipos de agalla.

1.22 *Biología de los taxones obtenidos*

Los dípteros de la familia Cecidomyiidae son principalmente formadores de agallas. Los resultados obtenidos en MEGAN muestran que las especies delimitadas pertenecen a la tribu Cecidomyiini y pueden corresponder a los géneros *Contarinia* o *Macrodiplosis*, los cuales presentan biología bastante similares de acuerdo con Gagné (1981), Uechi *et al.* (2011) y Kim *et al.* (2014) (Tabla 4).

La tribu Cecidomyiini (Cecidomyiinae: Cecidomyiidae) presenta un amplio rango de hábitos, ya que existen especies de vida libre, fitófagos y micófagos, formadores de agallas simples y complejas, depredadores generales o específicos de ácaros, áfidos y

cóccidos o parasitoides internos de áfidos y psílidos (Gagné, 1981). Las especies inductoras de agallas del género *Contarinia* son cosmopolitas y pueden ser polífagas con un amplio rango de especies hospederas o monófagas u oligófagas con uno o varios géneros de plantas dentro de una misma familia como hospederos (Uechi *et al.*, 2011). La mayoría de las especies de este género viven de manera gregaria en las partes florales de la planta o en las agallas que inducen en las hojas (Gagné, 2010). Por su parte, las larvas de los individuos del género *Macrodiplosis* son principalmente inductores de agallas de plantas fagáceas del género *Quecus* y a pesar de que se conoce poco de su biología, se sabe que inducen agallas en los márgenes del haz de la hoja (Kim *et al.*, 2014).

Para Hymenoptera, las especies asignadas a Platigastridae pertenecen a la subfamilia Platigastrinae. Los individuos de esta subfamilia son endoparasitoides koinobiontes de huevos de cecidómidos agalleros y están estrechamente relacionados con las plantas o las partes de las plantas donde se encuentra la agalla del hospedero (Masner y Huggert, 1989; Masner, 1993). Al momento de la ovoposición, la hembra parasita los huevos o los primeros instares larvales del díptero y la avispa adulta emerge de la prepupa o pupa del díptero parasitado (Hanson y Gauld, 2006).

Los géneros obtenidos por MEGAN, *Leptacis* y *Synopeas* y el género obtenido por medio del uso de claves taxonómicas, *Platygaster*, presentan la misma biología general de la subfamilia (Masner, 1993; Buhl, 2014) y se encuentran relacionados directamente con diferentes especies agalleras de Cecidomyiidae (Hanson y Gauld, 2006).

De la familia Eulophidae, se obtuvieron especies asignadas a dos subfamilias, Entedoninae y Tetrastichinae. La familia en general presenta hábitos parasitoides y pocos individuos son fitófagos o depredadores. Los hospederos incluyen arañas y huevos de insectos, nemátodos, ácaros, trips y otros Hymenoptera (La Salle, 1994). Sin embargo, los eulófidos atacan principalmente larvas de insectos holometábolos como Lepidoptera, Hymenoptera, Diptera y Coleoptera, aunque también hay registros de parasitoidismo en huevos, prepupas y pupas (Graham, 1991; Fernández y Sharkey, 2006) (Tabla 4).

Las especies de los dos géneros de Entedoninae obtenidos con MEGAN, *Chrysonotomyia* y *Closterocerus* presentan similitudes en su biología y comparten el rango

de hospederos. Los dos géneros son endoparasitoides gregarios o solitarios de larvas de especies minadoras o gallícolas y pupas de Hymenoptera, Diptera, Lepidoptera y Coleoptera (Noyes, 2003; Gumovsky *et al.*, 2006; Burks *et al.*, 2011). El género *Baryscapus* (Tetrastichinae) es hiperparasitoide de Ichneumonoidea y Chalcidoidea, aunque algunas de sus especies también son endoparasitoides gregarios de pupas y larvas de dípteros de la familia Tephritidae y de otros órdenes de Insecta como Lepidoptera, Coleoptera y en algunas ocasiones se han registrado en Neuroptera (Graham, 1991; La Salle, 1994; Surekha y LaSalle, 1995). Sin embargo, algunas especies de la subfamilia son parasitoides y/o inquilinos de insectos agalleros o de las agallas, aunque algunas pocas son inductoras de agallas (La Salle, 2005).

Las larvas de la familia Eurytomidae pueden ser entomófagas, parasitando estados larvales o pupales de Coleoptera, Diptera e Hymenoptera como idiobiontes endoparasíticos solitarios, fitófagas, alimentándose de semillas o induciendo la formación de agallas sobre otras partes de las plantas (Campbell *et al.*, 2000) o inquilinas que se alimentan del insecto hospedero y del tejido de la agalla (Lotfalizadeh *et al.*, 2007; Gates y Delvare, 2008). La mayoría de las especies del género más grande, *Eurytoma*, son idiobiontes ectoparasíticos de insectos formadores de agallas (Uhler, 1951; Askew, 1961), como dípteros cecidómidos y miembros de la familia Cynipidae. Sin embargo, se reconocen otros tipos de alimentación para este género como cleptoparasitismo (Arthur, 1961), fitofagia en semillas (Bugbee, 1971), pseudohiperparasitismo (Rosenberg, 1934) o entomofitofagia (Bugbee, 1975).

La información obtenida a partir de las secuencias generadas de los individuos de la familia Torymidae no permitió que se identificaran hasta un nivel inferior. En general, poco se conoce de la biología de este grupo. Las especies de esta familia cuya biología es conocida son ectoparasitoides de dípteros e himenópteros inductores de agallas (Hanson y Gauld, 2006; Fernández y Sharkey, 2006).

Por su parte, *Allorhogas coccolobae* (Doryctinae) es una especie de la familia Braconidae recientemente descrita y asociada con agallas de hojas de *C. barbadensis* en la zona de estudio del presente trabajo (Martínez y Zaldívar-Riverón, 2013). Varias especies de este género han sido reportadas como inductoras de agallas en especies vegetales de nueve familias de plantas vasculares (Macedo *et al.*, 1998; Chavarría *et al.*, 2009; Centrella

y Shaw, 2010; Zaldívar-Riverón *et al.*, 2014), aunque otras se han obtenido de agallas inducidas por otros insectos, a pesar de que la interacción con éstos inductores es desconocida (Gahan, 1912; Zaldívar-Riverón *et al.*, 2014).

Finalmente, existen pocas especies de Lepidoptera que induzcan agallas y existen discusiones respecto a si el daño que inducen los lepidópteros en sus hospederos pueden considerarse agallas como tal (Miller, 2005). A pesar de esto, las características morfológicas que presentan las agallas producidas por especies de este grupo ejemplifican el concepto de fenotipo extendido y se consideran como caracteres diagnósticos (Miller, 2000). Los lepidópteros en general se consideran como inquilinos obligados o facultativos que utilizan las agallas inducidas por otros organismos como protección y alimento debido principalmente al elevado valor nutritivo de los tejidos de la agalla (Raman, 1994). La información correspondiente a la biología de Lepidoptera asociada a las agallas no se presenta en la tabla 4.

Tabla 4. Familias, tribus, subfamilias y géneros de Diptera e Hymenoptera y número de especies encontradas en el estudio con información sobre su biología de acuerdo con la literatura

Familias	Número de especies	Tribu o subfamilia	Género	Biología
Cecidomyiidae	7	Cecidomyiini	<i>Contarinia</i> <i>Macrodiplosis</i>	Gallicolas, fitófagos de tallos, micófagos, depredadores, parasitoides (Gagné, 1981; Uechi <i>et al.</i> , 2011; Kim <i>et al.</i> , 2014).
Platigastridae	6	Platygastrinae	<i>Leptacis</i> <i>Synopeas</i>	Parasitoides koinobiontes de huevos de Cecidomyiidae (Masner y Huggert, 1989; Masner, 1993; Buhl, 2014).
Eulophidae	12	Entedoninae	<i>Chrysonotomyia</i> <i>Closterocerus</i>	Endoparasitoides solitarios, gregarios de larvas minadoras o gallicolas, pupas de Hymenoptera, Diptera, Lepidoptera y Coleoptera. Pocos fitófagos (Noyes, 2003; Gumovsky <i>et al.</i> , 2006; Burks <i>et al.</i> , 2011)

Eulophidae		Tetrastichinae	<i>Baryscapus</i>	Endoparasitoides gregarios de huevos, larvas y pupas de Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera, Coleoptera, Neuroptera y Coccoidea. Hiperparasitoides de Ichneumonoidea y Chalcidoidea. Fitófagos, depredadores de dípteros o nemátodos agalleros (Graham, 1991; La Salle, 1994)
Eurytomidae	9	---	Eurytoma	Fitófagos, depredadores de semillas o agalleros. Idiobiontes ectoparasíticos, o inquilinos que se alimentan del hospedero y del tejido vegetal (Uhler, 1951; Lotfalizadeh <i>et al.</i> , 2007; Gates y Delvare, 2008)
Torymidae	1	---	---	Parasitoides generalistas. Ectoparasitoides de dípteros e himenópteros gallicolas. Seminívoras o gallicolas (Hanson y Gauld, 2006; Fernández y Sharkey, 2006)
Braconidae	1	Doryctinae	<i>Allorhogas coccolobae</i>	Inductores de agallas (Macedo <i>et al.</i> , 1998). Algunos inquilinos o parasitoides (Wharton y Hanson, 2005).

DISCUSIÓN

1.23 Fenología de las agallas

El presente estudio representa la primera investigación sistemática acerca de la fenología de agallas y su riqueza de especies de insectos asociados en una especie de la familia Polygonaceae. A pesar de que no se pudieron realizar muestreos sistemáticos durante todo el año, el periodo muestreado en la temporada de secas (marzo-mayo 2013) permitió conocer varios aspectos relevantes, tales como el número de tipos de agallas presentes en las hojas, su estado de desarrollo en esa época del año y la riqueza de especies de insectos asociados. Sin embargo, la presencia de todos los morfotipos de agallas y de larvas de dípteros cecidomidos durante el muestreo de noviembre indica que los inductores de este tipo de agallas probablemente son multivoltinos (*i.e.* presentan más de una generación al año). Aunque los resultados obtenidos en este estudio representan un avance significativo en el entendimiento de la biología de las agallas de *C. barbadensis* y su entomofauna asociada en Chamela, aún es necesario realizar un estudio sistemático a lo largo de uno o más ciclos anuales para conocer con mayor precisión qué especies inductoras y sus inquilinos y/o parasitoides asociados se encuentran presentes a lo largo del año, cuáles son estacionales y cuales presentan más de una generación.

Los resultados obtenidos indican que el número de agallas presentes en las hojas de los árboles de *C. barbadensis* aumentó a lo largo del periodo de muestreo en la temporada seca (Figura 8). Este aumento pudiera deberse a que la oviposición de la especie inductora se realizó durante o poco antes del inicio del periodo de muestreo (fines de marzo 2013), por lo que el desarrollo de la agalla fue paulatino hasta hacerse visible en las semanas subsecuentes. Esto concuerda con la presencia de un mayor número de larvas a partir de la quinta semana de muestreo (15-16 abril), ya que resulta sumamente difícil detectar huevos y larvas en etapas iniciales de desarrollo al diseccionar las agallas.

El aumento gradual en el número de agallas durante la temporada de secas en *C. barbadensis* pudiera deberse además, a la variación de las condiciones medioambientales y/o a la modificación en el hábitat por diferentes procesos bióticos, como la caída de árboles adyacentes, que pueden influir en su distribución espacial y temporal a escala local

(Juliaño *et al.*, 2005). Es posible que la agudización en la disponibilidad limitada de agua durante la temporada de secas induzca a la planta a presentar respuestas fisiológicas para mantenerse y poderse reproducir (Taíz y Zeiger, 2006). Este estrés ambiental causado por el incremento de la sequía influye en la respuesta de defensa de la planta, haciéndola más susceptible al ataque de insectos herbívoros, lo cual, puede afectar positivamente la diversidad de insectos inductores de agallas (Fernández *et al.*, 2005; Santos de Araújo *et al.*, 2011).

1.24 Características estructurales de las agallas

Las características morfológicas que presentan los cinco tipos de agallas registrados en las hojas de *C. barbadensis*, pueden sugerir que fueron inducidos por diferentes insectos agalleros, debido a que cada organismo inductor induce respuestas morfogenéticas y fisiológicas específicas en su planta hospedera (Inbar *et al.*, 2004; Florentine *et al.*, 2005; Raman *et al.*, 2005). Además, es frecuente la presencia de una gran diversidad de tipos de agallas no solo en una misma especie de planta hospedera, sino hasta en el mismo órgano (Price *et al.*, 1987; Stone y Cook, 1998), lo que coincide con el hecho de haber encontrado esta variedad de agallas en las hojas de una misma especie vegetal.

De los cinco morfotipos de agallas encontrados en *C. barbadensis*, el morfotipo 1 (Figura 9-1) se distingue de los demás por tener paredes considerablemente más gruesas, duras y de mayor tamaño. De este morfotipo de agalla se obtuvo el mayor número de larvas de dípteros cecidómidos, posiblemente los inductores de las agallas (Figura 10), por lo que su estructura más gruesa y dura podría permitir al insecto agallero o al inquilino sobrevivir a ataques de enemigos naturales independientemente de las condiciones ambientales que afecten a la planta (Crespi y Worobey, 1998; Santos de Araújo *et al.*, 2011). Aumentar el grosor y dureza de la agalla podría resultar en un menor ataque por parte de parasitoides al insecto inductor, debido a que el ovipositor pudiera no ser lo suficientemente largo y rígido para alcanzar la larva o pupa que está dentro de la cámara de la agalla (Weis, 1993; Espírito-Santo *et al.*, 2004). No obstante, este morfotipo presentó el mayor número de especies de parasitoides asociados (Tabla 3).

En los otros cuatro morfotipos de agallas registrados, que son considerablemente más pequeños y sus paredes más delgadas y frágiles, el número de especies parasitoides asociadas es menor que en el morfotipo 1 (Tabla 3). Sin embargo, Stone y Cook (1998), sugieren que las larvas de los insectos inductores de las agallas cuyas estructuras son más delgadas y frágiles, sufren mayores tasas de parasitoidismo, por lo que sus ciclos de desarrollo suelen ser más rápidos para evitar o disminuir el ataque de parasitoides (Schoonhoven *et al.*, 1998). Estudios subsecuentes permitirán conocer si existe una relación entre la estructura y las características morfológicas de las agallas y su riqueza de especies parasitoides asociadas.

1.25 Interacción agalla-insecto

La diversidad de agallas encontradas en *C. barbadensis* alberga una vasta riqueza de especies de insectos, la cual incluye no solo a los inductores, sino además varias otras especies, entre ellos posibles parasitoides, inquilinos y/o hiperparasitoides. Este ‘microcosmos’ de agallas representa por lo tanto una comunidad ecológica de gran complejidad funcional, pero a la vez dificulta sustancialmente el conocimiento de sus interacciones tróficas. El presente estudio representa una base objetiva para la identificación de las especies presentes en el sistema, lo cual permite dilucidar de manera preliminar el rol que podría jugar cada una de ellas en las interacciones tróficas existentes.

El comportamiento alimenticio especializado del agallero hace que éste se limite a atacar una sola especie de planta y logre una eficiente utilización del recurso al inducir la agalla (Florentine *et al.*, 2005). Dicha agalla, presenta una estructura que puede ser el reflejo fenotípico de los genes del inductor (Crespi *et al.*, 1997). Lo anterior sugiere que cada tipo de agalla encontrada en *C. barbadensis* está originada por una especie inductora diferente. Algunos insectos inductores de agallas como los cinípidos presentan dos generaciones por año, una sexual y otra asexual, y cada una desarrolla agallas que son estructuralmente diferentes y pueden ser desarrolladas en diferentes especies de plantas hospederas y órganos de la planta (Askew, 1984). No obstante, esto no parece ser el caso en

este estudio, ya que las cinco formas de agallas fueron encontradas en el mismo periodo de muestreo.

Con base en los resultados obtenidos y en las observaciones de campo realizadas es probable que al menos cuatro de los cinco tipos de agallas (tipos 1-4) encontrados en las hojas de *C. barbadensis* puedan ser inducidas por dípteros cecidómidos. Esta propuesta se apoya en las siguientes líneas de evidencia. Primero, las larvas de cecidómidos fueron siempre las más abundantes en los cinco morfotipos de agalla, y generalmente presentaron el mayor tamaño. Se ha observado que las especies inductoras son generalmente más abundantes y de mayor tamaño que los parasitoides e inquilinos, a menos de que éstos también se alimenten del tejido vegetal (Paul Hanson, com. pers.) Otra evidencia que apoya que los tipos de agallas 1 y 4 son inducidas por especies de cecidómidos es la presencia de exuvias de estos dípteros encontradas en su parte externa durante los meses de marzo y abril. Este tipo de comportamiento es común en los dípteros cecidómidos que emergen de las agallas en el momento en que pasan a su fase adulta (Ollerstam *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2014). La emergencia de los posibles inductores junto con la caída de las hojas, sugiere que los cecidómidos tendrían un patrón de historia de vida similar al IB propuesto por Yukawa (1987), en el cual la larva madura no abandona la agalla, alcanzando la etapa adulta hasta después que la agalla se desprende y cae al suelo. Por último, los cecidómidos fueron el único taxón presente en los cinco tipos de agallas, lo cual sugiere que una especie de cecidómido indujo cada tipo de agalla.

Una explicación alternativa menos plausible, pero que no debe descartarse, es que un inductor pueda ser el responsable de la formación de más de un tipo de agalla. Se ha observado que en ocasiones la diferenciación estructural de las agallas se debe a que las larvas del inductor se aprovechan de diversas maneras los tejidos alimenticios de la planta, además de inducir sobre la misma diferentes respuestas en relación al comportamiento de los insectos (Hanson y Gauld, 2006). Además, pudiera ser que las agallas sufran modificaciones morfológicas por parte de los insectos inquilinos cuando la larva comienza a alimentarse de los tejidos de la agalla (Rohfritsch, 1992), o por la presencia de parasitoides en etapas tempranas de la larva inductora que interrumpan su desarrollo normal.

A lo largo del periodo de muestreo en temporada de secas, tanto en hojas jóvenes como maduras, se encontraron agallas en diferentes etapas de desarrollo con individuos en diferentes estadios larvales en las cámaras. Independientemente del tipo de agalla, del insecto inductor o del inquilino, el impacto de esta estructura de encierro en el comportamiento del parasitoide debe considerarse en todo el periodo de desarrollo de la misma (Stone y Cook, 1998), ya que las estructuras presentes en la agalla madura casi siempre están ausentes en los primeros estadios de desarrollo y algunos parasitoides generalistas atacan en las primeras fases de crecimiento de la agalla o en las fases tardías (Schonrogge *et al.*, 1995; Plantard *et al.*, 1996).

1.26 Comunidad de insectos asociados a las agallas

1.26.1 Métodos de delimitación de especies

En el sistema estudiado se encontró, además de una riqueza considerable de especies de dípteros y de himenópteros pertenecientes a varias familias, una diversidad importante de estrategias de vida para estas especies de acuerdo con la información biológica conocida a la fecha para las familias y géneros identificados con la información morfológica y molecular. Estas identificaciones permiten sugerir que entre los taxones recolectados existen especies inquilinas o cleptoparasitas, parasitoides tanto de los insectos gallícolas como de los inquilinos, así como hiper-parasitoides, es decir, parasitoides de los parasitoides primarios (Hanson y Gauld, 2006).

Los individuos adultos de la comunidad de insectos asociados a las agallas examinadas fueron generalmente identificados hasta nivel de subfamilia con base en su morfología externa, aunque para la mayor parte de los ejemplares en estado larval así como pupas no fue posible realizar identificaciones con este tipo de caracteres. El empleo del locus del código de barras (Hebert *et al.*, 2003) por lo tanto representó una herramienta de gran utilidad para asociar ejemplares de la misma especie en diferentes estados de desarrollo. Esta asociación por medio de evidencia molecular permitió además recabar información acerca de los instares larvales de algunas de las especies.

Los análisis de delimitación de especies del 2% y GMYC permitieron establecer 35 y 39 especies putativas, respectivamente, asociadas a las agallas de *C. barbadensis*. El método de GMYC dividió en tres especies a una MOTU de Eulophidae y en dos a dos MOTUs de Eurytomidae (Tabla 2). Treinta y dos de las especies delimitadas, que corresponden a individuos de los órdenes Lepidoptera, Diptera e Hymenoptera, son concordantes entre los dos métodos utilizados. Con respecto a las especies con incongruencias entre los dos métodos arriba mencionados, no fue posible observar caracteres morfológicos que ayudaran a separar a las especies propuestas por el método de GMYC, ya que en estos taxones en su mayoría solo se contó con pupas. Por lo tanto, es recomendable adoptar una postura conservadora y reconocer únicamente a 35 especies para el sistema de estudio.

Finalmente, los análisis de identidad taxonómica realizados con los programas QUIIME y MEGAN permitieron ampliar la información sobre las identificaciones morfológicas, corroborar la información taxonómica obtenida a partir de las secuencias de ADN y sugerir niveles taxonómicos más precisos (e.g. subfamilia, tribu, subtribu y género) para algunos grupos identificados hasta nivel de familia (Figura 14). Sin embargo, la base de datos de GenBank que usa BLAST para encontrar las secuencias publicadas más similares resulta sumamente incompleta para muchos grupos de insectos, incluyendo himenópteros y cecidómidos. Por lo tanto, los resultados obtenidos de esos análisis deben utilizarse solo de manera preliminar en ausencia de identificaciones más confiables, pero constituye hipótesis a poner a prueba y sientan una base para estudios sistemáticos subsecuentes.

1.26.2 Insectos asociados a agallas

Los dípteros pertenecientes a la familia Cecidomyiidae son uno de los grupos formadores de agallas más diversos y abundantes (Fernandez *et al.*, 1994; Raman, 2011). A pesar de ser una familia constante durante el muestreo en secas, durante los periodos de aumento de temperatura ambiental en la zona de estudio (a partir de la segunda semana de abril), el número de individuos recolectados de dicha familia creció, coincidiendo además con el aumento del número de agallas en las hojas. Al respecto, Fernández *et al.* (1993, 1994) plantean que el hábitat de este tipo de insectos está adaptado a áreas de muy poca humedad,

lo que hace que la riqueza de estas especies incremente a medida que el ambiente se torna más seco.

Las larvas de Cecidomyiidae en sus primeros estadios atacan las células epidermales de las hojas de las plantas y se encierran en una masa de tejidos de crecimiento cerca al lugar donde fueron puestos los huevos antes de penetrar en el tejido de la hoja (Rohfritsh, 1992), modificando los tejidos vegetales con las mandíbulas y la saliva (Ollerstam *et al.*, 2002). Debido a este proceso mecánico, es posible que las larvas de esta familia no necesiten que las hojas de los árboles estén jóvenes para poder inducir la formación de la agalla y puedan crecer en hojas maduras, lo que explica el hecho de que se hayan registrado larvas de esta familia en cada una de las semanas de muestreo. Por consiguiente, al ser una especie perennifolia (Castillejos y Solano, 2008), *C. barbadensis* resulta un hospedero adecuado para los cecidómidos, independientemente de la fenología de la planta

De las agallas disectadas entre marzo y mayo sólo se obtuvieron larvas de individuos de Cecidomyiidae asociadas a los cinco tipos de agallas y en ningún momento se observó la emergencia de algún adulto. Las larvas de Cecidomyiidae son relativamente fáciles de recolectar en las agallas que inducen en la planta hospedera, pero no así los adultos, ya que se observó que éstos suelen emerger de las hojas una vez que estas caen al suelo (Uechi *et al.*, 2011). Esta estrategia se observó en una visita corta realizada a la zona de estudio el 19 de mayo de 2014, donde al no encontrar hojas en los árboles trabajados se recolectaron hojas del suelo que presentaron agallas, obteniendo de éstas los adultos de dípteros cecidómidos incluidos en los análisis de delimitación de especies con base en secuencias de ADN. Esta evidencia, por lo tanto, indica que los cecidómidos de las agallas estudiadas siguen el patrón de historia de vida IB (Yukawa, 1987), en el que la larva permanece en la agalla durante todas sus fases y hasta que la agalla se desprende y cae al suelo es que llega al estado adulto.

En cuanto al Orden Hymenoptera, las avispas parasitoides pertenecientes a las familias Eurytomidae, Eulophidae, Platygasteridae, Torymidae y Braconidae encontradas en las agallas de *C. barbadensis* generalmente son capaces de sobrellevar las limitaciones ambientales del entorno y físicas de la ovoposición sincronizando su fenología con la de la

agalla (Hanson y Gauld, 2006). Esto podría explicar por qué fue posible encontrar individuos de las diferentes familias de parasitoides a lo largo de todo el trabajo de campo.

Se sabe que los primeros estadios de la agalla generalmente son parasitados por especies generalistas (Surekha y LaSalle, 1995). Este comportamiento se observó en las primeras semanas de muestreo al encontrarse la presencia de individuos de familias de Hymenoptera que presentan estos hábitos, tales como especies de eulófidos, las cuales causan una gran mortalidad en los insectos agalleros (Schonrogge *et al.*, 1995). Subsecuentemente, con el crecimiento posterior de la agalla aparecen los parasitoides especialistas, entre ellos miembros de la familia Platygasteridae, los cuales suelen poseer ovoposidores más largos que les permiten acceder a la cámara de la agalla y a la larva ubicada en ella (Bulh, 2014). Esto es interpretado como una respuesta coevolutiva entre el parasitoide y el inductor, donde el parasitoide busca adaptarse al mayor tamaño y a las características estructurales de las agallas (Askew, 1961).

1.27 Inferencias sobre interacciones tróficas

Las familias de los dos órdenes principales de insectos encontrados en el estudio (Diptera, Hymenoptera) presentan biología diferentes. Los dípteros de la familia Cecidomyiidae son en su mayoría formadores de agallas (Raman, 2011). Sin embargo, dentro de la familia, y específicamente en la tribu Cecidomyiini, existen grupos que presentan un amplio rango de hábitos, ya que además tener especies inductoras de agallas otras pueden ser de vida libre, fitófagas, micófagas, depredadores o hasta parasitoides (Gagné, 1981).

Los análisis de identidad taxonómica realizados en este estudio sugieren que algunas de las siete morfoespecies de Cecidomyiidae pueden pertenecer a los géneros *Contarinia* y *Macrodiplosis*, ambos reportados con especies inductoras de agallas (Gagné, 2010; Kim *et al.*, 2014). Por lo tanto, como se propuso anteriormente, la diversidad de agallas encontradas en las hojas de *C. barbadensis* y la biología de estos dos géneros propuestos permiten sugerir que los dípteros cecidómidos son los responsables de la

formación de estructuras de encierro en la planta de estudio, ya que se encontraron larvas de este grupo en todas las agallas disectadas de los diferentes tipos.

Stone y Cook (1998) plantean que las agallas formadas por miembros de un mismo género pueden presentar grandes diferencias en cuanto a forma y color, lo que puede sugerirse para las agallas inducidas por los dípteros cecidómidos en *C. barbadensis*, en donde de las siete especies delimitadas, cinco pueden haber inducido esta estructura de encierro, mientras que las especies restantes podrían tener otros hábitos reportados para la subfamilia Cecidomyiidae, tales como depredadores o parasitoides de insectos holometábolos (Gagné, 1981).

En Hymenoptera, existen dos estrategias contrastantes de parasitoidismo (Yukawa y Rohfritsch, 2005). En el tipo 1, en el que están agrupados los parasitoides cuyo tiempo de vida es relativamente corto, gastan mucha energía en producir más progenie y son usualmente monófagos. En esta clasificación se encuentran los miembros de la familia Platygastriidae, de los cuales se registraron larvas y adultos durante todo el periodo de muestreo, asociados principalmente al tipo 1 de agalla (Figura 17). Estos himenópteros se reconocen por ser endoparasitoides koinobiontes de huevos y larvas de cecidómidos agalleros (Hanson y Gauld, 2006), por lo que a medida que aumentaba el número de agallas presentes en las hojas y el número de larvas de Cecidomyiidae en las agallas, también aumentaba el número de individuos generalmente adultos de esta familia. Basados en las identificaciones morfológicas y de comparación de secuencias de ADN realizadas en el presente estudio, el parasitoidismo en Platygastriidae podría ser inducido por tres géneros diferentes pertenecientes a la subfamilia Platygastriinae, *Leptacys*, *Synopeas* y *Platygaster*, cuyas especies presentan biología similares (Masner, 1993; Buhl, 2014).

Dentro de la estrategia de parasitoidismo de tipo 1 se encuentra la familia Eurytomidae, la cual presenta una gran variedad de hábitos en sus diferentes estadios, incluyendo parasitoidismo, fitofagia o inducción de agallas (Campbell *et al.*, 2000). En particular, las especies de esta familia pertenecientes al género *Eurytoma* se caracterizan en su mayoría por ser idiobiontes endoparasíticos solitarios de insectos formadores de agallas (Uhler, 1951; Askew, 1961). Los insectos adultos de este género y algunas larvas se encontraron en los diferentes tipos de agallas (Figura 17), y de acuerdo a su biología se

puede sugerir que se encontraban parasitando a los individuos que ocupaban la agalla actuando como parasitoides, ocupando la agalla inducida por otros organismos actuando como inquilinos, o luego de devorar al hospedero, también devoraban tejidos de la agalla, de manera que también pueden actuar como cleptoparásitos (Arthur, 1961; Gates y Hanson, 2006; Lotfalizadeh *et al.*, 2007; Gates y Delvare, 2008). Sin embargo, la secuenciación de un marcador del código de barras de plantas a partir de extractos de ADN de individuos de ésta familia podría ayudar a esclarecer estas interacciones, ya que si se amplifican genes de *C. barbadensis* indicaría la ingestión de tejido vegetal por parte del insecto.

En contraste, en el tipo II de las estrategias de parasitoidismo de los himenópteros se encuentran aquellas especies que atacan estadios tardíos y pupas de dípteros agalleros. Estas especies son usualmente polífagas y su ciclo de vida es un poco más largo, pasando la mayor parte de su tiempo buscando un hospedero adecuado (Yukawa y Rohfritsch, 2005). En este grupo se encuentra la familia Torymidae, la cual a pesar de que se conoce poco sobre su biología, se sabe que algunas especies son ectoparasitoides de dípteros e himenopteros inductores de agallas (Hanson y Gauld, 2006). Además, algunas especies de esta familia atacan agallas maduras buscando agalleros en estadios avanzados (Plantard *et al.*, 1996), lo que podría explicar por qué los pocos individuos obtenidos de esta familia se registraron al final del muestreo, cuando la mayoría de las agallas estaban maduras.

Las especies parasitoides de la familia Braconidae generalmente presentan la forma de parasitoidismo tipo II. Aunque *Allorhogas* cuenta con especies que son inductoras de agallas (Macedo *et al.*, 1998), hay también otras especies de este género que han sido reportadas como parasitoides o inquilinas que se alimentan del tejido de las agallas inducidas por cinípidos o dípteros cecidómidos (Warton y Hanson, 2005). En el caso de las agallas de *C. barbadensis*, los individuos encontrados de *A. coccolobae* se encontraron asociados casi en su mayoría al tipo 4 de agalla. Futuros estudios ayudarán a clarificar si las larvas de esta especie son parasitoides de los cecidómidos inductores o inquilinos de las agallas maduras abandonadas por éstos, quizá por medio de la cría de agallas e insectos, para evaluar su desarrollo y comportamiento o por medio de la obtención de secuencias de ADN de tejido vegetal y animal a partir de contenidos estomacales de estos insectos (Jurado- Rivera *et al.*, 2009; Rougerie *et al.*, 2009; Wirta *et al.*, 2014).

La familia Eulophidae se caracteriza por estar integrada por especies parasitoides y generalistas, aunque algunas especies son fitófagas o depredadoras (Surekha y LaSalle, 1995; Burks *et al.*, 2011). De esta familia, se encontraron individuos desde el comienzo y a lo largo del periodo de muestreo. Las especies de los dos géneros de Entedoninae sugeridos por las comparaciones de secuencias de ADN, *Chrysonotomyia* y *Closterocerus*, estuvieron asociadas únicamente al tipo 1 de agalla. De acuerdo con los datos de la biología de estos géneros, sus especies encontradas probablemente son endoparasitoides solitarios de larvas y pupas de los cecidómidos agalleros.

Con respecto a las especies de eulófidos de la subfamilia Tetrastichinae, el género *Baryscapus*, sugerido por las comparaciones con secuencias de ADN, es generalmente conocido como endoparasitoide solitario de larvas y pupas de muchos himenópteros y dípteros (Vidal, 1997). No obstante, también se han reportado algunas especies de Tetrastichinae como inductoras de agallas (La Salle, 2005). Durante el periodo de estudio, las especies de esta subfamilia se encontraron asociadas únicamente al tipo de agalla 3, lo que sugiere que pueden ser parasitoides especialistas de cecidómidos o hiperparasitoides de avispas de alguna de las especies de Chalcidoidea presentes en las agallas (Yegorenkova *et al.*, 2011).

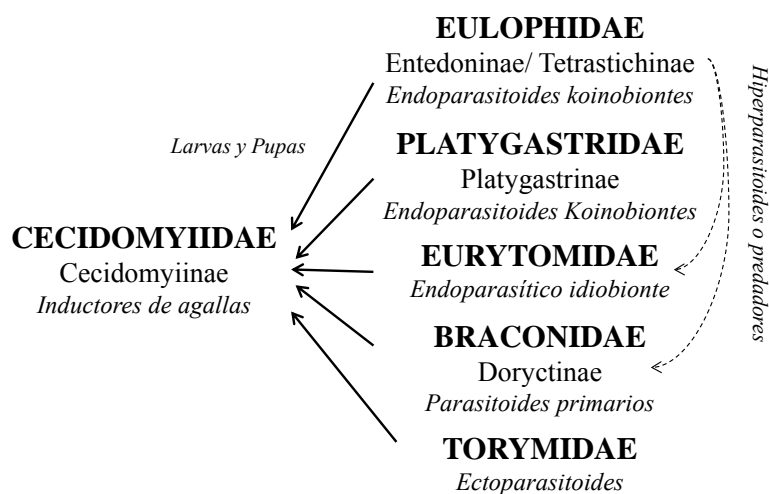


Figura 17. Posibles interacciones entre las familias de Diptera e Hymenoptera encontradas en el estudio de acuerdo a la biología general de los grupos. La línea continua refiere a las familias de Hymenoptera que son parasitoides de los diferentes estadios de Cecidomyiidae, mientras que la línea punteada refiere a las posibles interacciones de hiperparasitoidismo o predación entre las de familias de Hymenoptera. Esquema realizado por I.A. Rodríguez-Cifuentes

Además del parasitoidismo de larvas de Diptera, es posible que exista una relación de parasitoidismo o depredación entre las especies de Hymenoptera encontradas en el estudio (Figura 17). Los eulófidos, por ejemplo, pueden parasitar larvas, prepupas y pupas de otros himenópteros (Graham, 1991). De acuerdo a Yegorenkova *et al.* (2011) algunas especies del género *Baryscapus* (Eulophidae: Tetrastichinae) también pueden ser hiperparasitoides de superfamilias como Ichneumonoidea y Chalcidoidea, por lo que pueden estar asociados a otros eulófidos, eurytómidos o braconidos parasitoides.

Respecto a las especies de Lepidoptera, es posible que estas solo sean inquilinas facultativas de las agallas en las hojas de *C. barbadensis*, ya que las pocas especies que se reconocen como agalleras en este grupo están reportadas para Europa, Asia, Oceanía y unas pocas en Suramérica (Miller, 2005).

La información obtenida en este estudio para las agallas de hojas de *C. barbadensis*, muestra la complejidad del sistema de estudio y la necesidad de profundizar en el conocimiento de la biología de los insectos y la fenología planta

CONCLUSIONES

- 1.) Las hojas de ejemplares de *Coccoloba barbadensis* presentes en la Estación de Biología de Chamela, Jalisco, presentaron cinco morfotipos de agallas con diferentes características estructurales y especies de insectos asociados a éstas pertenecientes a los órdenes Lepidoptera, Diptera e Hymenoptera.
- 2.) A lo largo de la temporada de muestreo en época de secas en la Estación (marzo-mayo 2013), el número de agallas presentes en los árboles fue constante hasta mediados de abril. Posterior a esta fecha, independientemente del tipo de agalla, la cantidad de agallas registradas aumentó considerablemente. Esto refleja la estrategia de forma de vida de los dípteros agalleros (IB), posibles inductores de las agallas de *Coccoloba barbadensis*, donde la larva madura no abandona la agalla, pero la agalla se desprende y cae al suelo, generalmente a comienzos del verano o finalizando el otoño y entonces emergen los adultos.
- 3.) De los cinco morfotipos de agallas encontrados, el 35% correspondió al morfotipo 1, el cual se encontró en la mayoría de los árboles y las hojas examinados. El 32% correspondió al morfotipo 4, que a pesar de no registrarse en todos los árboles muestreados fue muy abundante en las hojas en las que se presentó. Los morfotipos 2 y 3 fueron menos frecuentes tanto en las hojas como en los árboles muestreados. El morfotipo 5 se observó raramente.
- 4.) De acuerdo con la delimitación de especies con base en secuencias de ADN tanto de ejemplares adultos como de larvas y pupas, se registraron siete especies de Díptera de la familia Cecidomyiidae, así como 25 especies de himenópteros pertenecientes a las familias Platygasteridae (6 spp.), Braconidae (1 sp.); Eulophidae (10 spp.); Eurytomidae (7 spp.) y Torymidae (1 sp.). Los individuos de Lepidoptera solo quedaron asignados a la categoría taxonómica de Orden.
- 5.) De acuerdo con la información obtenida, al menos cuatro de los cinco diferentes tipos de agallas podrían ser inducidos por dípteros cecidómidos debido a que: 1) en este grupo sus especies se caracterizan por ser en su mayoría inductores de agallas; 2) las larvas de cecidómidos fueron siempre las más abundantes en los cinco morfotipos de agallas; 3) en dos morfotipos de agallas se encontraron exuvias de dípteros, los cuales emergen de éstas en el momento en que pasan a su fase adulta; y

- (4) los dípteros cecidómidos fueron el único taxón presente en todos los tipos de agalla.
- 6.) El empleo de herramientas moleculares (secuencias de ADN mitocondrial) permitió corroborar y complementar la identificación morfológica de los ejemplares adultos obtenidos y asociarlos con las larvas y pupas obtenidas de las agallas.
- 7.) De acuerdo con el conocimiento biológico de los taxones recolectados en el sistema, los dípteros cecidómidos se reconocen principalmente como inductores de agallas. De las familias de Hymenoptera encontradas en el estudio, las especies de Platygastriidae (6 spp.) son generalmente endoparasitoides koinobiontes de huevos y larvas de cecidómidos agalleros; Eurytomidae (7 spp.) se caracteriza por ser idiobionte endoparasítico solitario de insectos formadores de agallas; las especies de Torymidae (1 sp.) presentan algunas especies ectoparasitoides de dípteros e himenopteros inductores de agallas; los miembros de *Allorhogas* (Braconidae; 1 sp.) tienen especies parasitoides o inquilinas que se alimentan del tejido de las agallas inducidas por cecidómidos, aunque también hay inductores de agallas; y Eulophidae (10 spp.) presenta endoparasitoides solitarios de larvas y pupas de los cecidómidos agalleros, inductores de agallas así como hiperparasitoides de especies de Chalcidoidea e Ichneumonoidea (Hymenoptera).
- 8.) Aunque esta investigación es una primera aproximación al estudio integral de la complejidad estructural, taxonómica y funcional de la comunidad de insectos asociados a agalla de las hojas de *C. barbadensis* en la región de Chamela, sienta una base para posteriores estudios enfocados a: conocer con mayor precisión la función de cada una de las especies involucradas en el sistema con el fin de tener claridad respecto a las interacciones tróficas que suceden en las hojas de esta planta; estudiar la respuesta química de la planta al momento de ser atacada por los inductores de agallas y sus inquilinos; establecer con mayor claridad quienes son los responsables de la inducción de agallas en esta planta y si éstas sufren modificaciones morfológicas posteriores, entre otras posibilidades.

LITERATURA CITADA

- Altschup, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology* 215, 403–410.
- Andresen, E. (2012) Dispersión de semillas por animales frugívoros y granívoros. En: E. del Val y K. Boege K (Eds.), *Ecología de las Interacciones Bióticas*. México, pp. 275 FCE.
- Anjen, L., Bojian, B., Grabovskaya-Borodina, A.E., Hong, S., McNeill, J., Mosyakin, S.L., Ohba, H. & Park, C. (2003) Polygonaceae. En: *Flora of China*, pp. 277–350.
- Arthur, A. (1961) The cleptoparasitic habits and the immature stages of *Eurytoma pini* Bugbee (Hymenoptera: Chalcididae), a parasite of the European pine shoot moth, *Rhyacionia buoliana* (Schiff.) (Lepidoptera: Olethreutidae). *The Canadian Entomologist* 93:655–660.
- Askew, R.R. (1961) A study of the biology of species of the genus *Mexopolobus* Westwood (Hymenoptera: Pteromalidae) associated with cynipid galls on oak. *Transactions of the Royal Entomological Society of London*, 155–173.
- Askew, R.R. (1965) The biology of the British species of the genus *Torymus* Dalman (Hymenoptera: Torymidae) associated with galls of Cynipidae (Hymenoptera) on oak, with special reference to alternation of forms. *Transactions of the Society for British Entomology* 16:217–232.
- Askew, R.R. (1984) The biology of gall wasps. En: *The Biology of Gall Insects*.
- Austin, A.D. & Dangerfield, P.C. (1998) Biology of *Mesostoa kerri* (Insecta: Hymenoptera: Braconidae: Mesostoinae), an endemic Australian wasp that causes stem galls on *Banksia marginata*. *Australian Journal of Botany* 46, 559.
- Barraclough, T.G. (2010) Evolving entities: towards a unified framework for understanding diversity at the species and higher levels. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 365, 1801–1813.
- Bascompte, J. (2007) Networks in ecology. *Basic and Applied Ecology* 8, 485–490.
- Basset, Y., Novotny, V., Miller S.E. & Kitching, R.L. (2003) Arthropods of tropical forests: spatio-temporal dynamics and resource use in the canopy. *Smithsonian Tropical Research Institute*. Balboa, Ancon, Ciudad de Panamá, Panamá, pp.474.
- Beekman, M. & Oldroyd, B. P. (2008) When workers disunite: Interspecific parasitism by eusocial bees. *Annual Review of Entomology* 53, 19–37.

- Begon, M., & Harper, L. (1996) *Ecología de Individuos, Poblaciones y Comunidades*. Blackwell Science. United States.
- Belsky, A.J., Carson, W.P., Jensen, C.L. & Fox, G. (1993). Overcompensation by plants: herbivore optimization or red herring. *Evolutionary Ecology* 7, 109–121.
- Boege, K., & Carmona, D. (2012) Interacciones entre múltiples especies. En: E. del Val y K. Boege (Eds.), *Ecología de las Interacciones Bióticas*. México, pp. 275 FCE.
- Bouckaert, R., Heled, J., Kühnert, D., Vaughan, T., Wu, C.H., Xie, D., Suchard, M. a., Rambaut, A. & Drummond, A.J. (2014) BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. *PLoS Computational Biology* 10, 1–6.
- Bugbee, R.E. (1971) A new species of Arizona *Eurytoma phytophagous* in *Ceanothus greggii* seeds. *Journal of the Kansas Entomological Society* 44, 111–112.
- Bugbee, R.E. (1975) *Eurytoma* species from Mexico and Guatemala with synonyms and keys (Hymenoptera: Eurytomidae). *Annals of the Entomological Society of America* 68, 251–256.
- Buhl, P.N. (2014) New species and new records of platygastrinae and sceliotrachelinae from Togo (Hymenoptera: Platygastridae). *African Invertebrates* 55, 67–117.
- Burks, R.A., Heraty, J.M., Gebiola, M. & Hansson, C. (2011) Combined molecular and morphological phylogeny of Eulophidae (Hymenoptera: Chalcidoidea), with focus on the subfamily Entedoninae. *Cladistics* 27, 581–605.
- Burns, J.M., Janzen, D.H., Hajibabaei, M., Hallwachs, W. & Hebert, P.D.N. (2008) DNA barcodes and cryptic species of skipper butterflies in the genus *Perichares* in Area de Conservacion Guanacaste, Costa Rica. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 6350–6355.
- Cagnolo, L. & Valladares, G. (2011) Fragmentación del hábitat y desensamble de redes tróficas. *Ecosistemas* 20, 68–78.
- Campbell, B., Heraty, J., Rasplus, J., Chan, K., Steffen-Campbell, J. & Babcock, C. (2000) Molecular systematics of the Chalcidoidea using 28S-D2 rDNA, pp 59-71 En: A. Austin y M. Dowton. (Eds.), *Hymenoptera: Systematics, biodiversity and biocontrol*. CSIRO Publishing, Australia.
- Castillejos Cruz, C. & Solano, E. (2008) Familia Polygonaceae. En: J. Rzedowski and G. C. de Rzedowski (Eds), *Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes*. México, pp. 241–250.
- Cattin, M.F., Bersier, L.F., Banasek-Richter, C., Baltensperger, R. & Gabriel, J.P. (2004) Phylogenetic constraints and adaptation explain food-web structure. *Nature* 427, 835–839.

- Ceccarelli, F.S., Sharkey, M.J. & Zaldívar-Riverón, A. (2012) Species identification in the taxonomically neglected, highly diverse, neotropical parasitoid wasp genus *Notiospathius* (Braconidae: Doryctinae) based on an integrative molecular and morphological approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62, 485–95.
- Centrella, M.L. & Shaw, S.R. (2010) A new species of phytophagous braconid *Allorhogas minimus* (Hymenoptera: Braconidae: Doryctinae) reared from fruit galls on *Miconia longifolia* (Melastomataceae) in Costa Rica. *International Journal of Tropical Insect Science* 30, 65–68.
- Chavarría, L., Hanson, P., Marsh, P. & Shaw, S. (2009) A phytophagous braconid, *Allorhogas conostegia* sp. nov. (Hymenoptera: Braconidae), in the fruits of *Conostegia xalapensis* (Bonpl.) D. Don (Melastomataceae). *Journal of Natural History* 43, 2677–2689.
- Coley, P.D. & Barone, J. a. (1996) Herbivory and plant defenses in tropical forests. *Annual Review of Ecology and Systematics* 27, 305–335.
- Cox, A.J. & Hebert, P.D.N. (2001) Colonization, extinction, and phylogeographic patterning in a freshwater crustacean. *Molecular Ecology* 10, 371–386.
- Crespi, B. & Worobey, M. (1998) Comparative analysis of gall morphology in Australian gall thrips: the evolution of extended phenotypes. *Evolution* 52, 1686–1696.
- Crespi, B.J., Carmean, D.A. & Chapman, T.W. (1997) Ecology and evolution of galling thrips and their allies. *Annual Review of Entomology* 42, 51–71.
- Dangerfield, P.C. & Austin, A.D. (1998) Biology of *Mesostoa kerri* (Insecta: Hymenoptera: Braconidae: Mesostoinae), an endemic Australian wasp that causes stem galls on *Banksia marginata*. *Australian Journal of Botany* 46, 559–569.
- del Val, E. & Boege, K (Eds) *Ecología de las Interacciones Bióticas*. México, pp. 275 FCE.
- Drummond, A.J., Ho, S.Y.W., Phillips, M.J. & Rambaut, A. (2006) Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biology* 4, 699–710.
- Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D. & Rambaut, A. (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution* 29, 1969–1973.
- Espírito-Santo, M.M., Faria, M.L. & Fernandes, G.W. (2004) Parasitoid attack and its consequences to the development of the galling psyllid *Baccharopelma dracunculifoliae*. *Basic and Applied Ecology* 5, 475–484.
- Fernández, G.W., Lara, A.F. & Price, P.W. (1993) The geography of galling insects and the mechanisms that result in patterns. En: P.W. Price., W. J. Mattson. & Y. N.

Baranchikov (Eds.) *The ecology and evolution of galls forming insects*. General Technical Report NC 174. USDA Forest Service, Minnesota, USA.

Fernández, G.W., Lara, A.F. & Price, P.W. (1994) The geography of galling insects and the mechanisms that result in patterns. En: P.W. Price., W. J. Mattson. & Y. N. Baranchikov (Eds.) *The ecology and evolution of gall forming insects*. General Technical Report NC-174. United States Department of Agriculture, North Carolina, USA.

Fernández, G.W., Gonçalves-Alvim, S. J. & Carneiro, M.A.A. (2005) Habitat-driven effects on the diversity of gall-inducing insects in the Brazilian cerrado, pp. 693-708. En: Raman, A., C.W. Schaefer, T. M. Withers (Eds), *Biology, ecology, and evolution of gall-inducing arthropods*. Science Publishers. United States of America. Volume 1 y 2.

Fernández, F. & Sharkey, M.J. (2006) *Introducción a los Hymenoptera de la Región Neotropical*. F. Fernández and M. J. Sharkey (Eds). Sociedad Colombiana de Entomología, Colombia.

Fernández-Flores, S., Fernández-Triana, J.L., Martínez, J.J. & Zaldívar-Riverón, A. (2013) DNA barcoding species inventory of *Microgastrinae* wasps (Hymenoptera, Braconidae) from a Mexican tropical dry forest. *Molecular Ecology Resources* 13, 1146–1150.

Fernández-García, R.M. (2012) Departamento de Zoología y Antropología Física (Oligochaeta, Lumbricidae): Filogeografía, Filogenia y Biología Reproductiva. Universidad Complutense de Madrid.

Flinn, P.W., Hower, A.A. & Knievel, D.P. (1990) Physiological response of alfalfa to injury by *Empoasca fabae* (Homoptera: Cicadellidae). *Environmental Entomology* 19, 176–181.

Florentine, S.K., Raman, A. & Dhileepan, K. (2005) Effects of gall induction by *Epiblema strenuana* on gas exchange, nutrients, and energetics in *Parthenium hysterophorus*. *BioControl* 50, 787–801.

Flores, S., Nassar, J.M. & Quicke, D.L.J. (2005) Reproductive phenology and pre-dispersal seed-feeding in *Protium tovarense* (Burseraceae), with a description of the first known phytophagous “*Bracon*” species (Hymenoptera: Braconidae: Braconinae). *Journal of Natural History* 39, 3663–3685.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R. (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3, 294–9.

- Fontaneto, D., Herniou, E. a., Boschetti, C., Caprioli, M., Melone, G., Ricci, C. & Barraclough, T.G. (2007) Independently evolving species in asexual bdelloid rotifers. *PLoS Biology* 5, 914–921.
- Frye, A.S.L. & Kron, K.A. (2003) rbcL Phylogeny and character evolution in Polygonaceae. *Systematic Botany* 28, 326–332.
- Fujisawa, T., Barraclough, T.G. & Campus, S.P. (2013) Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent (GMYC) Approach : A revised method and evaluation on simulated Datasets. 44, 1–49.
- Fujita, M.K., Leaché, A.D., Burbrink, F.T., McGuire, J. a. & Moritz, C. (2012) Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution* 27, 480–488.
- Gagné, R.J. (1981) Cecidomyiidae. En: J.F. McAlpine., B.V. Peterson., G.E. Shewell., H.J. Teskey., J.R. Vockeroth. & D.M. Wood. (Eds) *Manual of Nearctic Diptera*. Research Branch Agricultura Canada. Monograph No. 27.
- Gagné, R.J. (2010) *Update for a Catalog of the Cecidomyiidae (Diptera) of the World*. Systematic Entomology Laboratory, Agriculture Reserch Service, U. S. Departament of Agriculture U. S. National Museum NHB 168, P. O. Box 37012, Washington, DC 20013- 7012 USA.
- Gahan, A.B. (1912) Descriptions of two new genera and six new species of parasitic Hymenoptera. *Proceedings of the Entomological Society of Washington* 14, 2–8.
- Gates, M. & Hanson, P.E. (2006) Familia Eurytomidae. En: P.E. Hanson, & I.D Gauld. *Hymenoptera de la Región Neotropical*. Memoirs of the American Entomological Institute. Vol 77.
- Gates, M. & Delvare, G. (2008) A new species of *Eurytoma* (Hymenoptera: Eurytomidae) attacking *Quadrastichus* spp. (Hymenoptera: Eulophidae) galling *Erythrina* spp. (Fabaceae), with a summary of African *Eurytoma* biology and species checklist. *Zootaxa* 24, 1–24.
- Gaxiola, A. & Armesto, J.J. (2012) Competencia. En: E. del Val y K. Boege K (Eds.), *Ecología de las Interacciones Bióticas*. México, pp. 275 FCE.
- Gibbons, S.M., Schwartz, T., Fouquier, J., Mitchell, M., Sangwan, N., Gilbert, J. A. & Kelley, S.T. (2015) Ecological succession and viability of human-associated microbiota on restroom surfaces. *Applied and Environmental Microbiology* 81, 765–773.
- Godfray, H. (1994) *Parasitoids: Behavioral and Evolutionary Ecology*. Princenton University Press. New Jersey.

- Gómez, J.F., Hernández-Nieves, M., Garrido-Torres, A.M., Askew, R.R. & Nieves-Aldrey, J.L. (2006) Los Chalcidoidea (Hymenoptera) asociados con agallas de cinípidos (Hymenoptera: Cynipidae) en la comunidad de Madrid. *Graellsia*. Número Extraordinario, 293-331.
- Gotelli, N. (2008) *A Primer of Ecology*. University of Vermont. 291pp.
- Gómez, J.F., Nieves, M.H., Torres, A.M.G., Askew, R.R. & Nieves-Aldrey, J.L. (2006) Los Chalcidoidea (Hymenoptera) asociados con agallas de Cinípidos (Hymenoptera, Cynipidae) en la Comunidad de Madrid. *Graellsia* 62, 293–331.
- Goulet, H. & Huber, J. t (1993) *Hymenoptera of the world: An identification guide to families*. G. Henri and H. J. T (Eds).
- Graham, M.W.R. de V. (1991) A reclassification of the European Tetrastichinae (Hymenoptera: Eulophidae): revision of the remaining genera. *Memoirs of the American Entomological Institute* 49: 1-322.
- Gumovsky, A., Polaszek, A., Murphy, S.T., Rabbi, M.F. & Zhu, C.D. (2006) *Closterocerus oryzamyntor* (Hymenoptera: Eulophidae: Entedoninae), a larval parasitoid of the rice hispa *Dicladispa armigera* in Bangladesh (Coleoptera: Chrysomelidae: Hispinae). *Zootaxa* 59, 51–59.
- Hanson, P.E. & Gauld I.D. (2006) *Hymenoptera de la Región Neotropical*. Memoirs of the American Entomological Institute. Vol 77.
- Hartel, S., Neumann, P., Raassen, F.S., Moritz, R.F.A. & Hepburn, H.R. (2006) Social parasitism by cape honeybee workers in colonies of their own subspecies (*Apis mellifera capensis* Esch). *Insectes Sociaux* 53,183–93.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. & deWaard, J.R. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* 270, 313–21.
- Hebert, P.D.N., Penton, E.H., Burns, J.M., Janzen, D.H. & Hallwachs, W. (2004) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 14812–7.
- Herrera, C.M., & Pellmyr, O. (Eds) (2002) *Plant- animal interactions: An evolutionary approach*. Blackwell Publishing. Oxford.
- Hreck, J., Miller, S., Quicke, D. & Smith, A. (2011) Molecular detection of trophic links in a complex insect host- parasitoid food web. *Molecular Ecology Resources* 11, 786–794.

- Holway, D. a. (1999) Competitive mechanisms underlying the displacement of native ants by the invasive argentine ant. *Ecology* 80, 238–251.
- Howard, R.A. (1949) The genus *Coccoloba* in Cuba. *Journal of the Arnold Arboretum* 30, 388–424.
- Hreck, J., Miller, S.E., Quicke, D.L.J. & Smith, M.A. (2011) Molecular detection of trophic links in a complex insect host-parasitoid food web. *Molecular Ecology Resources* 11, 786–94.
- Huson, D., Mitra, S. & Ruscheweyh, H. (2011) Integrative analysis of environmental sequences using MEGAN4. *Genome* 21, 1552–1560.
- Huson, D.H. & Mitra, S. (2012) Introduction to the analysis of enviromental sequences: Metagenomic with MEGAN. En: *Evolutionary Genomics: Statistical and Computational Methods*. , pp. 415–429.
- Inbar, M., Wink, M. & Wool, D. (2004) The evolution of host plant manipulation by insects: molecular and ecological evidence from gall-forming aphids on *Pistacia*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 32, 504–11.
- Jones, M., Ghoorah, A. & Blaxter, M. (2011) jMOTU and taxonator: Turning DNA barcode sequences into annotated operational taxonomic units. *PLoS ONE* 6.
- Julião, G.R., Fernandes, G.W., Negreiros, D., Bedê, L. & Araújo, R.C. (2005) Insetos galhadores associados a duas espécies de plantas invasoras de áreas urbanas e peri-urbanas. *Revista Brasileira de Entomologia* 49, 97–106.
- Jurado-Rivera, J. a, Vogler, A.P., Reid, C. a M., Petitpierre, E. & Gómez-Zurita, J. (2009) DNA barcoding insect-host plant associations. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* 276, 639–48.
- Kaartinen, R., Stone, G.N., Hearn, J., Lohse, K. & Roslin, T. (2010) Revealing secret liaisons: DNA barcoding changes our understanding of food webs. *Ecological Entomology* 35, 623–638.
- Kim, W., Yukawa, J., Harris, K.M., Minami, T., Matsuo, K. & Skrzypczynska, M. (2014) Description, host range and distribution of a new *Macrodiplosis* species (Diptera: Cecidomyiidae) that induces leaf-margin fold galls on deciduous *Quercus* (Fagaceae) with comparative notes on Palaearctic congeners. *Zootaxa* 3821, 222–238.
- Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16, 111–120.

- Kolesik, P. (1993) Basic bionomics of the lentil gall midge (*Contarinia lentis* Aczel) (Diptera, Cecidomyiidae) *Journal of Applied Ecology* 116, 371–380.
- Larson, K.C. (1998) The impact of two gall-forming arthropods on the photosynthetic rates of their hosts. *Oecologia* 115, 161–166.
- La Salle, J. (1994) North American genera of Tetrastichinae (Hymenoptera: Eulophidae). *Journal of Natural History* 28, 109–236.
- La Salle, J. (2005) Biology of gall inducers and evolution of gall induction in Chalcidoidea (Hymenoptera: Eulophidae, Eurytomidae, Pteromalidae, Tanaostignatidae, Torymidae). En: Raman, A., C.W. Schaefer, T. M. Withers (Eds), *Biology, ecology, and evolution of gall-inducing arthropods*. Science Publishers. United States of America. Volume 1 y 2.
- Lotfalizadeh, H., Delvare, G. & Rasplus, J.Y. (2007) Phylogenetic analysis of Eurytominae (Chalcidoidea: Eurytomidae) based on morphological characters. *Zoological Journal of the Linnean Society* 151, 441–510.
- Lynch, M. & Jarrell, P.E. (1993) A method for calibrating molecular clocks and its application to animal mitochondrial DNA. *Genetics* 135, 1197–1208.
- Macêdo, M. V, Pimentel, M.C.P. & Vieira, R.C. (1998) Response of *Pithecellobium tortum* Martius (Leguminosae) seeds to the attack of the phytophagous Braconid *Allorhogas dyspistus* Marsh (Hymenoptera: Braconidae). *Journal of Hymenoptera Research* 7, 274–279.
- Maddison, W.P. & Knowles, L.L. (2006) Inferring phylogeny despite incomplete lineage sorting. *Systematic Biology* 55, 21–30.
- Martínez, J.J. & Zaldívar-Riverón, A. (2013) Seven new species of *Allorhogas* (Hymenoptera: Braconidae: Doryctinae) from Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 84, 117–139.
- Masner, L. & Huggert, L. (1989) World review and keys to genera of the family Inostemmatinae with reassignment of the taxa to the Platygastriinae and Sceliotrachelinae (Hymenoptera: Platygastriidae). *Memoirs of the Entomological Society of Canada* 147, 214pp.
- Masner, L. (1993) Superfamily Platygastroidea, pp. 558-565. En: H. Goulet, & Huber J.T (Eds) *Hymenoptera of the world: An identification guide to families*. Agriculture Canada, Publication 1894/E, Ottawa.
- McCormack, J.E., Huang, H. & Knowles, L.L. (2009) Maximum likelihood estimates of species trees: How accuracy of phylogenetic inference depends upon the divergence history and sampling design. *Systematic Biology* 58, 501–508.

- Medianero, E., Paniagua, M. & Castaño-Meneses, G. (2010) Comparación temporal de la riqueza y composición de insectos inductores de agallas en el dosel de un bosque tropical. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 81, 465–472.
- Miller, D.G. (2005) Ecology and radiation of galling aphids (*Tamalia*; Hemiptera: Aphididae) on their host plants (Ericaceae). *Basic and Applied Ecology* 6, 463–469.
- Miller, W.E. (2000) A comparative taxonomic-natural history study of eight Nearctic species of *Gnorimoschema* that induce stem galls on Asteraceae, including descriptions of three new species (Lepidoptera: Gelechiidae). *Entomological Society of America, Thomas Say Publications in Entomology: Monographs*. Lanham, Maryland, USA.
- Miller, W.E. (2005) Gall-inducing Lepidoptera. En: Raman, A., C.W. Schaefer, T. M. Withers (Eds), *Biology, ecology, and evolution of gall-inducing arthropods*. Science Publishers. United States of America. Volume 1 y 2.
- Monaghan, M.T., Wild, R., Elliot, M., Fujisawa, T., Balke, M., Inward, D.J.G., Lees, D.C., Ranaivosolo, R., Eggleton, P., Barraclough, T.G. & Vogler, A.P. (2009) Accelerated species inventory on Madagascar using coalescent-based models of species delineation. *Systematic Biology* 58, 298–311.
- Montoya, J.M., Pimm, S.L. & Solé, R. V (2006) Ecological networks and their fragility. *Nature* 442, 259–64.
- Morris, D.I. (2009) Polygonaceae. En: M. F. Duretto (Ed), *Flora of Tasmania*. Herbarium, Tasmanian Gallery, Tasmanian Museum y Art, Tasmania, pp. 1–17.
- Nieves-Aldrey, J.L. (1998) Insectos que inducen la formación de agallas en las plantas: una fascinante interacción ecológica y evolutiva. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa* 23, 3–12.
- Nieves-Aldrey, J.L. (2001) Hymenoptera (Cynipidae). En: Nieves-Aldrey, J.L. *Fauna Ibérica*. Volumen 16. Museo Nacional de Ciencias Naturales. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid- España.
- Noguera, F.A., Vega J.H., García A.N. & Quesada, M. (2002) *Historia Natural de Chamela*. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Noyes J.S. 2003. Universal Chalcidoidea Database. World Wide Web electronic publication. www.nhm.ac.uk/entomology/chalcidoids/index.html
- Oldroyd, B.P., Smolenski, A.J., Cornuet, J.M. & Crozier, R.H. (1994). Anarchy in the beehive. *Nature* 371,749.
- Ollerstam, O., Rohfritsch, O., Hoglund, S. & Larsson, S. (2002) A rapid hypersensitive response associated with resistance in the willow *Salix viminalis* against the gall

- midge *Dasineura marginetorquens*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 102, 153–162.
- Olson, M. (2013) Polygonaceae, the buckwheat family. 2013.
- Papaj, D.R. & Lewis, A.C. (Eds) (1993) *Insect learning. Ecological and evolutionary perspectives*. Nueva York. Chapman y Hall, 398 pp.
- Paige, K.N. & Whitham, T.G. (2013) Overcompensation in response to mammalian herbivory: the advantage of being eaten. *The American Naturalist* 130, 526–543.
- Paquette, L.C., Bagatto, G. & Shorthouse, J.D. (1992) Distribution of mineral nutrients within the leaves of common dandelion (*Taraxacum officinale*) galled by *Phanacis taraxci* (Hymenoptera: Cynipidae). *Canadian Journal of Botany* 71, 1026–1031.
- Pauls, S.U., Blahnik, R.J., Zhou, X., Wardwell, C.T. & Holzenthal, R.W. (2010) DNA barcode data confirm new species and reveal cryptic diversity in Chilean *Smicridea* (*Smicridea*) (Trichoptera: Hydropsychidae). *Journal of the North American Benthological Society* 29, 1058–1074.
- Perioto, N.W., Lara, R., Ferreira, C.S., Rodrigo, D., Carmo, E., Linhares, H., Nais, J., Batist, R. & Rogério, S. (2011) A new phytophagous *Bracon* Frabricius (Hymenoptera, Braconidae) associated with *Protium ovatu* Engl. (Burseraceae) fruits from Brazilian savannah. *Zootaxa* 65, 59 – 65.
- Plantard, O., Rasplus, J.-Y. & Hochberg, M.E. (1996) Resource partitioning of parasitoids assemblage of the oak galler *Neuroterus quercusbaccarum* L. (Hymenoptera: Cynipidae). *Acta Ecologica* 17, 1–15.
- Pons, J., Barraclough, T.G., Gomez-Zurita, J. & Cardoso, A. (2006) Sequence-Based Species Delimitation for the DNA Taxonomy of Undescribed Insects. *Systematic Biology* 55, 595–609.
- Posada, D. (2004) *Collapse: describing haplotypes from sequence alignments*. Vigo, España: Universidad de Vigo.
- Price, P.W. (2005) Adaptive radiation of gall-inducing insects. *Basic and Applied Ecology* 6, 413–421.
- Price, P.W., Fernandes, W. & Waring, G.L. (1987) Adaptative Nature of Insect Galls. *Environmental Entomology* 16, 15–24.
- R Core Team, (2013) *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <http://www.R-project.org>

- Raman, A. (1994) Integration between gall- inducing insects and their host plants, pp. 249-276. En Ananthkrishnan T. N. (Ed) *Functional dynamics of phytophagous insects*. Oxford y IBH Publishing Company, Nueva Delhi. India.
- Raman, A. & Dhileepan, K. (1999) Qualitative evaluation of damage by *Epiblema strenuana* (Lepidoptera: Tortricidae) to the weed *Parthenium hysterophorus* (Asteraceae). *Annals of the Entomological Society of America* 92, 717–723.
- Raman, A & Withers, T.M. (2003) Oviposition by introduced *Ophelimus eucalypti* (Hymenoptera: Eulophidae) and morphogenesis of female-induced galls on *Eucalyptus saligna*(Myrtaceae) in New Zealand. *Bulletin of Entomological Research* 93, 55–63.
- Raman, A., Schaefer C.W. & Withers T.M. (2005) Galls and gall- inducing arthropods: An overview of their biology, ecology, and evolution, pp. 1-33. En: Raman, A., C.W. Schaefer, T. M. Withers (Eds), *Biology, ecology, and evolution of gall-inducing arthropods*. Science Publishers. United States of America. Volume 1.
- Raman, A., Schaefer, C.W. & Withers, T. M. (Eds), (2005) *Biology, ecology, and Evolution of gall-inducing arthropods*. Science Publishers. United States of America. Volume 1 y 2.
- Raman, A., Burckhardt, D. & Harris, K. (2009) Radiation in the gall-inducing Cecidomyiidae (Insecta Diptera) and Calophyidae (Insecta Hemiptera) on *Mangifera indica* (Anacardiaceae) in the Indian subcontinent. *Tropical Zoology* 22, 27–56.
- Raman, A. (2011) Morphogenesis of insect-induced plant galls: facts and questions. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 206, 517–533.
- Redfern, M. & Shirley, P. (2002) *British plant galls: Identification of galls on plants and fungi*. Field Studies. 10, 207–531.
- Rohfritsch, O. (1988) Food supply mechanism related to gall structure, the example of *Geocrypta galii* Lw. (Cecidomyiidae, Oligotrophini) on *Galium mollugo*. *Phytophaga* 2, 1–17.
- Rohfritsh, O. (1992) Patterns in gall development, pp. 60–86. En: J.D. Shorthouse y Rohfritsh, O. (Eds) *Biology of insect-induced galls*. Oxford University Press, Nueva York. USA.
- Rosenberg, H.T. (1934) The biology and distribution in france of the larval parasites of *Cydia pomonella*, L. *Bulletin of Entomological Research* 25, 201–256.
- Rougerie, R., Smith, M.A., Fernandez-Triana, J., Lopez-Vaamonde, C., Ratnasingham, S. & Hebert, P.D.N. (2011) Molecular analysis of parasitoid linkages (MAPL): gut contents of adult parasitoid wasps reveal larval host. *Molecular Ecology* 20, 179–86.

- Saccone, C., De Giorgi, C., Gissi, C., Pesole, G. & Reyes, A. (1999) Evolutionary genomics in Metazoa: The mitochondrial DNA as a model system. *Gene* 238, 195–209.
- Salvador-Figueras, M. (2003) Análisis de Correspondencias. [en línea] 5campus.com, Estadística [28 de abril de 2015].
- Santos de Araújo, W., Rebouças Julião, G., Araújo Ribeiro, B., Portes Abraham Silva, I. & Baptistados Santos, B. (2011) Diversity of galling insects in *Styrax pohlii* (Styracaceae): edge effect and use as bioindicators. *Revista de Biología Tropical* 59, 1589–97.
- Schonrogge, K., Stone, G.N. & Crawley, M.J. (1995) Spatial and temporal variation in guild structure - parasitoids and inquilines of *Andricus quercuscalicis* (Hymenoptera, Cynipidae) in its native and alien ranges. *Oikos* 72, 51–60.
- Schoonhoven, L.M., Jermy, T. & van Loon, J.J. (1998) *Insect-plant biology*. Chapman y Hall, Londres, Reino Unido.
- Shaw, S.R. (2006) Familia Braconidae. En: P.E. Hanson, & I.D Gauld. *Hymenoptera de la Región Neotropical*. Memoirs of the American Entomological Institute. Vol 77.
- Sheffield, C.S., Hebert, P.D.N., Kevan, P.G. & Packer, L. (2009) DNA barcoding a regional bee (Hymenoptera: Apoidea) fauna and its potential for ecological studies. *Molecular Ecology Resources* 9, 196–207.
- Shorthouse, J.D., Wool, D. & Raman, A. (2005) Gall-inducing insects – Nature’s most sophisticated herbivores. *Basic and Applied Ecology* 6, 407–411.
- Simmons, R.B. & Weller, S.J. (2001) Utility and evolution of cytochrome b in insects. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 20, 196–210.
- Smith, M.A., Eveleigh, E.S., McCann, K.S., Merilo, M.T., McCarthy, P.C. & Van Rooyen, K.I. (2011) Barcoding a quantified food web: crypsis, concepts, ecology and hypotheses. *PloS ONE* 6, e14424.
- StatSoft. (2010) Statistica version 12. <http://www.statsoft.com/>
- Stiling, P. & Rossi, A.M. (2014) Complex effects of genotype and environment on insect herbivores and their enemies. *Ecology* 77, 2212–2218.
- Stoeckle, M.Y. & Hebert, D.N. (2008) *Barcode of Life: Inspired by commercial barcodes, DNA tags could provide a quick, inexpensive way to identify species*. Scientific American, pp 82-88.

- Stone, G.N. & Cook, J.M. (1998) The structure of cynipid oak galls: patterns in the evolution of an extended phenotype. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 265, 979–988.
- Surekha, K. & LaSalle, J. (1995) An unusual new species of *Baryscapus* Förster (Hymenoptera: Eulophidae: Tetrastichinae) from North America. *Journal of the New York Entomological Society* 103(1), 78–82.
- Swofford, D.L. (2002) PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods). 4.0 beta. Sinauer Associates Inc. Duke University. 42, 294–307.
- Taíz, L. & Zeiger, E. (2006) *Plant Physiology*. Sunderland, Massachusetts. Sinauer, 792 pp.
- Talavera, G., Dinc, V. & Vila, R. (2013) Factors affecting species delimitations with the GMYC model : insights from a butterfly survey. *Methods in Ecology and Evolution*.
- Torralba, A. & Ocharan, F.J. (2003) Emergencia tardia y votinismo en *Sympetrum fonscolombi* (Odonate: Libellulidae). *Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa* 33, 279 – 280.
- Trejo, I. & Dirzo, R. (2000) Deforestation of seasonally dry tropical forest a national and local analysis in Mexico. *Biological Conservation* 94, 133–142.
- Triplehorn, C.A. & Johnson, N.F. (2005) *Study of Insects*. 7th Edition. T. B. Cole (Ed). United States of America.
- Uechi, N., Yukawa, J., Tokuda, M., Ganaha-Kikumura, T. & Taniguchi, M. (2011) New information on host plants and distribution ranges of an invasive gall midge, *Contarinia maculipennis* (Diptera: Cecidomyiidae), and its congeners in Japan. *Applied Entomology and Zoology* 46, 383–389.
- Uhler, L. (1951) Biology and ecology of the goldenrod gall fly, *Eurosta solidaginis* (Fitch). *Memoirs of the Cornell University Agricultural Experiment Station* 300,1-51.
- Vidal, S. (Ed) (1997) Determination List of Entomophagous Insects. No. 13. *Bulletin Section Regionale Ouest Palerctique*, Organisation Internationale de Lutte Biologique 20(2).
- Ward, R.D., Zemlak, T.S., Innes, B.H., Last, P.R. & Hebert, P.D.N. (2005) DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 360, 1847–1857.
- Wares, J.P. & Cunningham, C.W. (2001) Phylogeography and historical ecology of the North Atlantic intertidal. *Evolution* 55, 2455–2469.
- Wharton, R.A. & Hanson, P.E. (2005) Biology and evolution of braconid gall wasp (Hymenoptera) En: Raman, A., C.W. Schaefer, T. M. Withers (Eds), *Biology, ecology,*

and evolution of gall-inducing arthropods. Science Publishers. United States of America. Volume 1 y 2.

- Weis, A.E. (1993) Host gall size predicts host quality for the parasitoid *Eurytoma gigantea* (Hymenoptera: Eurytomidae), but can the parasitoid tell? *Journal of Insect Behavior* 6, 591–602.
- Wirta, H.K., Hebert, P.D.N., Kaartinen, R., Prosser, S.W., Várkonyi, G. & Roslin, T. (2014) Complementary molecular information changes our perception of food web structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 1885–90.
- Yegorenkova, E.N., Yefremova, Z. A., Strakhova, I.S. & Zotov, a. a. (2011) The parasitic wasp *Baryscapus crassicornis* (Erdös) (Hymenoptera, Eulophidae) developing in larvae of the weevil genus *Larinus germar* (Coleoptera, Curculionidae). *Entomological Review* 91, 889–897.
- Yukawa, J. (1987) Life history strategies of univoltine gall-making Cecidomyiidae (Diptera) in Japan. *Phytophaga* 1, 121–139.
- Yukawa, J. & Masuda, H. (1996) *Insect and mite galls of Japan in colors*. Zenkoku Noson Kyoiku Kyokai. Tokio. Japón.
- Yukawa, J. & Rohfritsch, O. (2005) Biology and ecology of gall-inducing Cecidomyiidae (Diptera). En: A. Raman, C. W. Schaefer, and T. M. Withers (Eds), *Biology, Ecology, and Evolution of Gall-inducing Arthropods*. United States of America, pp. 780.
- Zaldívar-Riverón, A., Martínez, J.J., Belokobylskij, S.A., Pedraza-Lara, C., Shaw, S.R., Hanson, P.E. & Varela-Hernández, F. (2014) Systematics and evolution of gall formation in the plant-associated genera of the wasp subfamily Doryctinae (Hymenoptera: Braconidae). *Systematic Entomology* 39, 633–659.
- Zhou, M.-J., Xiao, J.-H., Bian, S.-N., Li, Y.-W., Niu, L.-M., Hu, H.-Y., Wu, W.-S., Murphy, R.W. & Huang, D.-W. (2012) Molecular approaches identify known species, reveal cryptic species and verify host specificity of Chinese *Philotrypesis* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Molecular Ecology Resources* 12, 598–606.