



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES, UNIDAD MORELIA
BIOLOGÍA EVOLUTIVA

Diversidad y estructura genética de *Amphibolips michoacaensis* Nieves-Aldrey & Maldonado 2012 (Hymenoptera: Cynipidae) asociada a *Quercus castanea* Née 1801 (Fagales: Fagaceae).

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

DOHUGLAS ELISEO CASTILLEJOS LEMUS

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Alberto Ken Oyama Nakagawa
Escuela Nacional de Estudios Superiores, Unidad Morelia, UNAM.
COMITÉ TUTOR: Dr. Juan Servando Núñez Farfán
Instituto de Ecología, UNAM
Dr. Pablo Cuevas Reyes
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

MORELIA, MICHOACÁN. DICIEMBRE, 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES, UNIDAD MORELIA
BIOLOGÍA EVOLUTIVA

Diversidad y estructura genética de *Amphibolips michoacaensis* Nieves-Aldrey & Maldonado 2012 (Hymenoptera: Cynipidae) asociada a *Quercus castanea* Née 1801 (Fagales: Fagaceae).

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

DOHUGLAS ELISEO CASTILLEJOS LEMUS

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Alberto Ken Oyama Nakagawa
Escuela Nacional de Estudios Superiores, Unidad Morelia, UNAM.
COMITÉ TUTOR: Dr. Juan Servando Núñez Farfán
Instituto de Ecología, UNAM
Dr. Pablo Cuevas Reyes
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

MORELIA, MICHOACÁN. DICIEMBRE, 2016.



Lic. Ivonne Ramirez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 10 de octubre de 2016, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestro en Ciencias Biológicas del alumno **Castillejos Lemus Dohuglas Eliseo** con número de cuenta **515015610** con la tesis titulada: "**Diversidad y estructura genética de *Amphibolips michoacaensis* Nieves-Aldrey & Maldonado 2012 (Hymenoptera: Cynipidae) asociada a *Quercus castanea* Née 1801 (Fagales: Fagaceae)**" bajo la dirección del **Dr. Alberto Ken Oyama Nakagawa**:

Presidente:	Dr. Antonio González Rodríguez
Vocal:	Dr. Jorge Alberto Contreras Garduño
Secretario:	Dr. Pablo Cuevas Reyes
Suplente:	Dr. Hernando Alonso Rodríguez Correa
Suplente:	Dr. Juan Servando Núñez Farfán

Sin otro particular, quedo de usted.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a, 9 de noviembre de 2016

M. del Coro Arizmendi
Dra. Maria del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinadora del Programa



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico recibido para realizar estudios de posgrado.

Parte del financiamiento para la realización de la tesis es a través del proyecto DGAPA-PAPIIT-UNAM con número IV 201015.

A los miembros del comité tutor:

Dr. Alberto Ken Oyama Nakagawa

Dr. Juan Servando Núñez Farfán

Dr. Pablo Cuevas Reyes

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Al Dr. Ken Oyama por aceptarme y brindarme la oportunidad de ingresar al Posgrado como su alumno. También le agradezco la opción de elegir entre proyectos que me parecían interesantes, como propuestas, y la línea de investigación que él estaba desarrollando años atrás. Tampoco olvidaré las oportunidades y/o facilidades que me dio para lograr el proyecto planteado y sobrepasar sus alcances con nuevos conocimientos e ideas.

Al doctor Victor Rocha, técnico del Laboratorio de Ecología Genética y Molecular del IIES, UNAM. Su conocimiento, ayuda y consejos fueron cruciales para adaptarme al trabajo en el laboratorio y para sacar adelante el proyecto cuando los problemas se presentaban.

Al M. en C. Jesús Llanderal, técnico del Laboratorio de Ecología Genética y Molecular por su ayuda con algunas pruebas durante mi estancia y sus consejos con algunos análisis de datos.

Al doctor Hernando Rodríguez Correa, académico de la ENES Unidad Morelia, por su apoyo con la explicación de varios de los análisis y mapas, también por el tiempo invertido en el proyecto y algunos consejos.

A la doctora Yurixhi Maldonado por proporcionarme datos necesarios para la culminación del proyecto.

A todos los que me ofrecieron su amistad en Morelia, alumnos y miembros del Laboratorio de Ecología Genética y Molecular y de otros laboratorios y/o instituciones que también han sido grandes compañeros y amistades durante mis estudios de maestría. Intentar colocar todos sus nombres aquí me resultaría imposible, igualmente les agradezco a todos su amistad y apoyo.

Al doctor Mauricio Quesada por sus consejos y opiniones siempre tan acertadas. Aquí incluyo a su técnico, Biól. Gumersindo Sánchez, por su apoyo en las ocasiones en que necesité su ayuda.

A todos los doctores que a lo largo de mi formación durante la maestría aportaron ideas, conocimientos y experiencias. Igualmente tratar de nombrarlos provocaría omisiones y prefiero agradecerles de forma generalizada.

A los miembros de mi comité tutor por sus aportes durante cada semestre para que el trabajo mejorara. Sus sugerencias siempre fueron importantes para mí.

A los miembros del jurado por su apoyo y críticas al escrito.

A Dolores Rodríguez por su ayuda en innumerables ocasiones durante la maestría en aspectos que en ocasiones iban más allá de los trámites relacionados con el posgrado.

A mis amigos y familiares. Aunque son pocos y están lejos, su apoyo moral y/o económico han resultado de gran importancia para mí. Muchas gracias por creer y confiar en mí.

A Darío y Alejandra por tenerme paciencia durante mis ausencias y distracciones, ustedes son una motivación constante para alcanzar mis metas.

DEDICATORIA

A Darío y Alejandra, gracias por estar conmigo en esta aventura.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	3
I. INTRODUCCIÓN	5
II. OBJETIVOS.....	9
<i>II.1 General</i>	9
<i>II.2 Específicos</i>	9
III. ANTECEDENTES	10
<i>III.1 La familia Cynipidae</i>	10
<i>III.2 Cynipidae y sus relaciones a través de las filogenias</i>	13
<i>III.3 Historia Natural de la tribu Cynipini</i>	16
<i>III.4 Agallas y su significancia adaptativa</i>	18
<i>III.5 Cynipoidea en la región Neotropical y en México</i>	20
<i>III.6 El género Quercus y Q. castanea</i>	21
<i>III.7 Procesos asociados con las diferencias genéticas en Cynipidae</i>	22
<i>III.7.1 Condiciones de la planta huésped</i>	23
<i>III.7.2 Especies crípticas</i>	25
<i>III.7.3 Capacidades de desplazamiento</i>	25
<i>III.7.4 Parasitoides: selección de huéspedes</i>	29
<i>III.7.5 Presencia de Wolbachia</i>	31
<i>III.8 El género Amphibolips y A. michoacaensis</i>	32
IV. METODOLOGÍA.....	35
<i>IV.1 Muestreo</i>	35
<i>IV.2 Métodos moleculares</i>	37
<i>IV.2.1 Extracción de ADN</i>	37

<i>IV.2.2 Selección de genes.</i>	37
<i>IV.2.3 Amplificación por PCR: citocromo B.</i>	37
<i>IV.2.4 Amplificación por PCR: ITS 2.</i>	38
<i>IV.2.5 Secuenciación.</i>	38
IV.3 Análisis de datos.	39
<i>IV.3.1 Diversidad y diferenciación genética.</i>	39
<i>IV.3.2 Relaciones evolutivas.</i>	40
<i>IV.3.3 Relación entre diversidad genética con características del hábitat o distancias geográficas.</i>	40
V. RESULTADOS	41
VI. DISCUSIÓN	49
VII. CONCLUSIONES	59
VIII. LITERATURA CITADA	61

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Ubicación de la Cuenca del Cuitzeo y puntos que señalan los muestreos realizados	36
Figura 2. Red de haplotipos, frecuencia y ubicación geográfica de 96 individuos de <i>A. michoacaensis</i> en la Cuenca del Cuitzeo con citocromo B	41
Figura 3. Red de haplotipos, frecuencia y ubicación geográfica de 105 individuos de <i>A. michoacaensis</i> en la Cuenca del Cuitzeo con ITS 2	42
Figura 4. Índice de Moran para 96 individuos de <i>A. michoacaensis</i> en la Cuenca del Cuitzeo con citocromo B	48
Figura 5. Índice de Moran para 105 individuos de <i>A. michoacaensis</i> en la Cuenca del Cuitzeo con ITS2	48
Tabla 1. Características más distintivas, características únicas, familia de planta huésped ^a y distribución para cada tribu reconocida actualmente para la familia Cynipidae	11
Tabla 2. Valores de diversidad nucleotídica y haplotípica para citocromo B e ITS2 de <i>A. michoacaensis</i> en la Cuenca del Cuitzeo.	43
Tabla 3. Análisis Molecular de Varianza para citocromo B de <i>A. michoacaensis</i> en la Cuenca del Cuitzeo	45
Tabla 4. Análisis Molecular de Varianza para ITS2 de <i>A. michoacaensis</i> en la Cuenca del Cuitzeo	45
Tabla 5. Valores de diversidad nucleotídica y haplotípica considerando a cada categoría de uso de suelo / vegetación como una agrupación para citocromo B (a) e ITS2 (b) de <i>A. michoacaensis</i> en la Cuenca del Cuitzeo	47

RESUMEN

Un aspecto de gran relevancia es entender las interacciones bióticas y cómo estas influyen en la dinámica de las poblaciones naturales. El parasitismo ha sido considerado tan importante que en ocasiones se trata como una categoría independiente de interacción. En este sentido, los insectos formadores de agallas se catalogan como macroparásitos de plantas y tienen la capacidad de alterar el crecimiento normal de algunas estructuras de sus plantas huéspedes, con resultados diversos sobre su sobrevivencia y promoviendo alta especificidad entre el parásito y su huésped. En este estudio se realizó un análisis de la diversidad y estructura genética de una especie de avispa agallera recientemente descrita para la Cuenca del Cuitzeo (*Amphibolips michoacaensis*) con un marcador mitocondrial, citocromo B, y otro nuclear, ITS 2. Es la primera ocasión en que se analiza la diversidad genética de una especie mexicana de la familia Cynipidae, lo que significa un gran avance en su estudio teniendo en cuenta tanto la diversidad de especies huéspedes posibles (principalmente del género *Quercus*), el número de especies descritas actualmente de estas avispas (≈ 183 especies) y su escaso estudio fuera del ámbito taxonómico en el país. En el estudio de 106 individuos, los resultados indican que el área de muestreo presenta altos niveles de diversidad genética para *A. michoacaensis*, quizás destacando la importancia de la región para esta especie de cinípido. Para citocromo B ningún análisis mostró un patrón geográfico de la diversidad genética, mientras que para ITS 2, se encontró estructura genética y amplia dominancia de un haplotipo a través de la Cuenca. Los resultados de ambos marcadores sugieren que la distribución de la especie es mayor de lo que se contempló cuando se hizo la descripción, y teniendo en cuenta la amplia distribución del encino huésped (*Quercus castanea*), es probable que incluya muchas regiones fisiográficas diferentes en lugar de sólo estar en la Cuenca del Cuitzeo. Por otro lado, los resultados también apuntan a un alto flujo génico para la especie, de tal modo que la capacidad de dispersión aparentemente es alta y las distancias consideradas en el estudio de la Cuenca son relativamente accesibles para los individuos adultos. Esto destaca diversos aspectos interesantes con respecto al futuro de los estudios con esta especie de

avispa (y de la familia en general), por ejemplo, evaluar si la distribución de la especie corresponde a la distribución de su huésped o si esta avispa podría ubicarse en otras especies cercanas de huéspedes que suelen formar híbridos con el huésped conocido, lo que implicaría una distribución geográfica aún mayor.

ABSTRACT

One aspect of great importance is to understand biotic interactions and how these influence the dynamics of natural populations. Parasitism has been considered so important that it is treated as a separate category of interaction sometimes. In this sense, gall inducing insects are classified as macroparasites of plants and have the ability to alter the normal growth of some structures of their host plants, with mixed results on their survival and promoting high specificity between the parasite and its host. In this study an analysis of diversity and genetic structure of a species of gall wasp recently described for the Cuitzeo Basin (*Amphibolips michoacaensis*) was performed with a mitochondrial marker, cytochrome B, and a nuclear marker, ITS 2. It is the first time that the genetic diversity of a Mexican species of the Cynipidae family is analyzed, which means a breakthrough in the study of these insects, taking into account both the diversity of possible hosts species (mainly *Quercus* genus), the number of currently described species of these wasps (≈ 183 species) and its scarce study outside the taxonomic scope in the country. In the study of 106 individuals, the results indicate that the sampling area present high levels of genetic diversity for *A. michoacaensis*, perhaps highlighting the importance of the region for this kind of cinipid. For cytochrome B no analysis showed a geographical pattern of genetic diversity, while for the ITS 2, we found genetic structure and a wide dominance of a haplotype across the Basin. The results of both markers suggest that the distribution of the species is greater than was contemplated when the description was made, and given the wide distribution of the host oak (*Quercus castanea*), it is likely to include many different physiographic regions instead of only in the Cuitzeo Basin. On the other hand, the results also point to a high gene flow for the species, so that the dispersal capacity is apparently high and the distances considered in the study of the Basin are relatively accessible for adult individuals. This highlights several interesting aspects regarding future studies with this species of wasp (and the family in general), for example, assess whether the species distribution corresponds to the distribution of its host or if this wasp could be located in host species nearby that usually form

hybrids with the known host, which would mean an even greater geographical distribution.

I. INTRODUCCIÓN

La relación entre los campos de conocimiento como la biología, ecología y la evolución puede entenderse con mayor facilidad si se parafrasea a Begon *et al.* (2006) en su prefacio: "como Dobzhansky dijo, nada en biología tiene sentido si no es a la luz de la evolución, de igual forma, poco en evolución y en biología tiene sentido si no es a la luz de la ecología". Además, en biología, el entendimiento de las interacciones de especies es crucial para comprender las redes tróficas y cómo éstas influyen en la estructuración de las comunidades (Paine 1980), de tal manera que su estudio trasciende en los campos de la ecología y la evolución (Armbruster 1997). Por tanto, conocer cualquier aspecto relacionado con las interacciones entre especies permitirá tener un mejor entendimiento del mundo que nos rodea y resalta la importancia de conocer los factores que alteran la distribución y la abundancia de las especies en diferentes escalas espaciales y temporales.

En general, se reconocen cinco categorías principales de interacciones: competencia, depredación, parasitismo, mutualismo y detritivoría (Begon *et al.* 2006). Considerando la importancia que las comunidades vegetales tienen en sus respectivos ecosistemas (biomasa disponible para los niveles tróficos superiores), entender la depredación ejercida sobre ellas servirá para comprender patrones generales en la estructura de las comunidades, teniendo en cuenta que este tipo de interacción afecta el rendimiento y la adecuación de las plantas (Agrawal *et al.* 2012). La depredación puede subdividirse en cuatro tipos funcionales (Begon *et al.* 2006): depredadores verdaderos, forrajeros, parásitos y parasitoides; todos ellos diferenciándose sobre la base del número de organismos que atacan, la proporción que consumen y la letalidad inicial/final sobre dichos organismos. La importancia particular de los parásitos es que estos atacan con frecuencia una sección de una o pocas presas (el huésped) y normalmente no son letales, lo que permite una relación íntima entre parásito y huésped.

Los insectos minadores y formadores de agallas se consideran dentro de los macroparásitos de plantas (Begon *et al.* 2006, Schowalter 2006) y tienen la capacidad de alterar el crecimiento normal de algunas estructuras de sus plantas

huésped, con resultados diversos sobre la sobrevivencia de los huéspedes y promoviendo alta especificidad entre el parásito y su huésped (Triplehorn y Johnson 2005, Schowalter 2006). Las agallas son crecimientos atípicos de las plantas que ofrecen alimento, refugio y principalmente protección para el inductor o su progenie (Cornell 1983). Se tienen registradas alrededor de 13,000 especies de insectos inductores de agallas en plantas, ubicadas en siete órdenes (Shorthouse *et al.* 2005), aunque Espírito-Santo y Fernandes (2007) reportan un intervalo bastante amplio de 21,000 a 211,000 especies de insectos agalleros que quizás valdría la pena revalorar considerando un mayor número de publicaciones y las particularidades de cada sistema. La familia Cynipidae (Hymenoptera) contribuye con alrededor de 1,400 especies, constituyendo la segunda mayor radiación de insectos inductores de agallas, detrás de la familia Cecidomyiidae: Diptera (Csöka *et al.* 2004; Ronquist y Liljeblad 2001). Cada especie produce su propia agalla, anatómica y fisiológicamente diferente de las inducidas por otras especies relacionadas (Shorthouse *et al.* 2005).

Las avispas agalleras de encinos (Cynipidae: Cynipini), con cerca de 1,000 especies (Liljeblad *et al.* 2008), forman las agallas estructuralmente más complejas y diversas donde cada estructura refleja características principalmente del insecto inductor, representando una extensión de su fenotipo (Stone y Cook 1998). Las especies huéspedes de Cynipini están casi exclusivamente limitadas al género *Quercus* (Liljeblad *et al.* 2008); algunas utilizan otros huéspedes dentro de Fagaceae, como *Castanea*, *Castanopsis*, *Lithocarpus* y *Chrysolepis* (Stone *et al.* 2002). Además, la mayoría exhiben historias de vida con alternancia de generaciones (*e.g.* asexual y sexual) (Stone *et al.* 2002). Considerando lo anterior, es evidente que el grupo es de gran interés para realizar estudios que evalúen sus ciclos de vida complejos, los mecanismos por medio de los cuáles inducen en sus huéspedes la formación de órganos que normalmente no se desarrollarían, su estrecha asociación con grupos específicos de huéspedes y su empleo como organismos modelo en otro tipo de estudios.

La ecología molecular se ha convertido en un campo central en los estudios sobre la biodiversidad, un tema complejo que ha recibido mucha atención en las

últimas décadas principalmente a causa del impacto antropogénico (van Dyke 2008, Culver *et al.* 2011). Anteriormente, era común estudiar la diversidad de especies y la diversidad genética como aspectos independientes, pero algunos estudios resaltaron la importancia e interdependencia que existe entre estos y por qué debía considerarse el nivel genético en los esfuerzos de conservación (Lankau y Strauss 2007). De acuerdo con Samways *et al.* (2010), es uno de los retos que debe considerarse en los esfuerzos de conservación de insectos. A nivel poblacional, la estimación de la diversidad y la estructura genética permiten evaluar el flujo de genes que ocurre en varios niveles y que pueden dar como resultado patrones complejos como causa de poblaciones aisladas o completamente panmícticas (Culver *et al.* 2011). Por otro lado, las tasas de evolución molecular varían por causas distintas, y en el caso particular del orden Hymenoptera, debido a procesos como partenogénesis y parasitismo (Dowton y Austin 1995). El estudio de la diversidad genética y cómo varía geográficamente (estructura genética) permite comprender procesos que influyen en las especies, en tiempos ecológicos y evolutivos, y nos permiten tener argumentos de valor para fines de conservación (Speight *et al.* 2008, Samways *et al.* 2010). Además, si se considera que los cinípidos, por su biología, tienen el potencial de convertirse en especies plaga o invasoras, es importante evaluar su diversidad y estructura genética para prever cómo sería la dinámica como grupo invasor y los posibles ecosistemas susceptibles (Sakai *et al.* 2001, Barrera-Ruíz *et al.* 2016, Cheng *et al.* 2016).

El presente trabajo se centra en el estudio de la diversidad y la estructura genética de la especie endémica de avispa inductora de agallas *Amphibolips michoacaensis*, colectadas únicamente de la Cuenca del Cuitzeo, asociada a *Quercus castanea*. Este género de avispas se caracteriza por utilizar como huéspedes a encinos de la sección *Lobatae* (Nieves-Aldrey *et al.* 2012), cuyo centro de diversificación se ubica en México (Valencia 2004). Las preguntas planteadas en este trabajo fueron: 1) ¿Cuál es la diversidad genética de *A. michoacaensis*?; 2) ¿Existe estructura geográfica genética a nivel local en *A.*

michoacaensis?; y 3) ¿Qué factores o procesos pueden estar influyendo en el patrón observado de estructura genética en *A. michoacaensis*?

II. OBJETIVOS

II.1 General.

- Determinar la diversidad y estructura genética de *Amphibolips michoacaensis* asociada a *Quercus castanea* en la Cuenca del Cuitzeo.

II.2 Específicos.

- Evaluar los niveles de diversidad genética de *Amphibolips michoacaensis* en la Cuenca del Cuitzeo.
- Examinar cómo se distribuye geográficamente la diversidad genética entre las poblaciones de *Amphibolips michoacaensis* en la Cuenca del Cuitzeo.
- Hacer una revisión sobre los procesos que podrían incidir en la diversidad y estructura genética de *Amphibolips michoacaensis* en la Cuenca del Cuitzeo, principalmente a través de la comparación con estudios realizados con especies afines.

III. ANTECEDENTES

III.1 La familia Cynipidae.

La familia Cynipidae pertenece a la superfamilia Cynipoidea, que principalmente se compone de avispas parasíticas, excepto por Cynipidae y un grupo de Figitidae, lo que indica el surgimiento de fitofagia a partir de ancestros parasitoides. El origen de la familia Cynipidae se presupone a finales del Jurásico o inicios del Cretácico, y ambas categorías (familia y superfamilia) son monofiléticas (Ronquist 1995, Liljeblad y Ronquist 1998, Ronquist 1999, Csöka *et al.* 2004, Shorthouse *et al.* 2005, Liu *et al.* 2007).

La familia Cynipidae, con sólo una subfamilia viviente, Cynipinae, incluye dos grupos tróficos, inductores de agallas e inquilinos asociados a agallas (Ronquist 1999, Csöka *et al.* 2004, Abe *et al.* 2007, Liljeblad *et al.* 2008). Actualmente, la familia Cynipidae está dividida en doce tribus con base en caracteres morfológicos, biológicos y genéticos (Tabla 1) (Ronquist 1995, 1999, Csöka *et al.* 2004, Nylander *et al.* 2004, Liljeblad *et al.* 2008, Nieves-Aldrey *et al.* 2009, Liljeblad *et al.* 2011, Ronquist *et al.* 2015). La tribu Cynipini induce agallas sobre especies de la familia Fagaceae (principalmente *Quercus*), Diplolepidini induce agallas sobre el género *Rosa* (Rosaceae), Pediaspidini induce agallas sobre el género *Acer* (Sapindaceae), Eschatocerini induce agallas sobre los géneros *Acacia* y *Prosopis* (Fabaceae), Qwaqwaiini induce agallas en el género *Scolopia* (Salicaceae), Paraulacini incluye especies inquilinas o parasitoides en agallas de Pteromalidae (Hymenoptera: Chalcidoidea) sobre el género *Nothofagus* (Nothofagaceae), Aylacini induce agallas en el género *Papaver* (Papaveraceae), Aulacideini induce agallas sobre Asteraceae, Lamiaceae, Valerianaceae y la tribu Fumarioideae (Papaveraceae), Phanacidini induce agallas en varios géneros de Asteraceae principalmente, Diastrophini induce agallas o son inquilinos de agallas principalmente en los géneros *Rubus*, *Potentilla* y *Rosa* (Rosaceae), Ceroptresini probablemente son inquilinos en agallas de cinípidos en *Quercus* (Fagaceae), y por último, Synergini son un grupo principalmente de inquilinos sobre especies de Cynipidae en varios géneros de Fagaceae (principalmente *Quercus*).

Tabla 1. Características más distintivas, características únicas, familia de planta huésped^a y distribución para cada tribu reconocida actualmente para la familia Cynipidae. El orden de las características es de acuerdo al índice de diferencia y unidad según el análisis de Ronquist *et al.* (2015), en orden descendente y considerando únicamente tres caracteres; algunos caracteres pueden repetirse en las primeras columnas por su importancia en ambos casos. Los datos se presentan con el caracter en primer lugar y en paréntesis el estado de dicho caracter. Tabla adaptada de Ronquist *et al.* (2015).

Tribu	Caracteres más distintivos	Caracteres únicos	Diversidad, distribución y huéspedes ^a
Cynipini	Forma de la superficie laterodorsal del pronoto (franja amplia a lo largo del margen dorsal con inflexiones claras); forma del occiput medialmente (con impresiones amplias que surgen gradualmente hacia el vértex); forma de la superficie anterior de la mesocoxa (sobresaliendo menos, pico más lejano de la base de la coxa)	Forma del occiput medialmente (con impresiones amplias que surgen gradualmente hacia el vértex); longitud de la segunda radial (corta, radio ≤ 0.44); forma de la superficie anterior de la mesocoxa (sobresaliendo menos, pico más lejano de la base de la coxa)	Alrededor de 1,000 especies. Holártico, Neotropical y Oriental. <i>Quercus</i> , <i>Castanea</i> , <i>Chrysolepis</i> y <i>Lithocarpus</i> (Fagaceae).
Diplolepidini	Familia de planta huésped (Rosaceae); carina propodeal lateral (ausente); longitud de la nucha dorsalmente (corta, radio < 0.26)	Fosa de liberación glandular del mesoescudo (presente); parte posterodorsal de la franja brillante (sin proyección dorsal); articulación del ovipositor (presente con un punto de flexión débil o con articulación distinguible)	58 especies. Holártico. <i>Rosa</i> spp (Rosaceae)
Pediaspidini	Impresión escutelar posteromedial con margen distinguible, redondo (presente); escultura sobre el vértex dorsal al ojo compuesto (más o menos borrada); forma de la impresión subventral del pronoto (ancho y poco profundo)	Impresión escutelar posteromedial con margen distinguible, redondo (presente); familia de planta huésped (Sapindaceae); escultura sobre el vértex dorsal al ojo compuesto (más o menos borrada)	2 especies. Paleártico. <i>Acer</i> spp (Sapindaceae)
Eschatocerini	<i>Notauli</i> (enteramente ausente); bulla en R1 + Sc (ausente); familia de planta huésped (Fabaceae)	<i>Notauli</i> (enteramente ausente); bulla en R1 + Sc (ausente); familia de planta huésped (Fabaceae)	3 especies. Neotropical (Sudamérica). <i>Prosopis</i> spp y <i>Acacia</i> spp (Fabaceae)
Qwaqwaiini	Occiput (plano o cóncavo con costas o estrías horizontales); distribución geográfica (Sudáfrica); longitud del segundo segmento del palpo maxilar (largo, radio > 0.54)	Occiput (plano o cóncavo con costas o estrías horizontales); distribución geográfica (Sudáfrica); ángulo entre R + Sc y R1 + Sc (no cambia en dirección, R + Sc ligeramente continuando en R1 + Sc)	1 especie. Afrotropical. <i>Scolopia</i> spp (Salicaceae)

Tabla 1. Continuación.

Tribu	Caracteres más distintivos	Caracteres únicos	Diversidad, distribución y huéspedes ^a
Paraulacini	Escultura sobre la gena (compuesta de 5-9 carinas verticales); forma del ápice del séptimo esterno abdominal de la hembra (espina ventral proyectándose claramente, no unida apicalmente con las partes laterales del séptimo esterno); carina lateral del pronoto (presente)	Escultura sobre la gena (compuesta de 5-9 carinas verticales); forma del ápice del séptimo esterno abdominal de la hembra (espina ventral proyectándose claramente, no unida apicalmente con las partes laterales del séptimo esterno); posición de las crestas gulares (libres, bien separadas del hipostoma)	6 especies. Neotropical (sólo en Chile y Argentina). <i>Nothofagus</i> ^b spp (Nothofagaceae)
Aylacini	Familia de planta huésped (Papaveraceae); forma del prementón y estípites (elongados); forma de crecimiento de la planta huésped (herbácea)	Familia de planta huésped (Papaveraceae); forma del pronoto (corto, radio 0.29-0.22); forma de la proyección ventral del margen del clipeo (con una incisión media)	5 especies. Paleártico. <i>Papaver</i> spp (Papaveraceae)
Aulacideini	Distancia entre metepimeron y metepisternum (intermedio, tan largo como la anchura del metepimeron); escultura sobre el <i>speculum</i> (costada-costulada horizontalmente, longitudinalmente); forma de crecimiento de la planta huésped (herbácea)	Distancia entre metepimeron y metepisternum (intermedio, tan largo como la anchura del metepimeron); escultura sobre el occiput (arrugada transversalmente); familia de planta huésped (Lamiaceae)	75 especies. Holártico. Asteraceae, Lamiaceae, Valerianaceae y tribu Fumarioideae (Papaveraceae)
Phanacidini	Forma del margen anterior del mesoescudo en vista dorsal (completa y uniformemente redondeado); familia de planta huésped (Asteraceae); escultura sobre el <i>speculum</i> (rugosa)	Forma del margen anterior del mesoescudo en vista dorsal (completa y uniformemente redondeado); <i>notauli</i> (presente posteriormente, pero ausente en la mitad anterior); apariencia del surco gular (indistinta)	Alrededor de 40 especies. Paleártico, 1 especie Afrotropical probablemente introducida y algunas introducidas en América del Sur y Australia. Asteraceae, raramente <i>Phlomis</i> (Lamiaceae) y <i>Eryngium</i> (Apiaceae)
Diastrophini	Familia de planta huésped (Rosaceae); cresta longitudinal sobre flagelómero 1 del macho (presente, extendiéndose parte de la longitud del segmento antenal); forma de la uña metatarsal (ápice fuertemente doblado, base expandida a un lóbulo o diente)	Cresta longitudinal sobre flagelómero 1 del macho (presente, extendiéndose parte de la longitud del segmento antenal); borde marginal ventral del peciolo de la hembra (presente, proyectándose claramente); distinción de las crestas gulares (reducidas, no como crestas)	32 especies. Holártico y Neotropical (1 especie). Inquilinos o inductores en <i>Rubus</i> spp, <i>Potentilla</i> spp y <i>Rosa</i> spp (Rosaceae), raramente en <i>Smilax</i> (Smilacaceae)

Tabla 1. Continuación.

Tribu	Caracteres más distintivos	Caracteres únicos	Diversidad, distribución y huéspedes ^a
Ceroptresini	Nicho alimenticio de la larva (inquilino); forma de la uña metatarsal (ápice fuertemente doblado, base expandida a un lóbulo o diente); estructura de la agalla (críptica, no causando deformación externa y cambios mínimos al tejido fuera de la agalla interna)	Estructura de la agalla (críptica, no causando deformación externa y cambios mínimos al tejido fuera de la agalla interna); forma de la parte lateral del <i>mesopectus</i> (largo y bajo, radio de altura máxima a anchura máxima ≤ 1.12); longitud de la tercera válvula (larga, proyectándose más allá del ápice del noveno tergo abdominal más que la anchura de la tercera válvula)	21 especies. Holártico. Probablemente inquilinos en agallas de cinípidos en <i>Quercus</i> (Fagaceae)
Synergini	Relación entre tergos abdominales 3 y 4 de la hembra (fusionados); forma de la parte ventral del hipostoma (proyectándose claramente del margen craneal, claramente elevado); distancia entre foramen occipital y oral (más larga que la altura del foramen occipital)	Crestas transversales sobre el mesoescudo (presentes); área pronotal dorsal, debajo de la cresta pronotal (ausente u oculta por el mesoescudo); forma de la parte ventral del hipostoma (proyectándose claramente del margen craneal, claramente elevado)	Alrededor de 180 especies. Holártico, Neotropical, Oriental y Oceanía (1 género monoespecífico). Inquilinos (raramente inductores) en agallas de cinípidos en Fagaceae (principalmente <i>Quercus</i>). 1 género inquilino en agallas de Cecidosidae (Lepidoptera) sobre <i>Rhus</i> spp (Anacardiaceae)

^a En algunas tribus la familia huésped se considera dentro de los caracteres distintivos y/o únicos, pero se agrega en la tercera columna para tener en cuenta las afinidades para las tribus en donde no aparece este dato.

^b Existen dudas sobre la posibilidad de que sean parasitoides en agallas de Pteromalidae (Chalcidoidea), aquí se asume como inquilinas en estas agallas.

III.2 Cynipidae y sus relaciones a través de las filogenias.

Dentro de Hymenoptera, la superfamilia Cynipoidea ha sido considerada durante mucho tiempo como monofilética, pero sus relaciones internas y su ubicación dentro de la filogenia del orden ha sido un tema sujeto a diversas interpretaciones (Nieves-Aldrey *et al.* 2006). A continuación se exponen de forma cronológica los principales trabajos sobre filogenias que han abordado el estudio de la superfamilia Cynipoidea y/o de la familia Cynipidae.

Kinsey (1920). Hizo el primer intento de filogenia basándose en características morfológicas y biológicas (siete caracteres en total). En su estudio consideró a los agalleros de encinos (Cynipini) y rosas (Rhoditini, actualmente Diplolepidini) como derivados de los agalleros de herbáceas (Aulacini, posteriormente Aylacini). Propone que los primeros cinípidos eran habitantes de

tejidos y no inductores de agallas, similar a los inductores de agallas crípticas en Asteraceae. Según su comparación, las agallas aumentaron en complejidad y disminuyeron en el número de cámaras larvales, también que las especies más derivadas tienden a la reproducción partenogenética.

Ronquist (1994). Intenta probar escenarios sobre el origen evolutivo de los cinípidos inquilinos a través de una filogenia empleando caracteres morfológicos de avispas adultas pertenecientes a especies que son inductoras de agallas e inquilinas en diferentes grupos de plantas huéspedes. A través de su análisis, revela que la tribu Cynipini es un grupo monofilético cercanamente relacionado al género *Diplolepis*, que forma agallas en rosas. Aylacini resulta ser un grupo parafilético que incluye algunos de los linajes basales de la familia y los inquilinos surgen como un grupo monofilético bien soportado. Esto implica que el inquilinismo surgió una vez en el ancestro del grupo y según sus resultados estuvo relacionado con el género *Diastrophus* como huésped.

Ronquist (1995). Pretende analizar las principales relaciones entre los linajes dentro de la superfamilia Cynipoidea. El análisis implica únicamente caracteres morfológicos de avispas adultas. Entre sus principales resultados destaca que *Austrocynips* se comporta como el grupo hermano del resto de cinipoideos. Liopteridae e Ibalidae se consideran familias válidas. Las familias Figitidae y Cynipidae (microcinipoideos) son consideradas monofiléticas y derivadas con respecto a las demás (macrocinipoideos) pero con hábitos distintos entre sí y dentro de cada grupo.

Nordlander et al. (1996). En este estudio intentan describir las relaciones entre tres géneros de la familia Ibalidae y con respecto a las demás familias en la superfamilia Cynipoidea. El estudio se basa en caracteres morfológicos de adultos y en algunos biológicos. Demuestran que los tres géneros están bien considerados como parte de la familia Ibalidae y que su probable centro de origen es el este del Paleártico. También coinciden que deben ser basales y quizás contemporáneos en origen con respecto a Liopteridae.

Liljeblad y Ronquist (1998). Estudian principalmente a la familia Cynipidae considerando el trabajo como una extensión sobre el de Ronquist (1994). También

se basan principalmente en morfología de adultos e incluyen la mayoría de los géneros y tribus, con excepción de Cynipini que ha sido considerada como monofilética y cuyo número de especies es mayor. Sus resultados confirman la monofilia de Cynipidae, de los inquilinos (Synergini) y de Cynipini. Además, Cynipini forma un grupo natural junto con las tribus Eschatocerini, Rhoditini y Pediaspidini, que denominan agalleros de rósidas leñosas (WRG por sus siglas en inglés). Aylacini resulta ser un grupo parafilético.

Ronquist (1999). En este trabajo se reúne la información de sus trabajos previos con una filogenia para Figitidae, la familia que no se había tomado en cuenta para hacer los análisis más detallados e incluye información sobre los fósiles. Básicamente lo que hace es ajustar los caracteres de las principales tribus de Figitidae y de algunas formas fósiles a las filogenias obtenidas previamente para determinar sus relaciones. A través de su análisis determina que el origen del grupo fue a través de parasitoides de larvas que habitaban en madera, luego a parasitoides de inductores de agallas y posteriormente se dio la radiación a el hábito de inducir agallas, que eventualmente se perdió en los inquilinos.

Ronquist y Liljeblad (2001). En este estudio se describen los patrones evolutivos de la familia Cynipidae utilizando la filogenia de un artículo previo usando datos de biología y distribución geográfica. Aquí rechazan las ideas previas sobre el origen de los cinípidos asociados a Asteraceae o Fagaceae, y proponen Papaveraceae o Lamiaceae. Que el ancestro fue un agallero sobre herbáceas en semillas o frutos y con agallas conspicuas. El origen, en su estudio, es en Europa y no en Norteamérica, así como provenientes de finales del Cretácico. A nivel de familia, no parece existir coevolución, sino más bien una conservación extrema entre huéspedes a través del grupo con algunos cambios drásticos en ocasiones aisladas.

Liljeblad et al. (2008). En este trabajo se hace una evaluación más minuciosa de características morfológicas y de biología principalmente sobre el clado de Cynipidae que se asocia con rósidas leñosas (WRG), así como el empleo de secuencias que se han subido a las bases de datos en otro tipo de estudios sobre algunas de las especies que ellos escogieron. En este trabajo también

retoman preguntas de artículos previos sobre el grupo. De sus resultados destaca la monofilia de Cynipini, la relación de esta tribu con Eschatocerini, Diplolepidini y Pediaspidini, y *Andricus* no resultó ser un género monofilético. Proponen la evolución de heterogonía en Cynipini y *Pediaspis* en eventos separados. No dan comentarios claros sobre las relaciones con el origen de la planta huésped o su centro de origen geográfico.

Ronquist et al. (2015). En la última filogenia publicada, utilizan datos morfológicos, biología de las especies y datos moleculares para muchas de las especies, analizando los caracteres independientemente o combinados. Su estudio fue dirigido a la familia Cynipidae, 8 tribus. Los principales aportes son: la familia es monofilética, las primeras plantas huéspedes probablemente fueron leñosas y no herbáceas, existieron varias transiciones del hábito de inducir agallas a inquilinos y los WRG no son derivados como se pensaba, el origen geográfico del grupo es incierto, el grupo WRG es parafilético o polifilético y reasignan géneros a las 8 tribus estudiadas, así como agregan otras 4 y brindan las descripciones y claves para asignar a las 12 tribus actuales.

III.3 Historia Natural de la tribu Cynipini.

Las avispas agalleras de encinos (Cynipidae: Cynipini), con cerca de 1,000 especies (Melika y Abrahamson 2002, Liljeblad *et al.* 2008), son la tribu más grande de Cynipidae, y es un grupo monofilético de avispas que forman las agallas estructuralmente más complejas y diversas que se conocen (Cornell 1983, Stone y Cook 1998, Csöka *et al.* 2004, Ács *et al.* 2007). Su distribución es predominantemente Holártica (Melika y Abrahamson 2002, Csöka *et al.* 2004, Abe *et al.* 2007, Liljeblad *et al.* 2008, Abe *et al.* 2014) y su origen histórico y radiación se presuponen del Terciario (Liu *et al.* 2007); a pesar de existir taxones de huéspedes potenciales en sitios ubicados al sur de la región Holártica en Asia o América, no se ha investigado suficiente al grupo para determinar esta información (Csöka *et al.* 2004, Abe *et al.* 2007, Abe *et al.* 2012, Nieves-Aldrey *et al.* 2012). Se caracterizan por su hábito comprimido lateralmente y su coloración, que varía

entre café, roja y/o negra, además de su pronoto corto medialmente y su tercer tergo abdominal amplio (Liljeblad *et al.* 2008).

Existen muchos factores de la planta huésped que pueden influir en la elección de oviposición por parte del inductor, tanto en órgano, tiempo y/o ubicación, pero muchos de estos factores no han sido probados en varios taxones de agalleros (Abrahamson *et al.* 2003). La mayoría de las especies están confinadas específicamente a una especie huésped o un grupo cercanamente relacionado de huéspedes (Abrahamson *et al.* 1998, 2003, Liljeblad *et al.* 2008, Buffington y Morita 2009) y se ha determinado que la especialización en las plantas huéspedes por parte de la familia es un estado filogenéticamente conservado, pero no hay evidencia de cladogénesis paralela con respecto a sus huéspedes, al menos en un análisis a nivel de familia (Ronquist 1995, Ronquist y Liljeblad 2001, Cook *et al.* 2002, Stone *et al.* 2009). Sin embargo, Abrahamson *et al.* (2003) y Liljeblad *et al.* (2008) proponen que la tribu Cynipini puede ser candidata para la especiación paralela, considerando la gran diversificación que adquirieron en sus múltiples huéspedes pertenecientes a la familia Fagaceae (particularmente *Quercus*) y que aparentemente ambos grupos radiaron de forma simultánea en el Eoceno.

Los huéspedes de Cynipini están casi exclusivamente limitadas a *Quercus*, pero algunas usan otros huéspedes dentro de Fagaceae, como *Castanea*, *Lithocarpus*, *Chrysolepis* y *Castanopsis* (Stone *et al.* 2002, Liljeblad *et al.* 2008, Melika *et al.* 2011), y normalmente están asociados a órganos específicos de sus plantas huéspedes, con pocas excepciones en las que pueden inducir agallas en más de un tipo de órgano (Abrahamson *et al.* 1998, Cook *et al.* 2002, Egan *et al.* 2012a, 2012b, 2013). La mayoría de los insectos inductores exhiben historias de vida con heterogonía, alternancia asexual y sexual de generaciones, e incluso en algunas especies se presenta heteroecia, alternancia de planta huésped en cada generación (Askew 1984, Stone *et al.* 2002, Csöka *et al.* 2004, Liljeblad *et al.* 2008, Stone *et al.* 2008); en algunos casos las diferencias morfológicas son tan grandes entre generaciones que la ubicación taxonómica a partir de morfología es

complicada (e.g. Pujade-Villar *et al.* 1999, Csöka *et al.* 2004, Ács *et al.* 2007, 2010).

De acuerdo a Ronquist *et al.* (2015), el origen del grupo es el Paleártico, aunque no descartan la idea de que pueda ser en alguna parte del hemisferio sur, principalmente porque los linajes recientemente descritos de esa región son grupos basales en su filogenia y hace falta trabajo de colecta y taxonómico en esas regiones. Excepto por una especie, todos están asociados con eudicotiledóneas y presentan la mayor diversidad en el Neártico (Abrahamson *et al.* 1998, Csöka *et al.* 2004, Liu *et al.* 2007, Liljeblad *et al.* 2008). La riqueza de Cynipini en el Neártico (particularmente en México), se ha estimado en 700 especies (Stone *et al.* 2002, Liu *et al.* 2007), sin embargo, Liu y Ronquist (2006) consideran, suponiendo la existencia de 135 especies válidas de *Quercus* para México, es razonable pensar que el número de especies para el Neotrópico sea mayor a 1,000, obviamente con la mayor proporción en México (se basan en los datos de Canadá y Estados Unidos, donde existen 90 especies de *Quercus* albergando 640 especies de Cynipini).

III.4 Agallas y su significancia adaptativa.

La agalla de los cinípidos consiste de una capa externa de tejido epidérmico, un córtex de esclerénquima y tejido interno nutritivo. Se ha sugerido que la composición de lípidos del tejido nutritivo (que alimenta a la larva) se comporta de forma similar a la de tejidos estresados (quizás estrés respiratorio por síntesis de proteínas) o atacados por patógenos y que tiene relación con el transporte de solutos o con la función de auxinas, por otro lado, los lípidos del tejido nutritivo (y algunos tipos de proteínas, principalmente las involucradas en las rutas metabólicas para sintetizar lípidos) se han sugerido por tener una composición similar a la de semillas y polen (así como similitud estructural y fisiológica), que además resalta en importancia considerando que muchos himenópteros carecen de la habilidad de sintetizar lípidos para su propio beneficio y dependen de su fuente de alimento para suplir esa carencia (Bayer 1983, Cornell 1983, Shorthouse 1986, Stone y Cook 1998, Schönrogge *et al.* 2000, Csöka *et al.* 2004, Harper *et al.*

2004, Allison y Schultz 2005, Visser *et al.* 2013, Giron *et al.* 2016). Cada estructura refleja características principalmente del inductor en lugar de las de la planta, representando una extensión de su fenotipo (Stone y Cook 1998, Stone y Schönrogge 2003). Aunque se han propuesto diversas hipótesis sobre el origen de las agallas y su importancia para el inductor (Price *et al.* 1987, Inbar *et al.* 2010), las tres principales teorías sobre el tema se centran en la protección del inductor contra enemigos naturales, la nutrición y el mantenimiento de las condiciones microambientales (Cornell 1983, Price *et al.* 1987, Stone y Schönrogge 2003). La hipótesis de los enemigos naturales es la más aceptada y es considerada como la que da una mejor explicación para la gran variedad de estructuras externas que pueden observarse en las agallas, teniendo en cuenta que los tejidos nutritivos son aparentemente constantes entre las especies que se han estudiado y que en muchas agallas pueden observarse tejidos lignificados, tricomas, espinas, superficies adhesivas, producen néctar para atraer hormigas o se ha asociado a su diámetro (con relación a los oviposidores de sus parasitoides). La hipótesis de la nutrición surge por la importancia que tienen las agallas para garantizar los recursos alimenticios para la especie inductora, a través de la re-diferenciación y desarrollo de tejidos ricos en nutrientes o, como se ha propuesto por algunos autores, a través de la manipulación de las sustancias de tejidos aledaños hacia la agalla. La hipótesis del microambiente se propuso bajo la idea de que los tejidos de las agallas protegen contra las condiciones ambientales, principalmente evitando la desecación o manteniendo la temperatura estable para el inductor, algunas estructuras que se han asociado con esta hipótesis son la presencia de cutículas con tricomas y vacuolas o espacios intercelulares. Las hipótesis más aceptadas no son mutuamente excluyentes, y lo más factible es que las agallas cumplan diversas funciones de acuerdo a los requerimientos de cada especie inductora.

A pesar de la importancia que tiene la agalla para el inductor, es muy poco lo que se sabe sobre el proceso de iniciación (Cornell 1983, Bronner 1985) y etapas de desarrollo de la agalla (ver Csöka *et al.* [2004] para una explicación actualizada de las principales fases de formación), pero es de común acuerdo que

las agallas comprenden tres etapas de desarrollo: iniciación, crecimiento y maduración; la iniciación es la parte más intrigante porque de alguna forma implica la detección de los sitios adecuados para depositar los huevos e involucra el control hasta cierto punto del metabolismo de la planta. Algunos trabajos de revisión (e.g. Martinson *et al.* 2015, Giron *et al.* 2016, Nabity 2016, Oliveira *et al.* 2016) están ampliando la visión con respecto a los probables mecanismos por medio de los cuales las especies agalleras logran manipular a sus plantas huéspedes, a través de comparación de diferentes grupos taxonómicos, estrategias o con estudios genómicos en especies particulares, y en general proponen el empleo de efectores que alteran las respuestas de las plantas huéspedes (por ejemplo a través del sistema inmunitario o en interacciones entre proteínas), hormonas vegetales sintetizadas por los inductores a través de genes heredados por transferencia horizontal o su cooperación con microbios para lograrlo. En este sentido, el trabajo de Paulson *et al.* (2016) sugiere que, para el caso particular de Hymenoptera, los venenos pueden ser un buen punto de partida para la búsqueda de los probables efectores, principalmente si se asocia que los inductores tienen aparatos de veneno mayores que sus parientes inquilinos o sus parasitoides (Vårdal 2006). De forma similar a la significancia adaptativa que pueden tener estas estructuras, no se puede descartar que todas las hipótesis estén involucradas en alguna medida para la iniciación de la agalla.

III.5 Cynipoidea en la región Neotropical y en México.

Díaz *et al.* (2002) hacen una revisión de las especies de Cynipoidea para la región Neotropical, incluyendo a México, y concluye que la diversidad registrada de estas avispas hasta esa fecha no reflejaba la riqueza potencial de cada país, principalmente considerando las especies de huéspedes disponibles en cada uno: México fue el de mayor riqueza con 170 especies, la mayoría de Cynipidae (152 especies). Pujade-Villar *et al.* (2008) indican que las tribus Aylacini y Synergini, quizás también Eschatocerini, están presentes en México, pero que hace falta mucho trabajo taxonómico para determinarlo. Pujade-Villar *et al.* (2009) registraron 157 especies de Cynipini para México sólo en 33 especies de *Quercus* (alrededor

de una tercera parte de los cinípidos en dos especies de *Quercus*), de las cuales 8 son de la sección *Lobatae*, 23 de la sección *Quercus* y 2 de la sección *Protobalanus*. En una última descripción de una especie de *Andricus* (*A. protuberans*), Pujade-Villar y Ferrer-Suay (2015a) estiman alrededor de 183 especies de Cynipini.

III.6 El género *Quercus* y *Q. castanea*.

Quercus es el género más numeroso y de mayor distribución dentro de las Fagaceae (la familia tiene alrededor de 9 géneros y 1,000 especies) con 500 especies, y su origen es holártico (McVaugh 1974, Nixon 1993, Manos *et al.* 2001, Valencia 2004, Kremer *et al.* 2012, Romero-Rangel *et al.* 2014). Los bosques de *Quercus* (encinares) son característicos de las zonas montañosas de México y muchas especies son dominantes o codominantes en sus hábitats, compartiendo en algunas ocasiones similitudes ecológicas con especies del género *Pinus* (Rzedowski 2006). Con el empleo de herramientas moleculares, el género *Quercus* ha sido dividido en dos clados, el mayor, principalmente con especies en el continente americano (implicando origen y diversificación en América), se divide a su vez en las secciones *Lobatae* (encinos rojos o negros), *Protobalanus* (encinos intermedios) y *Quercus* s.s. (encinos blancos), mientras que el menor, Euroasiático, incluye a los grupos *Cerris* y *Cyclobalanopsis* (Kremer *et al.* 2012). En este sentido es importante mencionar que México es uno de los dos centros de distribución para el género, concentrando cerca de un tercio de las especies estimadas a nivel mundial y dos tercios de lo registrado para el continente (161 especies; Valencia 2004). De particular interés para este estudio es que la sección *Lobatae* es endémica de América, es considerada plesiomórfica con respecto a las dos secciones con las que se relaciona y México es un centro de diversidad para esta sección (Nixon 1993, Manos *et al.* 1999, Valencia 2004).

Quercus castanea es una especie perteneciente a la sección *Lobatae*, y es considerada una especie de amplia distribución porque se ubica en 18 estados del país, así como en Guatemala y El Salvador, además de tener un intervalo altitudinal amplio que va de 1,180 a 2,600 msnm (Valencia 2004). *Quercus*

castanea también se caracteriza porque es frecuente en bosque perturbado de *Quercus* (Romero-Rangel *et al.* 2014). Otro aspecto importante en esta especie es que recientemente ha sido estudiada en algunos aspectos de su biología (conectividad, fragmentación, hibridación, diversidad genética, herbivoría y química) y en parte incluyen su distribución dentro de Michoacán (e.g. Peñaloza-Ramírez 2011, Herrera-Arroyo *et al.* 2013, Valencia-Cuevas *et al.* 2014, Maldonado-López *et al.* 2015a). Las principales características descriptivas de la especie son de acuerdo a Bello-González y Labat (1987): árbol de 5-20 m de alto, diámetro de 10-80 cm; ramillas de 2.5-5 mm de grueso, tomentosas de color café castaño cuando son jóvenes, pronto glabras, generalmente con abundantes lenticelas; estípulas de 1-4 mm de longitud, lanceoladas; envés de las hojas jóvenes con abundante tomento de color amarillo, haz generalmente verde, con escasa pubescencia estrellada, con pelos glandulares, de color rojo; las hojas maduras de color blanco en el envés, coriáceas y rígidas, usualmente oblanceoladas, pero varían entre oblongas, lanceoladas y obovadas, de 2.5-15 cm de longitud por 1.3-5 cm de ancho, ápice de agudo a redondeado, base subcordada o cordada, margen liso o revuelto, provisto de aristas que se engrosan cerca del ápice, en número de 5-9 a cada lado, en ocasiones con 4 serraciones a cada lado, 7-12 pares de nervios laterales; peciolo tomentoso, pronto glabro y liso de color moreno claro a amarillo, de 0.3-1 cm de longitud; fruto anual en grupos de 2 ó 3 sobre un pedúnculo grueso de 4-5 mm de longitud, involucro hemisférico de 10-14 mm de diámetro por 5-10 mm de alto, escamas delgadas con escasa pubescencia de color gris, bellota ovoide de aproximadamente 18-25 mm de largo por 12 mm de ancho.

III.7 Procesos asociados con las diferencias genéticas en Cynipidae.

En general, a partir de un análisis sobre la literatura asociada a los procesos que influyen sobre la diversidad y estructura genética de poblaciones de Cynipidae, pueden obtenerse cinco factores principales: 1) efecto de la planta huésped, 2) presencia de especies crípticas, 3) efecto de la capacidad de desplazamiento, 4) efecto de la selección de huéspedes por parte de parasitoides y 5) presencia de

Wolbachia. Además, es importante tener en consideración las diferentes historias de vida presentes en cada tribu, porque los estudios sobre diferentes especies pueden involucrar particularidades de cada sistema.

A continuación, se clasificaron los artículos en los factores mencionados y de acuerdo al factor sobre el cual hacen énfasis los estudios para abordar su proyecto o como explicación, o en donde se piensa debe tenerse mayor precaución para realizar la interpretación de los resultados; esto no quiere decir que no tomaron en cuenta más opciones para explicar sus resultados, algunos trabajos incluyen muchas de las explicaciones generales, pero se acomodan dependiendo de la que consideraron más importante y eso se podrá ver conforme se vayan revisando los diferentes artículos. Por lo tanto, se presentarán los principales resultados siguiendo esta clasificación y en cada caso en orden cronológico.

III.7.1 Condiciones de la planta huésped.

Debido a la especificidad de los cinípidos con respecto a las plantas huéspedes, algunos estudios se enfocan en analizar la asociación que presentan y cómo esto influye en su diversidad genética.

Uno de los primeros estudios considerando la importancia de la planta huésped es el de Stille (1985). Su estudio lo realizó sobre *Diplolepis rosae* en Europa, en relación a diferencias en distancias y características de distintas plantas huéspedes. En este trabajo se encontró que la diversidad genética era baja y variable dependiendo de la región de Europa. El resultado se relacionó con la buena capacidad de vuelo de la avispa y su posible beneficio de las corrientes de aire para desplazarse por grandes distancias, así como por presión selectiva en relación al escape de parasitoides. Ambas hipótesis favorecerían que esta especie sea generalista. Concluye que la planta huésped y el parasitismo influyen en esta especie y que esto, junto con su alta capacidad de desplazamiento y partenogénesis obligada son los que determinan la baja diversidad genética.

Abe (1991) estudió la influencia de dos razas de huéspedes que variaban en fenología en los comportamientos de reproducción de distintas generaciones

bisexuales de *Andricus mukaigawae*. Sus conclusiones fueron que existía aislamiento alocrónico entre la población parental y la hija, lo que podría considerarse como una probable evolución secuencial.

Kohnen *et al.* (2011) realizaron un estudio similar al de Stille (1985) con *D. rosae*. Su estudio considera además que la diversidad genética de esta especie se debería encontrar influenciada por la infección de *Wolbachia*, un género de bacterias que altera la reproducción en insectos, entre ellos causa la partenogénesis, y que debería promover la disminución de diferencias genéticas (no fue así en sus resultados). Por otro lado, no encontraron que la densidad de especies varíe con la especie de huésped (con tres especies relacionadas), confirmando en general lo que se demuestra en el trabajo de Stille (1985).

Egan *et al.* (2012a) estudiaron a *Belonocnema treatae* en Estados Unidos. Ésta especie se asocia a dos especies de huéspedes hermanas, *Quercus virginiana* y *Q. geminata*, los cuales se traslapan en distribución pero ocupan diferentes hábitats (la primera ocurre en sitios más húmedos, más ricos en nutrientes y con mayor pH). Las dos especies de encino difieren en morfología de la hoja, tiempo de floración y tasas de crecimiento y fotosíntesis. Ellos encuentran que el uso de especies divergentes se asocia con características de aislamiento reproductivo precigótico evolucionando como adaptación al uso diferencial de huéspedes y que se expresa en tamaño corporal y morfología de la agalla.

Wachi *et al.* (2012) estudiaron especies de *Andricus* que se agrupan en el complejo *mukaigawae*, para estudiar el efecto de las diferentes plantas huéspedes y modos de reproducción. Estas especies difieren poco en morfología de los adultos de la generación asexual y tienen los mismos sitios de inducción de agallas, difiriendo en número de cromosomas, huésped, forma de agalla asexual, reproducción y estatus de infección por *Wolbachia*. En general, encuentran que las diferencias genéticas son más pequeñas entre las poblaciones de la misma planta huésped y que la pérdida de la capacidad reproductiva sexual en una especie fue posterior al cambio de huésped.

III.7.2 Especies crípticas.

Un problema en los estudios de cinípidos es la complicada taxonomía del grupo. Las primeras descripciones a menudo consideraron que avispas morfológicamente distintas correspondían a especies distintas, sin considerar que las generaciones sexual y asexual de la misma especie presentaban variación morfológica, incluso en la morfología de las agallas, o alternancia de huéspedes en cada generación. Es por eso que se han propuesto algunas alternativas para realizar el estudio de las comunidades sin depender profundamente de las descripciones morfológicas, algunas veces confusas.

Ács *et al.* (2010) evaluaron el uso del código de barras como herramienta en apoyo a la taxonomía de inquilinos de agallas (Synergini). Para ello tomaron en cuenta 33 de las especies del Oeste del Paleártico (de 45 especies aceptadas), incluyendo todos los géneros. Resaltan la existencia de dos procesos que influyen en la estructura genética de las poblaciones: introgresión (movimiento de genes entre especies distintas) e infección por *Wolbachia*. También destacan el conflicto entre morfología y genética.

Nicholls *et al.* (2012) también prueban el uso del código de barras, pero con el grupo de especies *Andricus quercuscalicis*. Ellos determinan que los factores que influyen en los patrones genéticos son la introgresión y la estructura distinta entre refugios pleistocénicos.

III.7.3 Capacidades de desplazamiento.

La distribución alopátrida es una de los procesos que más se han propuesto como causas de especiación, y para el caso de los cinípidos esto también se aplica. Se han hecho estudios que intentan determinar si existe una relación entre la distribución actual o histórica de la diversidad genética con respecto a los movimientos o barreras al desplazamiento.

Uno de los primeros estudios fue el de Stone y Sunnucks (1993). Su estudio se basó en el efecto de la expansión de la distribución de *Andricus quercuscalicis* sobre su diversidad genética a través de un proceso reciente y bien conocido de invasión de la porción oeste de Europa. La generación asexual de esta especie se

desarrolla sobre *Quercus robur* y la sexual sobre *Q. cerris*. *Q. cerris* está restringida de forma natural, sin embargo, debido a la influencia de la actividad humana, se ha expandido hacia el oeste y norte de Europa, y eso ha permitido que poblaciones de *A. quercuscalicis* sigan su expansión donde ambos huéspedes se encuentran, ampliando su distribución. Lo que ellos encuentran es que la diversidad genética disminuye conforme se alejan de la población original, es decir, las poblaciones del oeste son poco diversas genéticamente. Lo que asocian con este resultado es el efecto fundador y deriva génica, o probables gradientes de selección. Otra aportación importante de este artículo es que establecen una distancia promedio de dispersión para esta especie por generación: menor de 100 km.

Stone *et al.* (2001) estudiaron la expansión en la distribución de *Andricus kollari* en Europa. Esta especie, de forma similar a la anterior, ha ampliado su distribución al norte de Europa con ayuda del ser humano, cuando introdujo su huésped (*Q. cerris*). Lo que encuentran es que las poblaciones naturales de esta especie se encuentran aisladas en las porciones este y oeste de Europa. En el este, encuentran la separación de tres linajes al mismo tiempo que los de la península Ibérica: poblaciones refugiadas en Italia, los Balcanes y Turquía. Las hembras asexuales de los dos clados ovipositan sobre especies distintas y no lo hacen en el huésped de la otra aunque ambas se encuentren en la misma región; también proponen que debido a que las generaciones sexuales normalmente son de vida corta, una diferencia pequeña en fenología impediría el entrecruzamiento (de nuevo, aislamiento alocrónico).

Rokas *et al.* (2003) estudian a *Andricus quercustozae*, para examinar las relaciones de los refugios del sur de Europa, y determinan que las poblaciones de Turquía son muy importantes para la diversidad intraespecífica (Asia menor es el centro de origen de la diversidad del oeste del Paleártico; Hipótesis del origen en Anatolia). Atribuyen las diferencias regionales a tres procesos: 1) esfuerzo limitado de muestreo; 2) deriva génica durante la expansión; y 3) polimorfismos generados por acumulación de mutaciones en los descendientes de colonias fundadoras en los refugios. Al hacer evaluaciones, demuestran que el tercer proceso es el que en

realidad ocurrió. También determinan que los clados dentro de esta especie divergieron antes de las glaciaciones del Pleistoceno, por lo que representan refugios discretos para las poblaciones.

Atkinson *et al.* (2007) también hacen válida la idea general de los refugios glaciales en Europa, identificando tres regiones: Península Ibérica (incluyendo noroeste de África), Italia y los Balcanes, y Asia menor. En su estudio, ellos analizan la escala de tiempo y la colonización de refugios (patrón longitudinal), y los procesos demográficos que operan en cada refugio por medio del análisis de tres especies de avispas y una de encino (*Andricus kollari*, *A. quercustozae*, *Biorhiza pallida* y *Quercus robur*). Encontraron en general que Asia menor representa el origen de las poblaciones (*B. pallida* fue la única excepción).

Challis *et al.* (2007) en su estudio demuestran que la distribución de los taxones del oeste del Paleártico resultan de dos procesos relacionados: dispersión longitudinal asociada con ocupación de nuevos refugios e intercambio entre ellos y cambios en distribución latitudinal asociada con la expansión o retroceso del hielo. De acuerdo a sus datos, *Andricus coriarius*, reconocido como una sola especie, es representada por tres clados. Uno de ellos, el "verdadero" *A. coriarius*, se distribuye ampliamente y es simpátrico con un clado de Irán y uno de Líbano; los cuales a su vez tienen como grupo hermano a *A. kollari*, demostrando que la especie reconocida como *A. coriarius* es parafilético. Ellos demuestran que se trata de especies crípticas reconocidas como una especie única.

Mutun (2010) evalúa el efecto de lo que se conoce como Diagonal de Anatolia (cadena montañosa en Turquía que divide al este del oeste) sobre la diversidad genética de *Andricus caputmedusae*. Él encuentra que existe una correlación entre las relaciones genéticas y su distribución geográfica en relación a la Diagonal de Anatolia, y que los haplotipos ancestrales son los del este, confirmando los resultados de Rokas *et al.* (2003).

Bihari *et al.* (2011) estudian a la especie *Synergus umbraculus* (Synergini), una de las más comunes de esta tribu en todo Europa. Pero se basan en uno de los grupos determinados en una filogenia en la que se determinó que esta especie está compuesta de cuatro. Ellos encuentran que existe división genética asociada

a los refugios Pleistocénicos y que la Península Ibérica es la que difiere más. También encuentran una gran estructura genética a través de la Diagonal de Anatolia y sistemas montañosos, y soportan el origen en la región central de Europa en lugar de Anatolia (coincidiendo con *B. pallida*; Atkinson *et al.* 2007), anterior al Pleistoceno y las glaciaciones en Europa.

Dinç y Mutun (2011) analizaron la diversidad genética de *Andricus quercustozae* en su distribución a través de Turquía, tratando de evaluar el efecto de la Diagonal de Anatolia. Sus resultados coinciden con los de Rokas *et al.* (2003), y encontraron la formación de tres grupos, uno del este, otro del oeste y uno intermedio.

Mutun (2011) estudió la diversidad genética de *Andricus lucidus* en la parte más montañosa de Anatolia, en Turquía. Encontró una gran diversidad en esta región. Lo que demuestra es que la topografía puede influir mucho la estructura genética de poblaciones.

Schönrogge *et al.* (2012) evaluaron la invasión de ocho especies de cinípidos asociados (restringidas a un huésped en ambas generaciones o sólo durante una generación) a dos especies de encinos (*Q. cerris* y *Q. ilex*) dispersadas por el ser humano hacia el norte de Europa. Las especies fueron *Andricus kollari*, *A. quercuscalicis*, *A. lignicolus*, *A. corruptrix*, *A. lucidus*, *A. aries*, *A. grossularie* y *Aphelonyx cerricola*. Entre los datos que encuentran, demuestran que existe una variación de hasta 5.5 veces en la tasa de expansión en especies que alternan huéspedes entre generaciones y que dependen de manera similar de las mismas especies de encinos. Las cuatro primeras presentan un proceso de dispersión conocido como "stepping stone" en islas de *Q. cerris* ubicadas en "océanos" de *Q. robur* / *Q. petraea* nativos. Sugieren que las agallas de la generación sexual tienen más enemigos porque son un recurso familiar en relación a las agallas de las generaciones asexuales con morfología distinta.

Hearn *et al.* (2014) analizan a *Biorhiza pallida*, por ser una especie que no se ajusta al patrón descrito para la mayoría de las especies sobre un origen en Anatolia. Ellos determinan que la divergencia y la dirección de adición son imprevistas, porque indican un origen en el oeste, lo que contrasta con los demás

estudios (varios de ellos descritos arriba). Además, presentan adición del Este Medio en la Península Ibérica, sin pasar por los Balcanes, lo que quizás se deba a una distribución a través del Norte de África quizás pasando por Italia.

Mutun y Atay (2015) analizan la diversidad genética de *Trigonaspis synaspis* en Turquía para evaluar la relación entre Anatolia y los eventos del Pleistoceno. Indican con base en sus resultados que Anatolia es un área de alta diversidad genética y que se confirma su importancia como refugio durante las glaciaciones, lo que proponen que motivó múltiples eventos de diversificación para la especie.

Mutun y Karagözoğlu (2015) estudian a *Andricus lignicola* en Turquía. De forma similar al artículo anterior, encuentran alta diversidad genética en Anatolia y mayor a la reportada para poblaciones en otras partes de Europa.

Mutun (2016) investiga la variación genética y estructura filogeográfica de *Andricus curtisii* en Turquía, y si las glaciaciones o la topografía tienen relación con la variación genética de la especie. La diversidad genética de esta especie es mayor que la reportada en algunas otras especies estudiadas en ese mismo país y de nuevo lo asocia con la importancia de Turquía como refugio durante las glaciaciones. Indica que el clima, topografía y flujo génico podrían intervenir en los resultados obtenidos, pero indica que se necesita hacer más estudios para corroborarlo. El haplotipo ancestral según su estudio se ubicó al este de Anatolia.

III.7.4 Parasitoides: selección de huéspedes.

Se sabe que las interacciones entre especies influyen en la estructura de las comunidades, ya sea que la abundancia de los niveles tróficos inferiores influya en las densidades de los niveles superiores (bottom-up), o que los niveles superiores controlen las densidades de los niveles inferiores (top-down). Incluso la competencia o la facilitación promueven cambios importantes en la estructuración de las comunidades. En este sentido, algunos estudios han intentado evaluar si los parasitoides influyen en la diversidad y estructura genética de las poblaciones de cinípidos, y si esto se refleja de alguna manera en la estructuración de las comunidades.

Atkinson *et al.* (2002) evaluaron cuatro especies europeas del género *Andricus* (*A. coriarius*, *A. lucidus*, *A. panteli* y *A. seckendorffi*) con agallas multiloculares y que ellos determinan que están asociadas con múltiples fundadoras. Lo interesante de este trabajo es que demuestra que descendientes de diferentes madres pueden coexistir en la misma agalla. Además, encuentran que los niveles de múltiples fundadoras coinciden dentro de cada especie, pero cambian entre especies, y no se relaciona con el ambiente. Proponen tres hipótesis ecológicas que pueden dar como resultado este patrón: 1) variación en densidad (no lo tomaron en cuenta); 2) variación en la disponibilidad de sitios para la inducción de las agallas (no creen que sea la única razón); y 3) variación en los niveles de ataque de parasitoides que se demuestra en presiones selectivas diferentes para cada especie. Según el análisis que ellos realizan, la segunda opción es la que ocurre, lo que indicaría que las hembras no son capaces de reconocer cuando una hembra ha ovipositado previamente.

Atkinson *et al.* (2003) estudiaron a *Biorhiza pallida*; aunque no para asociarlo directamente con los parasitoides, se agrega en esta sección para compararlo con los estudios que más parecido tienen en cuanto a los resultados. Las agallas de esta especie son multiloculares y ellos se basaron en las de la generación sexual. Estas agallas se pueden clasificar en dos tipos, las que se ajustan a la descendencia de un sólo sexo y las que tienen tanto machos como hembras. Las agallas de sexos mezclados pueden originarse de ginandróforos de la generación asexual (de una sola hembra) o de varias hembras de la generación asexual. Ellos encuentran que alrededor del 75 % de las agallas tuvieron avispa de un sólo sexo, y 25 % de ambos. Cuando tuvieron ambos sexos, la proporción estuvo sesgada hacia un sólo sexo. Realzan la importancia en esta característica porque reduce la probabilidad de cruce entre individuos hermanos porque deben dispersarse para encontrar pareja. Entre las explicaciones que encontraron para este patrón están: 1) estrategias diferentes de oviposición de las hembras; 2) sobrevivencia diferencial de la descendencia de la primera y subsecuentes hembras desde el inicio de la inducción; o 3) sobrevivencia diferencial de las larvas de la primera y las subsecuentes hembras durante el desarrollo.

Hayward y Stone (2006) examinan la habilidad de un enemigo natural para seguir a las poblaciones de huéspedes en diferentes escalas temporales y espaciales en Europa. El insecto huésped es *Andricus kollari* y el enemigo asociado es *Megastigmus stigmatizans* (Torymidae). En sus resultados, ambos clados son derivados de las poblaciones del este, pero el origen es más antiguo para el cinípido que para el parasitoide. Mencionan que la baja diversidad del parasitoide puede ser por colonización antigua y un cuello de botella extremo en algún momento o quizás por la influencia de alguna presión selectiva, como *Wolbachia*. El parasitoide es capaz de atacar a las diferentes poblaciones de *A. kollari* sin importar sus variantes geográficas, pero el cinípido no puede atacar diferentes huéspedes (encinos).

Kohnen *et al.* (2012) estudian a *Diplolepis rosae* y dos de sus parasitoides, *Orthopelma mediator* y *Glyphomerus stigma*, en Europa. El objetivo principal de su estudio fue averiguar si las historias biogeográficas eran similares para el inductor y sus dos principales parasitoides, estudiando además la presencia de *Wolbachia*. Lo que demuestran es que las historias filogeográficas son distintas para las 3 especies, con *D. rosae* y *G. stigma* sin divisiones significativas, y *O. mediator* dividido en dos grupos. Para los dos primeros proponen poblaciones amplias y mucho flujo génico como consecuencia, además, de su amplia capacidad de dispersión, en el caso de *O. mediator*, proponen dos poblaciones en refugios (Iberia y los Balcanes) que posteriormente se distribuyeron a través de Europa para vivir en simpatria. No encontraron un patrón geográfico congruente en la infección por *Wolbachia*, por lo que determinan que tiene un efecto ligero sobre la estructura de las 3 especies estudiadas.

III.7.5 Presencia de Wolbachia.

Como se ha mencionado brevemente en algunos estudios descritos anteriormente, la infección por *Wolbachia* se ha pensado como una causa de procesos demográficos importantes en algunas especies de cinípidos. *Wolbachia* es una bacteria que afecta la actividad reproductiva en diversas formas

dependiendo de su huésped (principalmente insectos), por lo que tiene un efecto significativo sobre su adecuación.

Rokas *et al.* (2001) evaluaron el efecto de *Wolbachia* en los patrones genéticos de *Biorhiza pallida*, específicamente el patrón espacial de la variación en infección. Sus resultados indican que excepto por España, todas las poblaciones europeas están infectadas con *Wolbachia*. Para explicar los patrones de infección en las poblaciones al norte y sur de España, y que éstas últimas estén libres de dicha infección, proponen tres hipótesis: 1) sólo se presentó un evento de infección y las poblaciones del centro de España la perdieron posteriormente; 2) sólo se presentó un evento de infección en un ancestro común del sur de España, norte de España y el resto de Europa, y que no se comparte con las poblaciones del centro de España; o 3) las infecciones han ocurrido independientemente en el sur de España y en Europa hacia el norte de los Pirineos. No obstante, independientemente de la ausencia de *Wolbachia* del centro de España, la presencia de machos en varias poblaciones de *B. pallida* indica que esta bacteria no ejerce partenogénesis obligada en esta especie. Entonces, la baja diversidad genética de las poblaciones en el centro y en el norte de Europa son resultado de eventos históricos y no por la infección de *Wolbachia*.

Abe y Miura (2002) estudiaron el complejo de especies *Andricus mukaigawae*, que consiste de dos especies con alternancia de generaciones (*A. mukaigawae* y *A. kashiwaphilus*) y una especie con sólo una generación partenogenética (*A. targionii*). Se ha propuesto que la generación de *A. targionii* derivó de un estado con alternancia de generaciones donde se perdió la capacidad de reproducción sexual. Ellos encuentran que *Wolbachia* no es responsable de la unisexualidad en los Cynipini.

III.8 El género *Amphibolips* y *A. michoacaensis*.

El género *Amphibolips* fue propuesto por Reinhard en 1865, cuando revisaba ejemplares que en ese entonces se suponía eran de *Cynips spongifica* (ahora *A. spongifica*). El género *Amphibolips* se distribuye de Canadá a Panamá, e induce

algunas de las agallas más grandes en Cynipini para el Continente Americano (Melika *et al.* 2011, Nieves-Aldrey *et al.* 2012).

Amphibolips está asociado exclusivamente a la sección *Lobatae* del género *Quercus*, y por lo tanto, como sus huéspedes está restringido al Continente Americano (Nieves-Aldrey *et al.* 2012). Presentan un ciclo de vida con heterogonía induciendo agallas sobre tallo, hoja y yemas (raramente en las bellotas), además, sus agallas (de globosas a fusiformes) y adultos presentan caracteres morfológicos uniformes, al menos en las especies que se conocen actualmente (Melika y Abrahamson 2002, Pujade-Villar *et al.* 2009, Melika *et al.* 2011, Nieves-Aldrey *et al.* 2012). Actualmente se reconocen 52 especies, la gran mayoría de la región Neártica y tres especies de Panamá, 18 de ellas son endémicas a México y sólo se comparte una con Estados Unidos (Medianero y Nieves-Aldrey 2010, Nieves-Aldrey *et al.* 2012).

En 1937, Kinsey describe especies nuevas para el género y propone un complejo de especies denominado *niger*, compuesto de avispas asexuales casi exclusivas a México (una especie se comparte con Estados Unidos). Posteriormente, Melika *et al.* (2011) describen dos especies en México y de forma semejante a Kinsey proponen la creación de otro complejo que alberga a las especies excluidas por el complejo *niger* y que incluye a las que describen en su estudio; complejo *nassa*. Finalmente, como prueba de que la taxonomía en este grupo es compleja y principalmente se basa en morfología, una nueva descripción de especies realizada por Nieves-Aldrey *et al.* (2012) en México plantea que el complejo *nassa* no tiene suficiente valor como para utilizarse, por lo que desacreditan su establecimiento.

La importancia de profundizar los estudios en este género radica en que su conocimiento taxonómico es todavía insuficiente, sus límites genéricos no están bien establecidos, sus ciclos de vida en México no se conocen completamente, sus relaciones con respecto a otros géneros son inciertas y existen dudas sobre la relación entre el complejo *niger* y las demás especies de *Amphibolips* (Nieves-Aldrey *et al.* 2012). Recientemente, Pujade-Villar y Ferrer-Suay (2015b) indican que el complejo *niger* está en proceso de descripción como género nuevo.

De acuerdo a la descripción de la especie *A. michoacaensis*, éste se distribuye en la Cuenca del Cuitzeo, al norte de Michoacán (Nieves-Aldrey *et al.* 2012). La hembra se caracteriza por tener una longitud promedio de 5.1 mm; cabeza y mesosoma negros, clípeo-mandíbulas y antenas color café; metasoma negro, ligeramente más claro en la parte ventral; patas negras; ala anterior con infuscación oscura y todas las venas oscurecidas; el macho se distingue porque la antena tiene 14 antenómeros (uno extra), sensilas de tipo placodeo en todos los flagelómeros y sus alas son más oscuras. La planta huésped es *Quercus castanea*. Como Beutenmüller (1909) y Cook (1913) reconocieron, el género *Amphibolips* parece un buen sistema de estudio para propuestas de investigación sobre la estructura, histología y origen de la agalla. En este sentido, hay que destacar que, si bien Cook (1913) hizo un estudio sobre el desarrollo de las agallas de varias especies de *Amphibolips*, la agalla de *A. michoacaensis* fue estudiada recientemente a profundidad y ampliamente ilustrada con fotografías por Hernández-Soto *et al.* (2015) en diferentes etapas de desarrollo. Este género también puede ser importante en estudios relacionados con aspectos ecológicos o por su relación íntima con sus huéspedes, tal es el caso del estudio de Tovar-Sánchez y Oyama (2006), donde este género fue uno de los más representados en el estudio entre *Q. crassifolia* y *Q. crassipes*, y sus híbridos.

IV. METODOLOGÍA

IV.1 Muestreo.

El muestreo se realizó en la Cuenca del Cuitzeo, ubicada al norte del estado de Michoacán, México (Fig. 1). La Cuenca del Cuitzeo forma parte de un sistema de fallas con actividad geológica iniciada entre 10,000 y 23 millones de años, y se considera dentro del sector central de la Faja Volcánica Transmexicana, un área de gran diversidad y endemismo de especies que ha sufrido actividad tectónica reciente (Ferrari *et al.* 2012, Luna-Vega 2008). La Cuenca del Cuitzeo se ubica entre las coordenadas 19°30'-20°05' de latitud norte y 100°35'-101°30' de longitud oeste, tiene una extensión aproximada de 4,000 km² y en la parte de menor elevación hay un lago somero (1-2 m) de agua salobre de aproximadamente 300 km² (Mendoza *et al.* 2011, Allende *et al.* 2009). El clima es templado (con una temperatura promedio anual de 17°C) con la mayor parte de la precipitación anual en verano, aproximadamente 765 mm (Allende *et al.* 2009, López *et al.* 2006). Ha estado sometida en los últimos años a explotación agrícola y forestal, lo que ha promovido el cambio de uso de suelo y por consecuencia la fragmentación de la vegetación original, resultando en un paisaje de fragmentos de composición y tamaño diferentes (López *et al.* 2006).

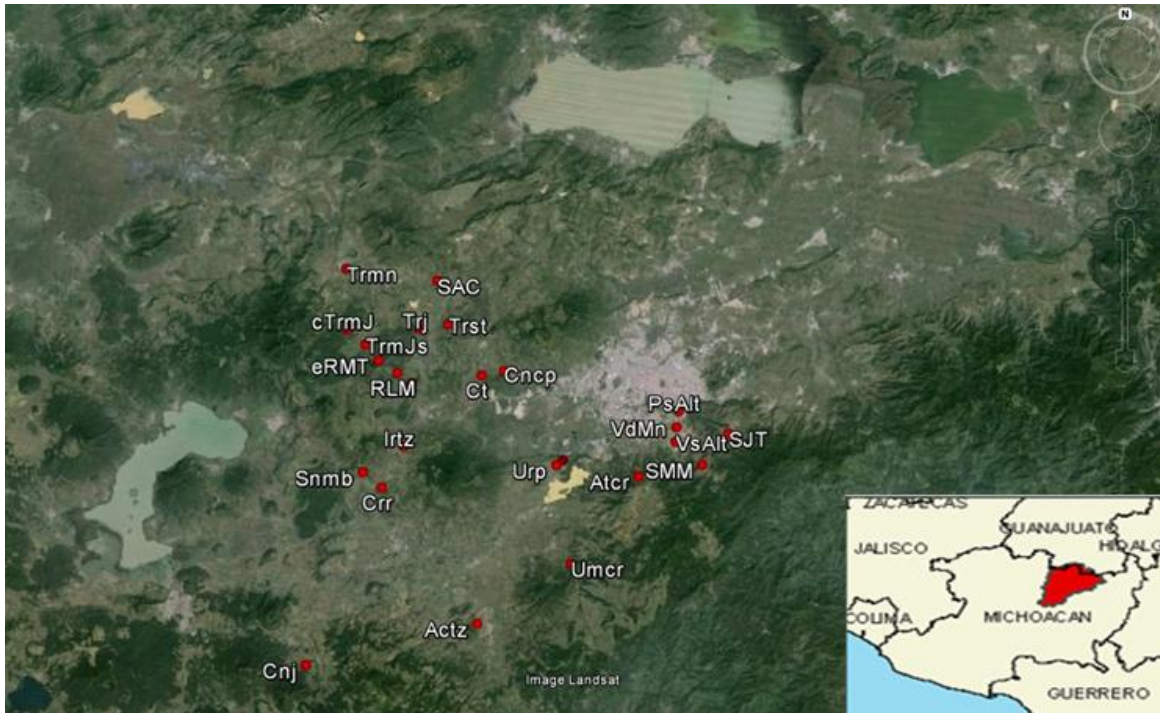


Figura 1. Ubicación de la Cuenca del Cuitzeo y puntos que señalan los muestreos realizados. Los nombres completos y sus abreviaturas se pueden ver en la Tabla 2.

Un total de 106 individuos de *A. michoacaensis* fueron colectados en 25 sitios de muestreo con abundancias que oscilan entre 1 y 10 individuos por cada sitio (Fig. 1), todos pertenecen a la generación sexual de los meses de marzo y abril del 2010. El criterio empleado para la selección de los sitios fue tener representación, en primer lugar, de la distribución total de *Q. castanea* en la Cuenca y, en segundo lugar, de la mayoría de los tamaños de fragmento y los distintos tipos de matriz existentes en el paisaje, de tal manera que permitiera obtener la variabilidad existente dentro de la Cuenca (Maldonado-López *et al.* 2015a, b). Este período coincide con la última etapa de desarrollo de la avispa, cuando pasa de la etapa de pupa a adulto y procede a emerger de la agalla. Las agallas colectadas se colocaron en recipientes individuales, debidamente etiquetados con los datos de procedencia, cubiertos con una tela porosa para permitir la transpiración y las avispas adultas que se obtuvieron se identificaron morfológicamente para corroborar la identidad taxonómica. Posteriormente, se colocaron en alcohol etílico al 95% y se resguardaron a 4°C hasta la extracción del ADN.

IV.2 Métodos moleculares.

IV.2.1 Extracción de ADN.

El ADN genómico total fue extraído de avispas completas individuales utilizando el kit DNeasy Tissue (QIAGEN) siguiendo las especificaciones del fabricante para la extracción de ADN de insectos. El ADN extraído fue visualizado por electroforesis en geles de agarosa al 0.8% teñidos con bromuro de etidio en buffer TBE al 0.5% de concentración.

IV.2.2 Selección de genes.

Dos fragmentos de ADN fueron amplificados. Uno nuclear, el Espaciador Interno Transcrito entre 5.8S ARNr y 28S ARNr o ITS 2, y otro mitocondrial, citocromo B. Durante las pruebas se intentó amplificar otros fragmentos (Factor de Elongación 1 alfa, Wingless, Citocromo C Oxidasa subunidad 1 y subunidad 2), sin embargo, en algunos no se logró obtener amplificado y en otros no se pudo tener especificidad (debido a que los primers eran universales, no se tenía conocimiento del tamaño esperando del amplificado como para pensar en estrategias de purificación subsecuentes).

IV.2.3 Amplificación por PCR: citocromo B.

Un fragmento de 432 pares de bases del gen citocromo B fue amplificado utilizando los primers CB1 y CB2 (5'-TATGTACTACCATGAGGACAAATATC-3') (5'-ATTACACCTCCTCCTAATAATTTATTAGGAAT-3') (Jermiin y Crozier 1994). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 µl, de los cuales 2.5 µl eran de buffer 10x para PCR, 1.25 µl MgCl₂ (50 mM), 1 µl de dNTP's (10 mM), 1.2 µl de cada primer (10 pmol/µl), 1 µl del templado de ADN, 0.25 µl de *Taq* polimerasa (Invitrogen), 1.5 µl de albúmina de suero bovino (BSA) y 15.1 µl de agua estéril bidestilada. Las condiciones de amplificación consistieron de una desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 36 ciclos con desnaturalización a 94°C por 1:15 minutos, alineación a 56°C por 1:15 minutos y extensión a 72°C por 1:15 minutos. Al final se agregó un paso de extensión final a 72°C por 10 minutos. Los amplificados fueron visualizados en geles de agarosa al

2% en buffer TBE al 0.5% y teñidos con Sybr Safe (Invitrogen) para su observación bajo luz UV con un sistema de documentación MiniBIS Pro (DNR Bio-Imaging Systems).

IV.2.4 Amplificación por PCR: ITS 2.

Un fragmento de 309 pares de bases del gen ITS 2 fue amplificado. Debido a que las amplificaciones no se obtenían de forma satisfactoria con el primer empleado por Rokas *et al.* (2002) en algunos individuos, se procedió a rediseñar primers de este fragmento basándose en los individuos que amplificaron (el fragmento anterior era de 369 pares de bases). Los nuevos primers se mandaron a diseñar en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, la secuencia de los primers en dirección 5'-3' es: (F) GCC CGC CTG GCT GAG GGT CG; (R) CAA TGC CAA AAA GCA ACA AC. Las reacciones de PCR se realizaron con el kit Taq PCR Master Mix (QIAGEN) en un volumen final de 5.3 μ l, 3 μ l eran de Taq PCR Master Mix, 0.5 μ l de cada primer (10 pmol/ μ l), 1 μ l del templado de ADN y 0.3 μ l de albúmina de suero bovino (BSA). Las condiciones de amplificación consistieron de una desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos con desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineación a 60°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 1 minuto. Al final se agregó un paso de extensión final a 72°C por 10 minutos. Los amplificados fueron visualizados en geles de agarosa al 2% en buffer TBE al 0.5% y teñidos con Sybr Safe (Invitrogen) para su observación bajo luz UV, con un sistema de documentación MiniBIS Pro (DNR Bio-Imaging Systems).

IV.2.5 Secuenciación.

Los productos se sometieron a reacción para marcar las bases por medio del kit de reactivos BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems). Las condiciones de la reacción de secuencia consistieron de una desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos con desnaturalización a 96°C por 30 segundos, alineación a 50°C por 15 segundos y extensión a 60°C por 2 minutos. Una vez que se obtenían las muestras marcadas, el volumen era filtrado a través de columnas de Sephadex G-50 (Sigma-Aldrich) para limpiar los

productos de PCR y posteriormente eran secadas en vacío por medio de una vacofuga (Eppendorf). Una vez que las muestras estuvieran completamente deshidratadas, se les agregaba formamida altamente desionizada (Hi-Di) y dejadas reposar durante varias horas para poder ser sometidas a análisis en el secuenciador ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems-HITACHI).

IV.3 Análisis de datos.

Las secuencias obtenidas se alinearon y editaron manualmente (para evitar problemas de lectura) con los parámetros estándar, para ello se utilizó el programa Sequencher 5.4 (Gene Codes Corporation, Michigan, EU). Los análisis se realizaron de forma similar para ambos fragmentos de ADN pero de manera independiente.

IV.3.1 Diversidad y diferenciación genética.

Se calculó la frecuencia de haplotipos y la diversidad genética (nucleotídica y haplotípica) general y para cada una de las poblaciones consideradas en este estudio con ayuda del programa DnaSP 5.10.1 (Librado y Rozas 2009). Se calcularon las pruebas estadísticas D de Tajima (Tajima 1989) y Fs de Fu (Fu 1997) a nivel general para tener una aproximación de posibles eventos demográficos y ver si los fragmentos se desvían de la neutralidad, para esto se empleó el modelo de sitios infinitos con 10,000 réplicas con el programa Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier *et al.* 2010). Con el propósito de comparar los niveles de polimorfismo, diversidad y determinar la estructura genética de las poblaciones se hizo un análisis jerárquico de varianza molecular (AMOVA) con el programa Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier *et al.* 2010); la significancia estadística de las jerarquías (estadísticos F) fue evaluada con 10,000 réplicas. Como estudios recientes han resaltado la importancia de la fragmentación en esta familia de avispas (Maldonado-López *et al.* 2015a, b), se hizo una AMOVA (de nuevo con 10,000 réplicas) agrupando a las poblaciones de acuerdo a las características del hábitat en que su ubican, expresado como uso de suelo o vegetación, en bosque de encino, vegetación secundaria, suelo agrícola o si eran sitios urbanos; para

evaluar la vegetación de cada sitio, se consideraron los fragmentos para la Cuenca del Cuitzeo disponible en la carta del INEGI para el año 2009 sobre uso de suelo y vegetación en México (escala 1:250,000).

IV.3.2 Relaciones evolutivas.

Para tener un panorama de las relaciones evolutivas entre los distintos haplotipos, se hizo un análisis de redes de haplotipos por medio de parsimonia estadística con ayuda del programa TCS 1.21 (Clement *et al.* 2000) y se emplearon los datos geográficos de los sitios para mapear los haplotipos con sus frecuencias de tal manera que correspondan con la simbología de la red obtenida (Figura 2).

IV.3.3 Relación entre diversidad genética con características del hábitat o distancias geográficas.

Para ver si existía alguna relación entre los valores de diversidad genética con respecto a las características del fragmento (de nuevo expresado como uso de suelo o vegetación), se hizo un análisis de varianza (ANOVA) con ayuda del programa JMP 8 (SAS Institute Inc, North Carolina, EU), en este caso se estimaron de nuevo los valores de diversidad genética para cada agrupación y obtener los datos necesarios para realizar la ANOVA (con el programa DnaSP 5.10.1, Librado y Rozas 2009). Para determinar si existía autocorrelación espacial en la diversidad genética, se tomó en consideración el índice de Moran, para lo cual se utilizó la ubicación geográfica de cada individuo y su valor, en distancia Euclidiana, con respecto a los demás haplotipos en la especie. El Índice de Moran alcanza valores entre 1 y -1, donde 1 indica procesos que promueven la distribución agregada y -1 indica distribución dispersa por procesos distintos al azar. Para realizar la autocorrelación se estimaron intervalos de distancia equidistantes a partir de permutaciones, de las cuales también se extrajo la significancia estadística del valor observado con respecto a los límites superior e inferior (20,000 permutaciones) del valor esperado; en este análisis se empleó el programa SPAGeDi 1.5 (Hardy y Vekemans 2002).

V. RESULTADOS

De los 106 individuos de *A. michoacaensis* secuenciados, para citocromo B (96 individuos), los sitios invariables fueron 425 con un dato perdido (por un gap) y 6 sitios polimórficos, mientras que para ITS 2 (105 individuos), los sitios invariables son 307 y se encontraron 2 sitios polimórficos.

Las frecuencias y ubicaciones geográficas de los haplotipos pueden verse en las figuras 2 (citocromo B) y 3 (ITS 2). Para citocromo B, el número de haplotipos fue de 8, mientras que para ITS 2, el número de haplotipos fue de 3. En el caso de citocromo B, los haplotipos más comunes fueron el número 1 y 3 (entre ambos presentes en todos los sitios), mientras que para ITS 2 fue el haplotipo número 2 (presente en todos los sitios). Para citocromo B, los sitios con mayor número de haplotipos fueron Villas del Monte (5), Acuitzio (4) y Rancho La Mina-Capula (4). En cambio, para ITS 2, los únicos sitios con dos haplotipos son Acuitzio, Sanambo, San José de las Torres y Tiristarán.

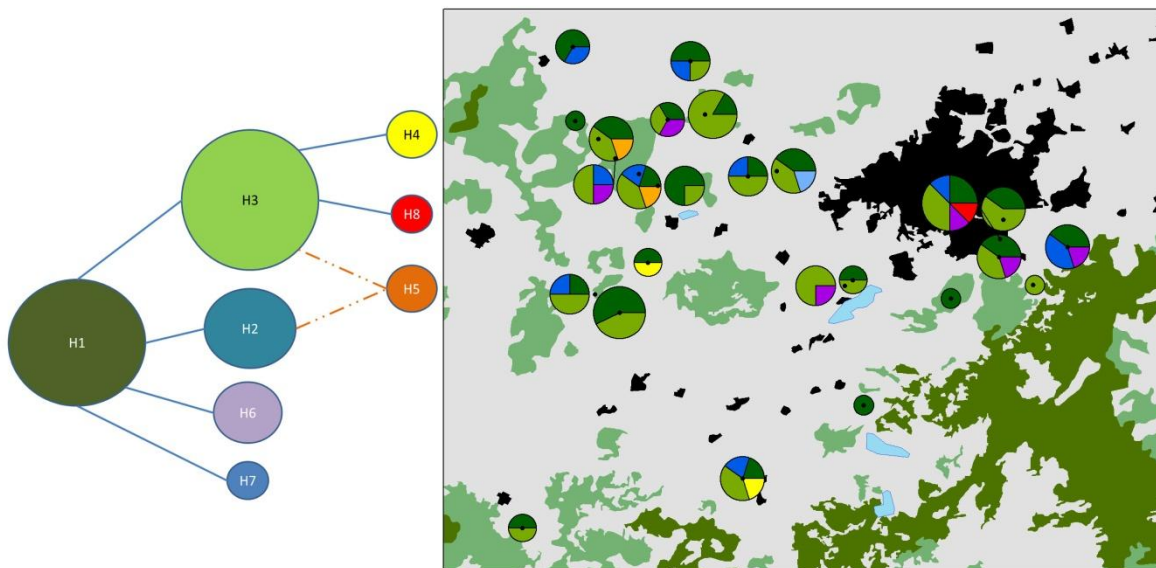


Figura 2. Red de haplotipos, frecuencia y ubicación geográfica de 96 individuos de *A. michoacaensis* en la Cuenca del Cuitzeo con citocromo B. Cada círculo corresponde en tamaño a la abundancia de individuos que se ajustan a cada uno de ellos y los colores indican la identidad y frecuencia de haplotipos. Las áreas de color negro indican las áreas urbanas en la Cuenca.

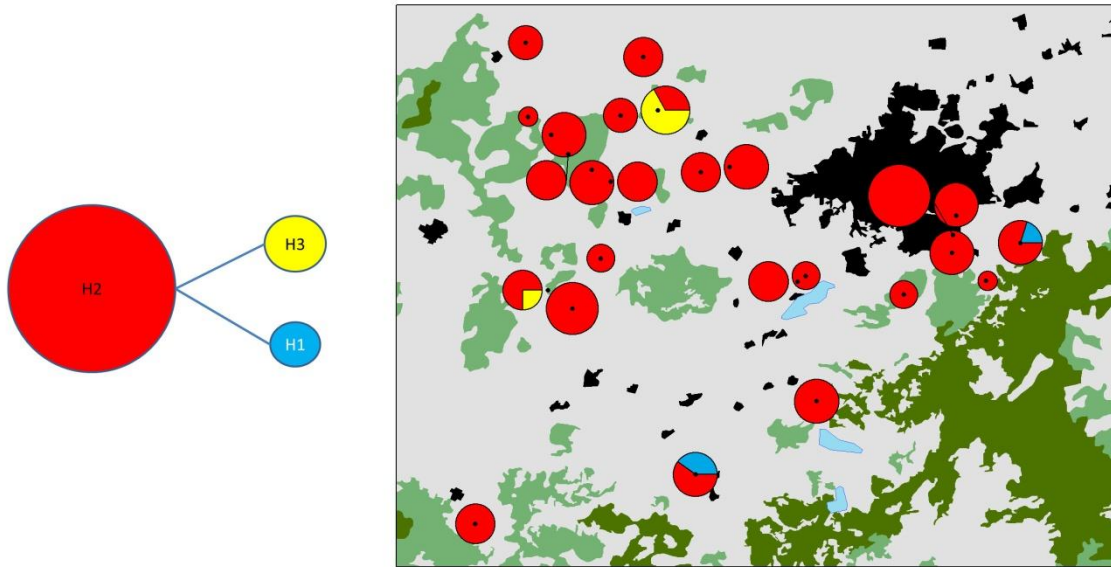


Figura 3. Red de haplotipos, frecuencia y ubicación geográfica de 105 individuos de *A. michoacaensis* en la Cuenca del Cuitzeo con ITS 2. Cada círculo corresponde en tamaño a la abundancia de individuos que se ajustan a cada uno de ellos y los colores indican la identidad y frecuencia de haplotipos. Las áreas de color negro indican las áreas urbanas en la Cuenca.

Los valores de diversidad nucleotídica, haplotípica y número de haplotipos, total y para cada sitio, pueden verse en la Tabla 2. Para citocromo B, la diversidad haplotípica total fue de 0.693, y los sitios con mayor diversidad (1.00) fueron Iratzio, Cuanajo, Cointzio y Las Trojes. En el caso de ITS 2, la diversidad haplotípica total fue de 0.145, mientras que los sitios con valor de diversidad (los demás sitios no presentaron valores porque sólo tenían un haplotipo) fueron Acuitzio (0.6), Tiristarán (0.53), Sanambo (0.5) y San José de las Torres (0.4). La diversidad nucleotídica total para citocromo B fue de 0.00214, con los valores más altos en Iratzio (0.00464) y el sitio denominado Entre Rancho La Mina y Teremendo (0.00387). Con respecto a ITS 2, la diversidad nucleotídica total fue de 0.00048, con los únicos valores en Acuitzio (0.00194), Tiristarán (0.00173), Sanambo (0.00162) y San José de las Torres (0.00129).

Tabla 2. Valores de diversidad nucleotídica y haplotípica para citocromo B e ITS2 de *A. michoacaensis* en la Cuenca del Cuitzeo.

Población	Abrev.	Coordenadas	Citocromo B				ITS2			
			N	nh	h	π	N	nh	h	π
Acuitzio	Actz	19.498767 -101.343967	5	4	0.900 ±0.161	0.00325 ±0.00089	5	2	0.600 ±0.175	0.00194 ±0.00057
Atécuaro	Atcr	19.622 -101.20135	1	1	-----	-----	2	1	0.00	0.00
Capula	Cpl	19.699267 -101.40215	4	2	0.500 ±0.265	0.00116 ±0.00062	4	1	0.00	0.00
Rancho La Mina - Capula	RLM	19.707583 -101.4148	5	4	0.900 ±0.161	0.00278 ±0.00059	5	1	0.00	0.00
Entre Rancho La Mina y Teremendo	eRMT	19.718 -101.431217	4	3	0.833 ±0.222	0.00387 ±0.00103	4	1	0.00	0.00
Teremendo Jasso	TrmJs	19.731433 -101.442633	5	3	0.800 ±0.164	0.00232 ±0.00064	5	1	0.00	0.00
Cercano a Teremendo Jasso	cTrmJ	19.743833 -101.458467	1	1	-----	-----	1	1	-----	-----
Sanambo	Snmb	19.62505 -101.444917	4	3	0.833 ±0.222	0.00271 ±0.00085	4	2	0.500 ±0.265	0.00162 ±0.00086
Iratzio	Irtz	19.646717 -101.408767	2	2	1.000 ±0.500	0.00464 ±0.00232	2	1	0.00	0.00
San Miguel del Monte	SMM	19.63135 -101.144897	1	1	-----	-----	1	1	-----	-----
Correo	Crr	19.612333 -101.4283	7	2	0.571 ±0.119	0.00133 ±0.00028	7	1	0.00	0.00
Cuanajo	Cnj	19.464917 -101.494733	2	2	1.000 ±0.500	0.00232 ±0.00116	4	1	0.00	0.00
La Concepción	Cncp	19.709433 -101.320383	5	3	0.800 ±0.164	0.00232 ±0.00064	5	1	0.00	0.00
Cuto	Ct	19.70575 -101.34015	4	3	0.833 ±0.222	0.00271 ±0.00085	4	1	0.00	0.00
Uruapilla	Urp	19.630817 -101.274083	4	2	0.500 ±0.265	0.00232 ±0.00123	4	1	0.00	0.00
Cointzio	Cntz	19.634867 -101.2683	2	2	1.000 ±0.500	0.00232 ±0.00116	2	1	0.00	0.00
San José de las Torres	SJT	19.6574762 -101.121418	5	3	0.800 ±0.164	0.00232 ±0.00064	5	2	0.400 ±0.237	0.00129 ±0.00077
Tiristarán	Trst	19.748367 -101.369733	6	2	0.333 ±0.215	0.00077 ±0.00050	6	2	0.533 ±0.172	0.00173 ±0.00056
Las Trojes	Trj	19.74455 -101.395217	3	3	1.000 ±0.272	0.00309 ±0.00103	3	1	0.00	0.00
Villas del Monte, Morelia	VdMn	19.6627 -101.167567	8	5	0.857 ±0.108	0.00307 ±0.00067	10	1	0.00	0.00
Paseo Altozano	PsAlt	19.676017 -101.165383	5	2	0.600 ±0.175	0.00139 ±0.00041	5	1	0.00	0.00
Vistas de Altozano, Morelia	VsAlt	19.6506 -101.168267	5	3	0.800 ±0.164	0.00232 ±0.00064	5	1	0.00	0.00
San Antonio Carupo	SAC	19.784617 -101.379617	4	3	0.833 ±0.222	0.00232 ±0.00079	4	1	0.00	0.00
Teremendo	Trmn	19.794553 -101.4603	3	2	0.667 ±0.314	0.00155 ±0.00073	3	1	0.00	0.00
Umécuaro	Umcr	19.54898 -101.260995	1	1	-----	-----	5	1	0.00	0.00
TOTAL			96	8	0.693 ±0.028	0.00214 ±0.00016	105	3	0.145 ±0.046	0.00048 ±0.00015

Las pruebas D de Tajima y F_s de Fu no fueron significativas en ninguno de los casos para citocromo B ($D = -0.4725$, $P > 0.1$; $F_s = -1.48509$, $P > 0.1$) ni para ITS 2 ($D = -0.93567$, $P > 0.1$; $F_s = -1.60516$, $P > 0.1$), por lo tanto, el comportamiento no se desvía significativamente de la neutralidad.

El análisis de varianza molecular (AMOVA), general y por grupos, para citocromo B e ITS 2 se presentan en las Tablas 3 y 4, respectivamente. En el caso de citocromo B, la AMOVA general indica que la variación está explicada en su totalidad por la variación dentro de las poblaciones (100%) y que no existe estructura genética para la especie, de acuerdo con el valor obtenido de F_{st} (0), de igual forma, para la AMOVA por grupos (ver la sección de Metodología), casi toda la variación se explica en el análisis dentro de las poblaciones ($\approx 100\%$), y de nuevo se rechaza la existencia de estructura genética. Para citocromo B ningún análisis fue estadísticamente significativo, por lo que no puede distinguirse el patrón observado de procesos aleatorios en la variación genética. Con ITS 2, la AMOVA general indica que la variación está explicada parcialmente ($\approx 30\%$) entre las poblaciones, pero principalmente por la variación dentro de las poblaciones ($\approx 70\%$) con un valor de F_{st} indicando que existe mucha estructura genética (≈ 0.3 ; $P < 0.01$). Para la AMOVA por grupos de ITS 2, el porcentaje de variación es similar al general con respecto a que la variación corresponde en parte al análisis entre poblaciones pero dentro de los grupos ($\approx 24\%$; $P < 0.05$), pero principalmente se presenta dentro de las poblaciones ($\approx 67\%$; $P < 0.01$); el índice de fijación indica que existe bastante estructura genética (≈ 0.3 ; $P < 0.01$). El análisis entre grupos no aporta mucho en cuanto al porcentaje de variación y tampoco es estadísticamente significativo ($\approx 9\%$, $P > 0.1$).

Tabla 3. Análisis Molecular de Varianza para citocromo B de *A. michoacaensis* en la Cuenca del Cuitzeo. a) General; b) considerando al uso de suelo / vegetación como posibles agrupaciones.

a)						
Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza		Porcentaje de variación	
Entre poblaciones	24	11.09	0		0	
Dentro de poblaciones	71	44.764	0.63048		100	
Índice de fijación FST:		0				
Probabilidad		0.93099				
b)						
Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación	Índices de fijación	P
Entre grupos	3	1.262	0.00064	0.11	0.00109	0.56921
Entre poblaciones						
Dentro de grupos	21	9.828	0	0	0	0.93158
Dentro de poblaciones	71	44.764	0.63048	99.89	0	0.93129

Tabla 4. Análisis Molecular de Varianza para ITS2 de *A. michoacaensis* en la Cuenca del Cuitzeo. a) General; b) considerando al uso de suelo / vegetación como posibles agrupaciones.

a)						
Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza		Porcentaje de variación	
Entre poblaciones	24	3.593	0.02369		31.7	
Dentro de poblaciones	80	4.083	0.05104		68.3	
Índice de fijación FST:		0.31698				
Probabilidad		0.00208				

b)

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación	Índices de fijación	P
Entre grupos	3	1.005	0.00732	9.57	0.09571	0.13079
Entre poblaciones						
Dentro de grupos	21	2.588	0.01808	23.65	0.26157	0.03723
Dentro de poblaciones	80	4.083	0.05104	66.77	0.33225	0.00218

El análisis de redes para citocromo B e ITS 2 puede observarse en las Figuras 2 y 3 respectivamente. Las redes de ambos fragmentos indican la dominancia y posición central que tienen algunos haplotipos con respecto a los demás considerando un límite de 95% de conexión (de los haplotipos 1 y 3 para citocromo B; del haplotipo 2 para ITS 2) y su amplia distribución a través de los sitios de colecta en la Cuenca; en ninguno de los fragmentos se presentaron pasos mutacionales no detectados. Para citocromo B, el análisis de redes indica que el haplotipo 1 está conectado a cuatro haplotipos, incluyendo el haplotipo 3, y de este último se conectan dos haplotipos. El haplotipo 5 presenta un caso peculiar debido a que puede estar conectado al haplotipo 3 o al 2, de tal manera que su conexión permanece hasta cierto punto incierta. Con respecto a ITS 2 las conexiones son más claras, con los dos haplotipos menos abundantes conectados al haplotipo 2.

El número de individuos en cada categoría, número de haplotipos y los valores de diversidad genética y haplotípica se presentan en la Tabla 5. Los resultados obtenidos de la ANOVA indican que no hubo efecto significativo de las categorías de uso de suelo o vegetación sobre las medidas de diversidad haplotípica (citocromo B [F(3, 17) = 0.3393, P = 0.7972]; ITS2 [F(3, 19) = 1.0242, P = 0.4041]) y nucleotídica (citocromo B [F(3, 17) = 0.1413, P = 0.9338]; ITS2 [F(3, 19) = 1.0295, P = 0.4018]) para ambos genes considerando una probabilidad <0.05, aunque en el caso de ITS 2 se aprecia una disminución aparente de ambos valores de diversidad.

Tabla 5. Valores de diversidad nucleotídica y haplotípica considerando a cada categoría de uso de suelo / vegetación como una agrupación para citocromo B (a) e ITS2 (b) de *A. michoacaensis* en la Cuenca del Cuitzeo.

Categoría	N	nh	h	π
a)				
Bosque de encino	21	5	0.6762 \pm 0.085	0.00217 \pm 0.00035
Vegetación secundaria	20	5	0.653 \pm 0.076	0.00187 \pm 0.00035
Agrícola	37	7	0.73 \pm 0.045	0.00229 \pm 0.00026
Urbano	18	5	0.712 \pm 0.074	0.00223 \pm 0.0004
b)				
Bosque de encino	22	2	0.368 \pm 0.100	0.00119 \pm 0.00032
Vegetación secundaria	24	2	0.159 \pm 0.094	0.00052 \pm 0.00031
Agrícola	39	2	0.051 \pm 0.048	0.00017 \pm 0.00016
Urbano	20	1	0.00	0.00

El análisis de autocorrelación genética espacial consideró distancias de aproximadamente 5 km por cada intervalo para ambos fragmentos. En la Figura 4 se aprecia que para citocromo B no existen diferencias significativas entre el Índice de Moran observado con procesos aleatorios para todos los intervalos de distancias. Por otro lado, en la Figura 5 se puede apreciar que para ITS 2 existen tres puntos en los cuales el valor observado se aleja estadísticamente de los valores estimados, en el primer intervalo (\approx 0 km) se hace una comparación al interior de las poblaciones (I observado = 0.39; $P < 0.001$) indicando una tendencia a la agregación de las frecuencias de haplotipos, en el segundo intervalo que se desvía de los valores estimados (\approx 25 km) se obtiene un valor indicando que la distribución de las frecuencias es ligeramente dispersa, pero no se debe a procesos aleatorios (I observado = -0.109; $P < 0.05$), y por último (\approx 35 km) vuelve a apreciarse que las frecuencias tienen una ligera tendencia a agruparse (I observado = 0.108; $P < 0.02$). Estos resultados sugieren, para ITS 2, la existencia de mayor similitud genética principalmente entre individuos de la misma población y ligeramente entre poblaciones en distancias \approx 35 km, mientras que en distancias \approx 25 km las poblaciones tienden a ser ligeramente distintas.

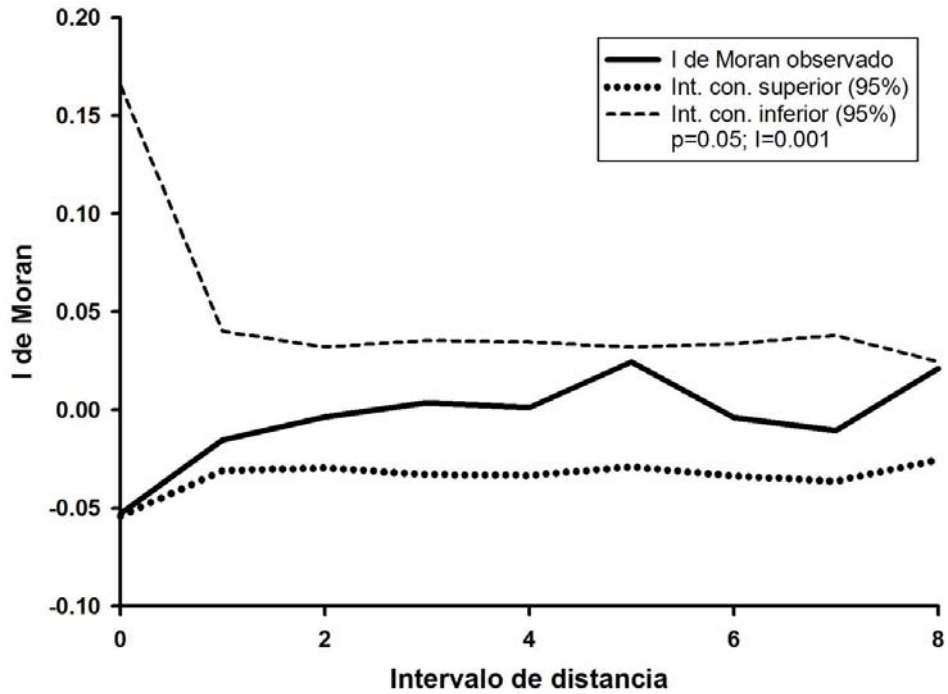


Figura 4. Índice de Moran para 96 individuos de *A. michoacaensis* en la Cuenca del Cuitzeo con citocromo B.

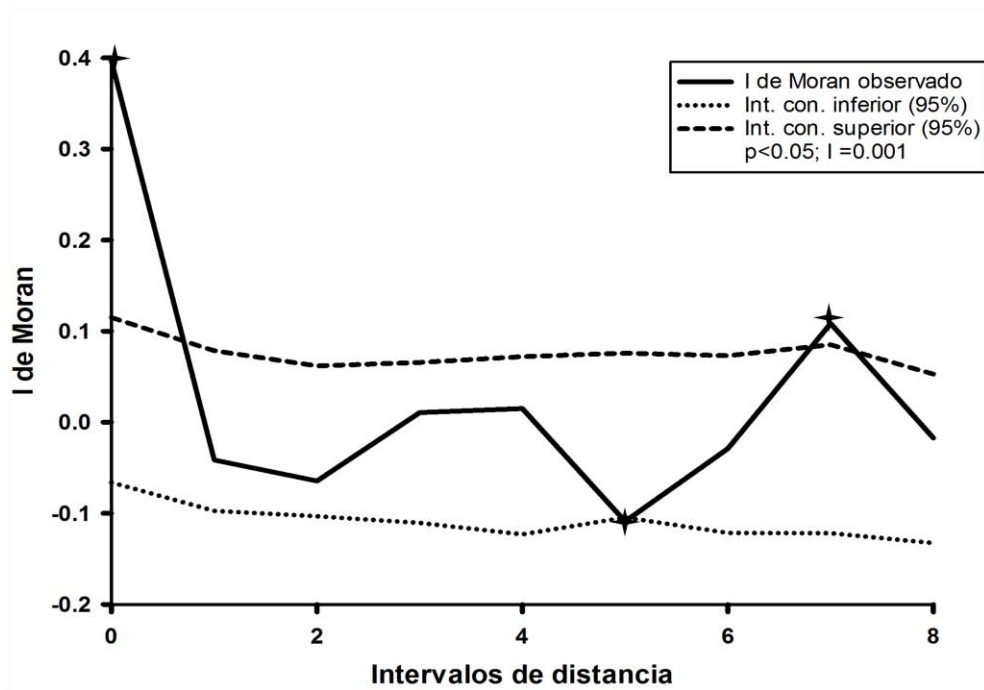


Figura 5. Índice de Moran para 105 individuos de *A. michoacaensis* en la Cuenca del Cuitzeo con ITS2. Las cruces (✦) indican los valores observados que significativamente se desvían de lo esperado.

VI. DISCUSIÓN

Este estudio es el primero en analizar la diversidad genética de una especie mexicana de la familia Cynipidae, lo que significa un gran avance en su estudio teniendo en cuenta la diversidad de huéspedes posibles (principalmente del género *Quercus*), el número de especies descritas actualmente de estas avispas (≈ 183 especies) y su escaso estudio fuera del ámbito taxonómico en el país. También es importante tener en cuenta que por ser parásitos de árboles del género *Quercus*, la información puede ser de gran utilidad por el potencial que presentan de ser plagas o comparándola con los datos de otras especies del grupo que ya son consideradas nocivas (Sakai *et al.* 2001).

El número de individuos que se emplearon para realizar este estudio (106) está ligeramente por debajo de lo que se ha utilizado en la mayoría de estudios con especies de esta familia, por ejemplo, Mutun (2010) utiliza 180 individuos de *Andricus caputmedusae* para su estudio en Turquía, Bihari *et al.* (2011) utilizan 380 para la filogeografía de *Synergus umbraculus* en el oeste del Paleártico, Kohnen *et al.* (2011) utilizan 149 avispas de *Diplolepis rosae* para su trabajo en Alemania, Mutun (2011) emplea 144 individuos de *Andricus lucidus* en Turquía, Nicholls *et al.* (2012) colectan 518 individuos de 4 especies del género *Andricus* (≈ 400 pertenecieron a dos especies) y Mutun y Karagözoğlu (2015) utilizan 117 individuos de *Andricus lignicola* en Turquía. Sin embargo, algunos trabajos emplearon un menor número de individuos comparados con este estudio, por ejemplo, Dinç y Mutun (2011) utilizan 95 individuos de *Andricus quercustozae* en su estudio para Turquía, Egan *et al.* (2012a) utilizan 44 avispas de *Belonocnema treatae* para comparar seis sitios en Estados Unidos y Wachi *et al.* (2012) colectan 51 avispas de tres especies del género *Andricus* para hacer su comparación.

En este sentido, es importante resaltar que el área de muestreo en la mayoría de los estudios es ampliamente mayor que la empleada para *A. michoacaensis*, por ejemplo, el estudio de menor extensión de los mencionados es el de Egan *et al.* (2012a) con una distancia promedio de 67.8 km entre los seis sitios de estudio y la menor distancia de 20.5 km (no reportan las coordenadas, pero si se excluye el sitio más lejano, el promedio probablemente bajaría hasta ser

muy similar a las mayores distancia que se contemplan en este estudio, ≈ 40 km), o el de Kohnen *et al.* (2011), donde a partir de una revisión del área de acuerdo a las coordenadas geográficas que reportan puede verse que, con excepción de dos sitios que se ubican a ≈ 16 km entre sí, las distancias entre sitios superan los 150 km. No obstante, esto quiere decir que el esfuerzo de muestreo empleado para *A. michoacaensis* es suficiente para obtener la representación de su distribución dentro de la Cuenca del Cuitzeo, que hasta donde se sabe es la distribución de la especie.

El número de haplotipos y los valores de diversidad genética (en este caso haplotípica y nucleotídica) de *A. michoacaensis* son mayores para citocromo B que para ITS 2 (Cit B: 432 pb, 6 sitios polimórficos, 8 haplotipos, $h = 0.693$, $\pi = 0.00214$; ITS 2: 309 pb, 2 sitios polimórficos, 3 haplotipos, $h = 0.145$, $\pi = 0.00048$), lo cual es de esperarse de acuerdo al trabajo de Rokas *et al.* (2002). Para citocromo B, la diversidad haplotípica osciló entre 1 (en 4 sitios) y 0.33 (Tiristarán), mientras que la diversidad nucleotídica varió entre 0.00464 (Iratzio) y 0.00077 (Tiristarán).

Por otro lado, en el caso de ITS 2 la diversidad genética sólo fue diferente de cero para 4 sitios debido a la dominancia del haplotipo 2 en casi todas las poblaciones (exceptuando dos en las que sólo había un individuo y no pudo estimarse), permitiendo obtener valores de diversidad haplotípica que oscilaron entre 0 y 0.6 (Acuitzio) y valores de diversidad nucleotídica que variaron entre 0 y 0.00194 (Acuitzio).

Los valores obtenidos en este estudio coinciden con los trabajos que emplean estas secuencias en relación a la familia Cynipidae. Por ejemplo, Hayward y Stone (2006) utilizan citocromo B en *Andricus kollari*, reportando un fragmento de 433 pb con 36 haplotipos y 62 sitios variables (no reportan valores de diversidad genética). Kohnen *et al.* (2012) utilizan ITS 2 con 28 individuos de *Diplolepis rosae*, reportan que el fragmento fue de 581 pb, cuatro sitios variables y seis haplotipos, aunque ya no presentan los valores de diversidad haplotípica porque no era variable dentro de las poblaciones que consideraron. Sin embargo, tres estudios recientes utilizan citocromo B e ITS 2 para sus estudios

poblacionales enfocados en especies con distribución en Turquía (aunque no endémicas a ese país o a la región). Mutun y Atay (2015) reportan para *Trigonaspis synaspis*, con citocromo B, un fragmento de 433 pb del cual 42 sitios fueron polimórficos y obtuvieron 50 haplotipos, mientras que para ITS 2, el fragmento fue de 433 pb con 19 sitios polimórficos y 15 haplotipos; para citocromo B, la diversidad haplotípica fue 0.855 y la diversidad nucleotídica fue 0.013, mientras que para ITS 2 la diversidad haplotípica fue 0.31 y la diversidad nucleotídica fue 0.0015. Mutun y Karagözoğlu (2015) emplearon sólo citocromo B para estudiar a *Andricus lignicola*, el fragmento fue de 433 pb con 58 sitios polimórficos y 18 haplotipos, la diversidad haplotípica fue de 0.3252 y la diversidad nucleotídica fue de 0.0088. Mutun (2016), en su estudio de *Andricus curtisii*, encuentra un fragmento de 433 pb para citocromo B con 37 sitios polimórficos y 40 haplotipos, mientras que para ITS 2 el fragmento fue de 403 pb con 111 sitios polimórficos y 63 haplotipos; para citocromo B la diversidad haplotípica fue de 0.7246 y la diversidad nucleotídica no fue reportada, mientras que para ITS 2 la diversidad haplotípica fue de 0.7653 y la diversidad nucleotídica fue de 0.01.

Los valores reportados indican mayor diversidad genética por parte de las especies estudiadas con respecto a *A. michoacaensis*, sin embargo, esta especie mexicana únicamente se conoce por tener una distribución en la Cuenca del Cuitzeo y quizás con un esfuerzo de exploración en la distribución completa de su huésped (*Q. castanea*) podría determinarse de mejor forma si la diversidad genética reportada en este estudio contempla la mayor parte de la distribución de la especie o debe ser considerado como un estudio de estructura genética local para una especie de esta familia, y en caso de ser así, esta especie mexicana tendría valores equiparables a los de especies de Turquía, que resalta a nivel regional por ser un refugio durante las glaciaciones e indicaría la importancia de profundizar en el estudio de la fauna mexicana de Cynipidae.

Por otro lado, algunos de los estudios que se han realizado en el país (con especies de escarabajos descortezadores o vectores de enfermedades) y que emplean citocromo B, tienen valores ligeramente mayores de diversidad genética que los obtenidos aquí, pero son equiparables por área de muestreo y número de

individuos con los estudios hechos para la familia Cynipidae (e.g. Pfeiler *et al.* 2006, Anducho-Reyes *et al.* 2008, Sánchez-Sánchez *et al.* 2012, Pech-May *et al.* 2013). Además, si su distribución coincidiera con la de su huésped, podría asumirse que los valores reportados para un área como la que se trabajó representan valores elevados de diversidad genética y que pueden tener cierta relación con la importancia de la Faja Volcánica Transmexicana para especies con amplia distribución (e.g. Anducho-Reyes *et al.* 2008).

La cantidad y distribución de los haplotipos dominantes para citocromo B (Figura 2) e ITS 2 (Figura 3) son contrastantes en parte porque ITS 2 es un fragmento más conservado entre las poblaciones (por eso la falta de valores de diversidad genética en algunos sitios). Sin embargo, esos haplotipos pueden ser considerados como antiguos en la población y aparentemente dan un indicio de que la población real de *A. michoacaensis* es más abundante y su distribución geográfica es más amplia de lo que se pensaba. Podría pensarse que la falta de diversidad genética en algunos sitios (de ambos fragmentos), puede deberse al muestreo insuficiente o a tamaños poblacionales diferentes entre los sitios muestreados, pero una prueba hecha con una correlación de Spearman entre el número de individuos y el número de haplotipos encontrados en ambos fragmentos reveló que para el caso de citocromo B, el tamaño de muestra influye moderadamente en los valores obtenidos ($r = 0.6582$, $P < 0.001$), pero en el caso de ITS 2, si bien la relación positiva es débil, no es estadísticamente significativa ($r = 0.2959$, $P > 0.1$). De esta forma, los resultados son contradictorios y resulta difícil determinar un patrón en los valores de diversidad genética obtenidos, lo que refuerza la idea de que ampliar el muestreo permitiría obtener un mejor panorama de la diversidad genética de la especie.

Con respecto a los patrones de probable expansión poblacional, los valores de Tajima (D) y Fu (Fs) sugieren mayor número de mutaciones deletéreas y probable selección purificadora, por otro lado, valores negativos también se han asociado con diversificación reciente asociada a expansión poblacional considerando valores mayores de diversidad haplotípica con respecto a la diversidad nucleotídica (e.g. Mutun 2016), algo similar a lo que sucede con *A.*

michoacaensis en este estudio. Sin embargo, en ninguno de los casos los valores obtenidos para los fragmentos son significativos y no puede haber certeza en ellos y de las conclusiones que se han obtenido en otros estudios realizados con estas avispas.

Los resultados de AMOVA también presentan resultados contrastantes entre los fragmentos estudiados. En el caso de citocromo B, el análisis general indica que la variación es explicada completamente dentro de las poblaciones y el valor de F_{st} indica que no existe estructura genética, y al agrupar de acuerdo al uso de suelo o tipo de vegetación, los valores son prácticamente iguales. Estos resultados están relacionados con la distribución geográfica de los haplotipos (Figura 2) y, considerando que los valores obtenidos no son significativos, su distribución es prácticamente azarosa, al menos para este análisis en la Cuenca del Cuitzeo. Por otro lado, la AMOVA general correspondiente a ITS 2 indica que existe bastante estructura genética para *A. michoacaensis* de acuerdo al valor de F_{st} (≈ 0.3), y la mayor parte de la variación detectada es explicada dentro de las poblaciones ($\approx 70\%$) y parcialmente entre poblaciones ($\approx 30\%$), lo que puede apreciarse visualmente al observarse que los haplotipos 1 y 3 están bastante restringidos en su distribución (Figura 3).

La división de los sitios de acuerdo al tipo de uso de suelo o vegetación (para ITS 2) permite obtener un valor similar de F_{st} , y los porcentajes de variación cambian ligeramente con respecto a los anteriores, pero prácticamente dan lugar a las mismas conclusiones en ambos casos (los resultados de ANOVA corroboran esto, al indicar que no hubo efecto significativo entre las categorías y los valores de diversidad).

Considerando ambos fragmentos, pese a que los resultados con citocromo B no son estadísticamente significativos, es evidente que la mayor contribución a la variación es explicada dentro de las poblaciones, es decir, dentro de cada sitio considerado en el muestreo. Además, la división considerando el uso de suelo o vegetación no aporta ningún valor significativo para explicar la variación, lo que sugiere que la fragmentación a la que se ha sometido a los encinares de la Cuenca del Cuitzeo no ha ejercido un efecto significativo sobre la estructura

genética de *A. michoacaensis*, quizás porque el tiempo a partir del aumento intensivo de la fragmentación no ha sido suficiente para que se refleje genéticamente en la especie y quizás se asocia a una vegetación relictual de bosque de encino, posiblemente continua en toda la Cuenca del Cuitzeo, de tal modo que los haplotipos aún no dan indicio de una distinción geográfica en cuanto a la selección de huéspedes o ambientes.

A partir del análisis de redes puede observarse que existen haplotipos dominantes en cada fragmento (Figuras 2 y 3). Este análisis indica que los haplotipos más frecuentes y mejor distribuidos en la población probablemente son ancestrales (Posada y Crandall 2001) y que existe un número relativamente grande de haplotipos recientes, que de cierta forma están en sintonía con los resultados obtenidos con la D de Tajima y F_s de Fu (no significativos) con respecto a una probable expansión poblacional a partir de una diversificación relativamente reciente, no obstante, es necesario aumentar el muestreo con la finalidad de obtener valores significativos sobre una probable expansión poblacional y para obtener una mejor representación de los haplotipos en la especie y ver si la dominancia de los haplotipos sigue manteniéndose a través de un mayor área geográfica.

La autocorrelación espacial es importante para ver si existen patrones geográficos asociados a la forma en que se distribuyen los datos genéticos, además de ser una herramienta exploratoria de gran valor en los esfuerzos de conservación (Hardy y Vekemans 1999, Escudero *et al.* 2003). El análisis de autocorrelación genética espacial para citocromo B (Figura 4) vuelve a confirmar que no existe relación significativa entre el valor observado con procesos aleatorios (considerando el índice de Moran), lo que es congruente con los demás análisis de relación que se probaron en este fragmento (pruebas de neutralidad, AMOVA, ANOVA), con la única excepción del número de individuos y su relación con el número de haplotipos de acuerdo al análisis de correlación de Spearman que se hizo y que sugiere influencia de muestreo.

Esto sugiere que para citocromo B todos los resultados pueden explicarse a partir de su distribución aleatoria en el área de estudio, de tal manera que no

puede sugerirse patrones distintos del azar con base en el esfuerzo realizado. En este sentido, Epperson (1990) sugirió que un alto flujo de genes entre poblaciones puede suprimir el desarrollo de una autocorrelación espacial, de tal manera que este resultado también podría dar sustento a un alto flujo génico para *A. michoacaensis*, aunque no puede rechazarse la posibilidad de que exista algún tipo de selección influyendo sobre el resultado obtenido de autocorrelación. Sin embargo, en el mismo análisis para ITS 2 (Figura 5) se aprecia que existen intervalos de distancia en los cuales el valor obtenido no corresponde con procesos aleatorios. El primer caso corresponde a la comparación dentro de cada sitio de muestreo, es decir, a una distancia de 0 km, e indica que existe una tendencia moderada de los haplotipos ($I = 0.39$) a estar agrupada en ese nivel, y que además puede asociarse ampliamente con los valores de F_{st} dentro de las poblaciones (sitios de muestreo) indicando que el patrón no es aleatorio y que existe algún factor que promueve la agrupación.

En el segundo caso (≈ 25 km), el valor indica que la distribución de las frecuencias es ligeramente dispersa ($I = -0.109$) por procesos no aleatorios, lo que también puede asociarse con el valor de variación que se obtiene en las comparaciones entre sitios (30%). El último caso (≈ 35 km) vuelve a indicar que las frecuencias tienen una ligera tendencia a agruparse ($I = 0.108$). Si bien estos tres intervalos de distancia indican que el valor observado se desvía de procesos aleatorios, en general no puede apreciarse una tendencia general clara sobre las frecuencias de haplotipos y las distancias, de tal manera que todo parece indicar (aunque en menor grado con respecto a citocromo B) que existe alto flujo génico en la especie para ITS 2 (Epperson 1990, Bertorelle y Barbujani 1995).

Por otro lado, estos resultados contrastan fuertemente con los de Mutun y Atay (2015) utilizando los mismos fragmentos, pues ellos encuentran que citocromo B sí tiene valores de autocorrelación espacial significativos y en ITS 2 obtienen valores que no son estadísticamente significativos (aunque con dos intervalos bien definidos y mayores que los empleados en este trabajo), mientras que Mutun (2016) encuentra que al intervalo de 50 km ambos no son significativos y en el de 100 km sí lo son. Ambos estudios y los resultados obtenidos en este

trabajo indican que los valores están en función del área de muestreo y de las especies estudiadas, por lo que las conclusiones deben ser tomadas con precaución antes de asumir que puede tratarse de un patrón general para la familia. Epperson (1990) da pruebas de que los loci utilizados en diferentes estudios, si bien pueden variar ligeramente, deben dar valores de alguna manera similares, y en caso de no ser así, puede ser una prueba indirecta de que podría estar presentándose selección sobre alguno de ellos y de esa manera se esté alterando el patrón. Que este proceso esté ocurriendo con *A. michoacaensis* no puede ser demostrado con los datos que se tienen y de nuevo surge la necesidad de aumentar el esfuerzo de muestreo para tratar de comprobar qué es lo que realmente está sucediendo con la especie.

Muchos factores pueden dar lugar a los resultados contrastantes entre los fragmentos analizados, por ejemplo, pueden ser indicio de patrones de mutación distintos entre las secuencias o presiones de selección contrastantes entre los fragmentos analizados, lo que concuerda además con las diferentes estrategias de herencia que siguen el ADN de mitocondria, en el caso de citocromo B, y el ADN nuclear, en el caso de ITS 2 (Brown *et al.* 1979, Moritz *et al.* 1987, Zhang y Hewitt 2003). Mutun y Atay (2015) mencionan que ITS 2 puede no ser una buena opción en estudios poblacionales, pero esa afirmación contrasta con el patrón de diferenciación obtenida en este trabajo con el análisis de AMOVA. Además, Mutun y Atay (2015) encuentran mayor resolución en sus resultados con citocromo B que con ITS2, lo contrario a lo que se encontró para esta especie en México. Por otro parte, Mutun (2016) reporta mucha variabilidad en sus individuos con ITS 2 y Rokas *et al.* (2002) mencionan que ITS 2 varía tanto en algunas ocasiones (entre especies) que es poco informativo. Un aspecto a destacar en este sentido es que quizás la especie estudiada por Mutun (2016) en realidad se trate de un complejo de especies crípticas y eso contribuya a su gran diversidad genética para ITS 2.

Si bien no es raro encontrar especies crípticas dentro de esta familia de avispas (*e.g.* Péntzes *et al.* 2009, Ács *et al.* 2010, Nicholls *et al.* 2012), los resultados obtenidos con ITS 2 refuerzan la idea de que todos los individuos estudiados de *A. michoacaensis* corresponden a la misma especie. Este estudio

también aporta datos para solucionar parte de la problemática actual sobre la delimitación taxonómica de este género y los diferentes puntos de vista en cuanto a su clasificación (Melika *et al.* 2011, Nieves-Aldrey *et al.* 2012, Pujade-Villar y Ferrer-Suay 2015b). Por ejemplo, el gran número de haplotipos y su escasa diferenciación de acuerdo a las redes de haplotipos (Figuras 2 y 3), sugieren que, si bien se trata de la misma especie, los haplotipos surgieron recientemente (Crandall y Templeton 1993), lo que puede dar un panorama sobre los probables patrones que pueden presentarse en este género.

En la literatura se habla de presiones de selección impuestas sobre este grupo de avispa por parasitoides. Por ejemplo, Seibert (1993) menciona que *Disholcaspis perniciososa* tiene un porcentaje de sobrevivencia de 25.3 %, a pesar de que esta especie tiene una estrecha relación con hormigas que les brindan protección, por el contrario, la exclusión de las hormigas hizo que el porcentaje fuera de 0 %. Este tipo de estudios demuestra que los parasitoides son un factor de importancia en la dinámica poblacional de las avispa agalleras, y su evaluación puede dar un panorama más claro en los estudios de estructura poblacional y/o filogeografía (*e.g.* Hayward y Stone 2006).

Se ha demostrado que insectos fitófagos de la misma especie con diferentes especies de huéspedes, o poblaciones en distintos ambientes de la misma especie huésped, tienen afinidad sobre la cual se desarrollan, de tal manera que a largo plazo puede ser un factor que permita el aislamiento de la especie parásita (Egan *et al.* 2013, Egan *et al.* 2012a). Si se asocia esto con la taxonomía compleja del género (Melika *et al.* 2011, Nieves-Aldrey *et al.* 2012, Pujade-Villar y Ferrer-Suay 2015b) y con la ocurrencia de especies en más de un encino rojo (*e.g.* se piensa que *Amphibolips zacatecaensis* podría estar asociada con *Quercus eduardii* y *Q. conzatii*), es posible que *A. michoacaensis* esté distribuida en más sitios que únicamente en la Cuenca del Cuitzeo o en la distribución conocida de *Q. castanea*, y quizás un mayor esfuerzo de exploración para esta especie, y para el género en general, permitirá tener una mejor idea de los patrones en el país. Por lo tanto, para corroborar el patrón observado faltaría analizar, en primer lugar, un área geográfica mayor para ver si los resultados se

mantienen con el cambio en escala, en segundo lugar, un mayor número de secuencias de ADN, porque permitiría tener un mejor consenso sobre la historia evolutiva de la especie, y en tercer lugar, a otra especie emparentada del mismo género con una especie de huésped cuya distribución sea más restringida, para ver si los resultados obtenidos corresponden a la distribución y/o ubicación de la planta huésped, o los resultados que se obtuvieron en este estudio son más bien un patrón general para el género *Amphibolips*.

A pesar de la gran cantidad de estudios realizados en Europa con este grupo de avispas, no es posible aceptar los patrones (y sus causas) de diversidad genética para nuestro país, principalmente porque la historia geológica y climática no es igual y nunca se han integrado especies mexicanas en dichos estudios. El conjunto de datos presentados en este trabajo soporta en gran medida que el área de distribución de *A. michoacaensis* es mayor que la planteada en la descripción original de la especie y probablemente se extienda a la distribución de su huésped (*Q. castanea*). Además, si este es el caso, la especie presenta gran diversidad genética, cuando menos para la Cuenca del Cuitzeo. Finalmente, a pesar de que para algunas especies se ha sugerido una capacidad de desplazamiento pobre (e.g. Price *et al.* 2004), los datos obtenidos en este trabajo indican que, cuando menos para esta especie y considerando su distribución en la Cuenca del Cuitzeo, las dificultades al desplazamiento por vuelo no son muy fuertes en ausencia de barreras físicas, independientemente de que no se conoce si el desplazamiento es a través de vuelo activo o pasivo.

VII. CONCLUSIONES

Conocer la diversidad y estructura genética es de gran importancia, principalmente porque permiten tener un panorama sobre algunos de los procesos que pueden estar influyendo en la especie y nos permite profundizar en el conocimiento biológico. Además, los esfuerzos de conservación de especies necesitan datos de genética para tener un mejor sustento sobre las políticas a implementar para proteger la biodiversidad.

Por otro lado, la compleja interacción con sus huéspedes vuelve a estas avispas de interés por la cantidad de información que pueden proporcionar con respecto a procesos de coevolución y los mecanismos a través de los cuales se da la inducción y desarrollo de las agallas, así como la importancia de entender el por qué de la existencia de gran variedad de morfologías, particularmente en México. Asimismo, tratándose de especies de avispas agalleras de árboles representativos e importantes de las montañas mexicanas, cualquier información será de utilidad para evaluar su potencial como especies plaga o comparar sus datos con otras especies que ya son consideradas plagas o invasoras y advertir opciones de control o prevención.

La información reportada en este trabajo indica que es necesario aumentar el esfuerzo de colecta para *A. michoacaensis*, de tal modo que quizás realizar un muestreo en la distribución completa de la especie huésped (*Q. castanea*) permitirá tener una visión más clara sobre la estructura genética de esta especie, además, el empleo de una mayor cantidad de marcadores genéticos sería de utilidad para contrarrestar las tasas evolutivas diferenciales en los marcadores y obtener el patrón general.

Por otra parte, con los resultados que se obtuvieron puede decirse que el área de estudio representa un estudio local, es decir, la distribución de esta especie es mayor que la contemplada en su descripción original. Los valores de diversidad genética para la Cuenca del Cuitzeo indican que, cuando menos de forma local, la especie tiene valores relativamente altos y que son equiparables hasta cierto punto a los reportados en otras regiones de Europa y principalmente con los de Turquía, que se piensa representó un refugio durante las glaciaciones,

y que a partir de ahí muchas especies recolonizaron Europa; aún faltaría investigar la importancia de la Cuenca del Cuitzeo, o de la Faja Volcánica Transmexicana, con respecto a la diversidad genética general que pudiera presentar esta especie en toda su distribución.

La distribución de *Q. castanea* es amplia en el país, se encuentra en muchos ambientes y presenta gran diversidad genética, entonces, lo más probable es que *A. michoacaensis* también tenga valores elevados de diversidad genética, de tal modo que le permitan sobrevivir a su huésped. Además, la amplia distribución de la especie huésped, el tamaño corporal de la avispa, el desarrollo alar y los resultados de este estudio indican alta movilidad por parte de esta avispa, y el aporte que se ha hecho para este género, y para la especie en particular, permitirá desarrollar estrategias futuras que permitan profundizar y esclarecer el conocimiento existente con respecto a su taxonomía, sistemática, ecología y evolución.

VIII. LITERATURA CITADA

- Abe Y y K Miura. 2002. Does *Wolbachia* induce unisexuality in oak gall wasps? (Hymenoptera: Cynipidae). *Annals of the Entomological Society of America* 95: 583-586.
- Abe Y, G Melika y GN Stone. 2007. The diversity and phylogeography of cynipid gallwasps (Hymenoptera: Cynipidae) of the oriental and eastern palearctic regions, and their associated communities. *Oriental Insects* 41: 169-212.
- Abe Y, M Bhuyan, J Mech, PR Bhattacharyya, T Ide, M Mishima, C Suyama, S Sato, K Matsuo y N Wachi. 2012. Discovery of an oak gall wasp (Hymenoptera: Cynipidae) inducing galls on deciduous oak trees in India. *Entomological Science* 15: 340-342.
- Abe Y, T Ide, K Konishi y T Ueno. 2014. Discovery of Cynipidae (Hymenoptera: Cynipoidea) from the Indochina region, with description of three new species. *Annals of the Entomological Society of America* 107: 399-406.
- Abe Y. 1991. Host race formation in the gall wasp *Andricus mukaigawae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 58: 15-20.
- Abrahamson WG, G Melika, R Scrafford y G Csöka. 1998. Gall-inducing insects provide insights into plant systematic relationships. *American Journal of Botany* 85: 1159-1165.
- Abrahamson WG, MD Hunter, G Melika y PW Price. 2003. Cynipid gall-wasp communities correlate with oak chemistry. *Journal of Chemical Ecology* 29: 209-223.
- Ács Z, G Melika, Z Péntzes, J Pujade-Villar y GN Stone. 2007. The phylogenetic relationships between *Dryocosmus*, *Chilaspis* and allied genera of oak gallwasps (Hymenoptera, Cynipidae: Cynipini). *Systematic Entomology* 32: 70-80.
- Ács Z, RJ Challis, P Bihari, M Blaxter, A Hayward, G Melika, G Csóka, Z Péntzes, J Pujade-Villar, JL Nieves-Aldrey, K Schönrogge y GN Stone. 2010. Phylogeny and DNA barcoding of inquiline oak gallwasps (Hymenoptera: Cynipidae) of the Western Palearctic. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55: 210-225.

- Agrawal AA, AP Hastings, MTJ Johnson, JL Maron y JP Salminen. 2012. Science 338: 113-116.
- Allende TC, ME Mendoza, EM López-Granados y LM Morales-Manilla. 2009. Hydrogeographical regionalisation: an approach for evaluating the effects of land cover change in watersheds. A case study in the Cuitzeo lake watershed, central Mexico. Water Resources Manage 23: 2587-2603.
- Allison SD y JC Schultz. 2005. Biochemical responses of chestnut oak to a galling cynipid. Journal of Chemical Ecology 31: 151-166.
- Anducho-Reyes MA, AI Cognato, JL Hayes y G Zúñiga. 2008. Phylogeography of the bark beetle *Dendroctonus mexicanus* Hopkins (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). Molecular Phylogenetics and Evolution 49: 930-940.
- Armbruster WS. 1997. Exaptations link evolution of plant-herbivore and plant-pollinator interactions: a phylogenetic inquiry. Ecology 78 (6): 1661-1672.
- Askew RR. 1984. The biology of gall wasps. En: Ananthakrishnan TN (ed.). The biology of galling insects. Oxford & IBH Publ. Nueva Delhi, India. 223-271.
- Atkinson RJ, A Rokas y GN Stone. 2007. Chapter 4. Longitudinal patterns in species richness and genetic diversity in European oaks and oak gallwasps. En: Weiss S y N Ferrand (eds.). Phylogeography of southern european refugia: evolutionary perspectives on the origins and conservation of european biodiversity. Springer. Holanda. 127-151 pp.
- Atkinson RJ, GAT McVean y GN Stone. 2002. Use of population genetic data to infer oviposition behaviour: species-specific patterns in four oak gallwasps (Hymenoptera: Cynipidae). Proceedings of the Royal Society of London, B 269: 383-390.
- Atkinson RJ, GS Brown y GN Stone. 2003. Skewed sex ratios and multiple founding in galls of the oak apple gall wasp *Biorhiza pallida*. Ecological Entomology 28: 14-24.
- Barrera-Ruíz UM, D Cibrián-Tovar, MCM Llanderal-Cázares, VD Cibrián-Llanderal y A Lagunes-Tejeda. 2016. Chemical combat of gall wasps *Andricus quercuslaurinus* Melika & Pujade-Villar (Cynipidae) in *Quercus affinis*

- Scheidw. Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente 22: 115-123.
- Bayer MH. 1983. Phospholipids and lipid acyl hydrolase (phospholipase) in leaf galls (Hymenoptera: Cynipidae) of black oak [*Quercus robur* L.]. Plant Physiology 73: 179-181.
- Begon M, CR Townsend y JL Harper. 2006. Ecology: from individuals to ecosystems. Blackwell Publishing, Oxford, R.U. 738 pp.
- Bello-González MA y JN Labat (eds.). 1987. Los encinos (*Quercus*) del estado de Michoacán, México. Centre d'Etudes Mexicaines et Centroaméricaines - Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos - Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. México. 98 pp.
- Bertorelle G y G Barbujani. 1995. Analysis of DNA diversity by spatial autocorrelation. Genetics 140: 811-819.
- Beutenmüller W. 1909. The species of *Amphibolips* and their galls. Bulletin of the American Museum of Natural History 26: 47-66.
- Bihari P, B Sipos, G Melika, B Fehér, K Somogyi, GN Stone y Z Péntzes. 2011. Western palaeartic phylogeography of an inquiline oak gall wasp, *Synergus umbraculus*. Biological Journal of the Linnean Society 102: 750-764.
- Bronner R. 1985. Anatomy of the ovipositor and oviposition behavior of the gall wasp *Diplolepis rosae* (Hymenoptera: Cynipidae). The Canadian Entomologist 117: 849-858.
- Brown WM, M George Jr y AC Wilson. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. PNAS 76: 1967-1971.
- Buffington ML y SI Morita. 2009. Not all oak gall wasps gall oaks: the description of *Dryocosmus rileypokei*, a new, apostate species of Cynipini from California. Proceedings of Entomological Society of Washington 111: 244-253.
- Challis RJ, S Mutun, JL Nieves-Aldrey, S Preuss, A Rokas, A Aebi, E Sadeghi, M Tavakoli y GN Stone. 2007. Longitudinal range expansion and cryptic eastern species in the western Palaeartic oak gallwasp, *Andricus coriarius*. Molecular Ecology 16: 2103-2114.

- Cheng D, G Liang y Y Xu. 2016. Meta-analysis reveals asymmetric reduction in the genetic diversity of introduced populations of exotic insects. *Biological Invasions* 18: 1163-1175.
- Clement M, D Posada y KA Crandall. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657-1659.
- Cook JM, A Rokas, M Pagel y GN Stone. 2002. Evolutionary shifts between host oak sections and host-plant organs in *Andricus* gallwasps. *Evolution* 56: 1821-1830.
- Cook MT. 1913. The development of insect galls as illustrated by the genus *Amphibolips*. Delaware College: 363-367.
- Cornell HV. 1983. The secondary chemistry and complex morphology of galls formed by the Cynipinae (Hymenoptera): why and how? *American Midland Naturalist* 110: 225-234.
- Crandall KA y AR Templeton. 1993. Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics* 134: 959-969.
- Csöka G, GN Stone y G Melika. 2004. Biology, Ecology, and Evolution of gall-inducing Cynipidae. En: Raman A, CW Schaefer y TM Withers (eds.). *Biology, Ecology, and Evolution of gall-inducing arthropods*. Science Publishers Inc. New Hampshire, EU. 573-642.
- Culver M, R Fitak y HW Herrmann. 2011. Genetic methods for biodiversity assessment. En: Magurran AE y BJ McGill (eds.). *Biological diversity: frontiers in measurement and assessment*. Oxford University Press. Reino Unido. 208-218.
- Díaz NB, FE Gallardo y SP Durante. 2002. Estado del conocimiento de los Cynipoidea en la región Neotropical (Hymenoptera). En: Costa C, A Vanin, JM Lobo y A Melic (eds.). *Proyecto de Red Iberoamericana de Biogeografía y Entomología Sistemática, PrIBES 2002. Monografías Tercer Milenio. Vol. 2*. Sociedad Entomológica Aragonesa, Zaragoza. 231-237.

- Dinç S y S Mutun. 2011. PCR-RFLP variation of the oak gall wasp, *Andricus quercustozae* (Bosc, 1792) (Hymenoptera: Cynipidae) from Turkey. *Turkiye Entomoloji Dergisi* 35: 47-58.
- Dowton M y AD Austin. 1995. Increased genetic diversity in mitochondrial genes is correlated with the evolution of parasitism in the Hymenoptera. *Journal of Molecular Evolution* 41: 958-965.
- Egan SP, GR Hood y JR Ott. 2012b. Testing the role of habitat isolation among ecologically divergent gall wasp populations. *International Journal of Ecology* 2012: 809897.
- Egan SP, GR Hood, G DeVela y JR Ott. 2013. Parallel patterns of morphological and behavioral variation among host-associated populations of two gall wasp species. *PLoS ONE* 8: e54690.
- Egan SP, GR Hood, JL Feder y JR Ott. 2012a. Divergent host-plant use promotes reproductive isolation among cynipid gall wasp populations. *Biology Letters* 8: 605-608.
- Epperson BK. 1990. Spatial autocorrelation of genotypes under directional selection. *Genetics* 124: 757-771.
- Escudero A, JM Iriondo y ME Torres. 2003. Spatial analysis of genetic diversity as a tool for plant conservation. *Biological Conservation* 113: 351-365.
- Espírito-Santo MM y GW Fernandes. 2007. How many species of gall-inducing insects are there on Earth, and Where are they? *Annals of the Entomological Society of America* 100: 95-99.
- Excoffier L y HEL Lischer. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564-567.
- Ferrari L, T Orozco-Esquivel, V Manea y M Manea. 2012. The dynamic history of the Trans-Mexican Belt and the Mexico subduction zone. *Tectonophysics* 522-523: 122-149.
- Fu YX. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915-925.

- Giron D, E Huguet, GN Stone y M Body. 2016. Insect-induced effects on plants and possible effectors used by galling and leaf-mining insects to manipulate their host-plant. *Journal of Insect Physiology* 84: 70-89.
- Hardy OJ y X Vekemans. 1999. Isolation by distance in a continuous population: reconciliation between spatial autocorrelation analysis and population genetics models. *Heredity* 83: 145-154.
- Hardy OJ y X Vekemans. 2002. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes* 2: 618-620.
- Harper LJ, K Schönrogge, KY Lim, P Francis y CP Lichtenstein. 2004. Cynipid galls: insect-induced modifications of plant development create novel plant organs. *Plant, Cell and Environment* 27: 327-335.
- Hayward A y GN Stone. 2006. Comparative phylogeography across two trophic levels: the oak gall wasp *Andricus kollari* and its chalcid parasitoid *Megastigmus stigmatizans*. *Molecular Ecology* 15: 479-489.
- Hearn J, GN Stone, L Bunnefeld, JA Nicholls, NH Barton y K Lohse. 2014. Likelihood-based inference of population history from low-coverage *de novo* genome assemblies. *Molecular Ecology* 23: 198-211.
- Hernández-Soto P, M Lara-Flores, L Agredano-Moreno, LF Jiménez-García, P Cuevas-Reyes y K Oyama. 2015. Developmental morphology of bud galls induced on the vegetative meristems of *Quercus castanea* by *Amphibolips michoacaensis* (Hymenoptera: Cynipidae). *Botanical Sciences* 93: 685-693.
- Herrera-Arroyo ML, VL Sork, A González-Rodríguez, V Rocha-Ramírez, E Vega y K Oyama. 2013. Seed-mediated connectivity among fragmented populations of *Quercus castanea* (Fagaceae) in a mexican landscape. *American Journal of Botany* 100: 1663-1671.
- Inbar M, I Izhaki, A Koplovich, I Lupo, N Silanikove, T Glasser, Y Gerchman, A Perevolotsky y S Lev-Yadum. 2010. Why do many galls have conspicuous colors? A new hypothesis. *Arthropod-Plant Interactions* 4: 1-6.
- Jermiin LS y RH Crozier. 1994. The cytochrome b region in the mitochondrial DNA of the ant *Tetraponera rufoniger*. sequence divergence in Hymenoptera may

- be associated with nucleotide content. *Journal of Molecular Evolution* 38: 282-294.
- JMP. Versión 8. SAS Institute Inc. Cary, Carolina del Norte, Estados Unidos. 1989-2007.
- Kinsey AC. 1920. Phylogeny of cynipid genera and biological characteristics. *Bulletin American Museum of Natural History* 42: 357-402.
- Kinsey AC. 1937. New mexican gall wasps (Hymenoptera, Cynipidae). II. *Revista de Entomologia* 7: 428-471.
- Kohnen A, I Richter y R Brandl. 2012. No concordant phylogeographies of the rose gall wasp *Diplolepis rosae* (Hymenoptera, Cynipidae) and two associated parasitoids across Europe. *PLoS ONE* 7: e47156.
- Kohnen A, V Wissemann y R Brandl. 2011. No host-associated differentiation in the gall wasp *Diplolepis rosae* (Hymenoptera: Cynipidae) on three dog rose species. *Biological Journal of the Linnean Society* 102: 369-377.
- Kremer A, AG Abbott, JE Carlson, PS Manos, C Plomion, P Sisco, ME Staton, S Ueno y GG Vendramin. 2012. Genomics of Fagaceae. *Tree Genetics & Genomes* 8: 583-610.
- Lankau RA y SY Strauss. 2007. Mutual feedback maintain both genetic and species diversity in a plant community. *Science* 317: 1561-1563.
- Librado P y J Rozas. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Liljeblad J y F Ronquist. 1998. A phylogenetic analysis of higher-level gall wasp relationships (Hymenoptera: Cynipidae). *Systematic Entomology* 23: 229-252.
- Liljeblad J, F Ronquist, JL Nieves-Aldrey, F Fontal-Cazalla, P Ros-Farre, D Gaitros y J Pujade-Villar. 2008. A fully web-illustrated morphological phylogenetic study of relationships among oak gall wasps and their closest relatives (Hymenoptera: Cynipidae). *Zootaxa* 1796. 1-73.
- Liljeblad J, JL Nieves-Aldrey, S Neser y G Melika. 2011. Adding another piece to the cynipoid puzzle: the description of a new tribe, genus and species of gall

- wasp (Hymenoptera: Cynipidae) endemic to The Republic of South Africa. *Zootaxa* 2806: 35-52.
- Liu Z y F Ronquist. 2006. Familia Cynipidae. En: Fernández F y MJ Sharkey (eds.). *Introducción a los Hymenoptera de la región Neotropical*. Sociedad Colombiana de Entomología y Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. 839-849.
- Liu Z, MS Engel y DA Grimaldi. 2007. Phylogeny and geological history of the cynipoid wasps (Hymenoptera: Cynipoidea). *American Museum Novitates* 3583: 48 pp.
- López E, G Bocco, M Mendoza, A Velázquez y JR Aguirre-Rivera. 2006. Peasant emigration and land-use change at the watershed level: a GIS-based approach in central Mexico. *Agricultural Systems* 90: 62-78.
- Luna-Vega I. 2008. Aplicaciones de la biogeografía histórica a la distribución de las plantas mexicanas. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 79: 217-241.
- Maldonado-López Y, P Cuevas-Reyes, A González-Rodríguez, G Pérez-López, C Acosta-Gómez y K Oyama. 2015a. Relationships among plant genetics, phytochemistry and herbivory patterns in *Quercus castanea* across a fragmented landscape. *Ecological Research* 30: 133-143.
- Maldonado-López Y, P Cuevas-Reyes, GN Stone, JL Nieves-Aldrey y K Oyama. 2015b. Gall wasp community response to fragmentation of oak tree species: importance of fragment size and isolated trees. *Ecosphere* 6(3): 31.
- Manos PS, JJ Doyle y KC Nixon. 1999. Phylogeny, biogeography, and processes of molecular differentiation in *Quercus* subgenus *Quercus* (Fagaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 12: 333-349.
- Manos PS, ZK Zhou y CH Cannon. 2001. Systematics of Fagaceae: phylogenetic tests of reproductive trait evolution. *International Journal of Plant Sciences* 162(6): 1361-1379.
- Martinson EO, JD Hackett, CA Machado y AE Arnold. 2015. Metatranscriptome analysis of fig flowers provides insights into potential mechanisms for mutualism stability and gall induction. *PLoS ONE* 10: e0130745.

- McVaugh R. 1974. Fagaceae. Flora Novo-Galiciana. Contributions from the University of Michigan Herbarium 12: 1-93.
- Medianero E y JL Nieves-Aldrey. 2010. The genus *Amphibolips* Reinhard (Hymenoptera: Cynipidae: Cynipini) in the Neotropics, with description of three new species from Panama. Zootaxa 2360: 47-62.
- Melika G y WG Abrahamson. 2002. Review of the world genera of oak cynipid wasps (Hymenoptera: Cynipidae: Cynipini). En: Melika G y C Thuróczy (eds.). Parasitic wasps: Evolution, Systematics, Biodiversity and Biological control. Agroinforme. Budapest, Hungría. 150-190.
- Melika G, A Equihua-Martínez, EG Estrada-Venegas, D Cibrián-Tovar, VD. Cibrián-Llenderal y J Pujade-Villar. 2011. New *Amphibolips* gallwasp species from Mexico (Hymenoptera: Cynipidae). Zootaxa 3105: 47-59.
- Mendoza ME, E López-Granados, D Geneletti, DR Pérez-Salicrup y V Salinas. 2011. Analysing land cover and land use change processes at watershed level: a multitemporal study in the lake Cuitzeo watershed, Mexico (1975-2003). Applied Geography 31: 237-250.
- Moritz C, TE Dowling y WM Brown. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. Annual Review of Ecology and Systematics 18: 269-292.
- Mutun S y G Atay. 2015. Phylogeography of *Trigonaspis synaspis* (Hymenoptera: Cynipidae) from Anatolia based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. European Journal of Entomology 112(2): 259-269.
- Mutun S y H Karagözoglu. 2015. Investigation of genetic variation among Turkish populations of *Andricus lignicola* using mitochondrial cytochrome b gene sequence data. Turkish Journal of Zoology 39: 721-733.
- Mutun S. 2010. Intraspecific genetic variation and phylogeography of the oak gallwasp *Andricus caputmedusae* (Hymenoptera: Cynipidae): effects of the Anatolian diagonal. Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae 56: 153-172.

- Mutun S. 2011. Intraspecific genetic diversity of the oak gall wasp *Andricus lucidus* (Hymenoptera: Cynipidae) populations in Anatolia. *Turkish Journal of Zoology* 35: 559-570.
- Mutun S. 2016. Molecular diversity and phylogeography of *Andricus curtisii* (Hymenoptera, Cynipidae) in Turkey. *Biochemical Systematics and Ecology* 67: 74-85.
- Nabity PD. 2016. Insect-induced plant phenotypes: revealing mechanisms through comparative genomics of galling insects and their hosts. *American Journal of Botany* 103: 979-981.
- Nicholls JA, RJ Challis, S Mutun y GN Stone. 2012. Mitochondrial barcodes are diagnostic of shared refugia but not species in hybridizing oak gallwasps. *Molecular Ecology* 21: 4051-4062.
- Nieves-Aldrey JL, E Pascual, Y Maldonado-López, E Medianero y K Oyama. 2012. Revision of the *Amphibolips* species of Mexico excluding the “*niger* complex” Kinsey (Hymenoptera: Cynipidae), with description of seven new species. *Zootaxa* 3545: 1-40.
- Nieves-Aldrey JL, FM Fontal-Cazalla y F Fernández. 2006. Filogenia y evolución de Hymenoptera. En: Fernández F y MJ Sharkey (eds.). *Introducción a los Hymenoptera de la región Neotropical*. Sociedad Colombiana de Entomología y Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. 37-56.
- Nieves-Aldrey JL, J Liljeblad, M Hernández-Nieves, A Grez y JAA Nylander. 2009. Revision and phylogenetics of the genus *Paraulax* Kieffer (Hymenoptera, Cynipidae) with biological notes and description of a new tribe, a new genus, and five new species. *Zootaxa* 2200: 1-40.
- Nixon KC. 1993. Infrageneric classification of *Quercus* (Fagaceae) and typification of sectional names. *Annales des Sciences Forestières* 50, Suppl 1: 25s-34s.
- Nordlander G, Z Liu y F Ronquist. 1996. Phylogeny and historical biogeography of the cynipoid wasp family Ibalidae (Hymenoptera). *Systematic Entomology* 21: 151-166.

- Nylander JAA, F Ronquist, JP Huelsenbeck y JL Nieves-Aldrey. 2004. Bayesian phylogenetic analysis of combined data. *Systematic Biology* 53: 47-67.
- Oliveira DC, RMS Isaias, GW Fernandes, BG Ferreira, RGS Carneiro y L Fuzaro. 2016. Manipulation of host plant cells and tissues by gall-inducing insects and adaptive strategies used by different feeding guilds. *Journal of Insect Physiology* 84: 103-113.
- Paine RT. 1980. Food webs: linkage, interaction strength and community infrastructure. *Journal of Animal Ecology* 49: 666-685.
- Paulson AR, CH Le, JC Dickson, J Ehlting, P von Aderkas y SJ Perlman. 2016. Transcriptome analysis provides insight into venom evolution in a seed-parasitic wasp, *Megastigmus spermotrophus*. *Insect Molecular Biology* 25: 604-616.
- Pech-May A, CF Marina, E Vázquez-Domínguez, M Berzunza-Cruz, EA Rebollar-Téllez, JA Narváez-Zapata, D Moo-Llanes, S Ibáñez-Bernal, JM Ramsey e I Becker. 2013. Genetic structure and divergence in populations of *Lutzomyia cruciata*, a phlebotomine sand fly (Diptera: Psychodidae) vector of *Leishmania mexicana* in southeastern Mexico. *Infection, Genetics and Evolution* 16: 254-262.
- Pénzes Z, G Melika, Z Bozsóki, P Bihari, I Mikó, M Tavakoli, J Pujade-Villar, B Fehér, D Fülöp, K Szabó, M Bozsó, B Sipos, K Somogyi y GN Stone. 2009. Systematic re-appraisal of the gall-usurping wasp genus *Synophrus* Hartig, 1843 (Hymenoptera: Cynipidae: Synergini). *Systematic Entomology* 34: 688-711.
- Peñaloza-Ramírez JM. 2011. Filogeografía e hibridación en cuatro especies del género *Quercus* (Fagaceae) en México. Tesis de doctorado. Morelia, Michoacán. Centro de Investigaciones en Ecosistemas. Universidad Nacional Autónoma de México. 146 pp.
- Pfeiler E, BG Bitler, JM Ramsey, C Palacios-Cardiel y TA Markov. 2006. Genetic Variation, population structure, and phylogenetic relationships of *Triatoma rubida* and *T. recurva* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the

- Sonoran Desert, insect vectors of the Chagas' disease parasite *Trypanosoma cruzi*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 41: 209-221.
- Posada D y KA Crandall. 2001. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology & Evolution* 16: 37-45.
- Price PW, GW Fernandes y GL Waring. 1987. Adaptive nature of insect galls. *Environmental Entomology* 16: 15-24.
- Price PW, WG Abrahamson, MD Hunter y G Melika. 2004. Using gall wasps on oaks to test broad ecological concepts. *Conservation Biology* 18: 1405-1416.
- Pujade-Villar J y M Ferrer-Suay. 2015a. *Andricus protuberans* n. sp. (Hymenoptera: Cynipidae: Cynipini), a new species of oak gallwasp from Mexico. *Dugesiana* 22(2): 115-120.
- Pujade-Villar J y M Ferrer-Suay. 2015b. Adjudicació genèrica d'espècies mexicanes d'ubicació dubtosa descrites per Kinsey i comentaris sobre la fauna mexicana (Hymenoptera: Cynipidae: Cynipini). *Butlletí de la Institució Catalana d'Història Natural* 79: 7-14.
- Pujade-Villar J, A Equihua-Martínez, EG Estrada-Venegas y C Chagoyán-García. 2009. Estado del conocimiento de los Cynipini (Hymenoptera: Cynipidae) en México: perspectivas de estudio. *Neotropical Entomology* 38: 809-821.
- Pujade-Villar J, A Equihua-Martínez, EG Estrada-Venegas y P Ros-Farré. 2008. Los cinípidos mexicanos no asociados a encinos (Hymenoptera: Cynipidae), perspectivas de estudio. *Orsis* 23: 87-96.
- Pujade-Villar J, D Bellido, G Segú y G Melika. 1999. Current state of knowledge of heterogony in Cynipidae (Hymenoptera, Cynipoidea). *Ses. Entom.* 11: 87-107.
- Reinhard H. 1865. Die hypothesen über die fortpflanzungsweise bei den eingeschlechtigen gallwespen. *Berliner Entomologische Zeitschrift* 9: 1-13.
- Rokas A, JAA Nylander, F Ronquist y GN Stone. 2002. A maximum-likelihood analysis of eight phylogenetic markers in gallwasps (Hymenoptera: Cynipidae): implications for insect phylogenetic studies. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 22: 206-219.

- Rokas A, RJ Atkinson, GS Brown, SA West y GN Stone. 2001. Understanding patterns of genetic diversity in the oak gallwasp *Biorhiza pallida*: demographic history or a *Wolbachia* selective sweep? *Heredity* 87: 294-304.
- Rokas A, RJ Atkinson, LMI Webster, G Csóka y GN Stone. 2003. Out of Anatolia: longitudinal gradients in genetic diversity support an eastern origin for a circum-Mediterranean oak gallwasp *Andricus quercustozae*. *Molecular Ecology* 12: 2153-2174.
- Romero-Rangel S, EC Rojas-Zenteno y LE Rubio-Licona. 2014. Familia Fagaceae. Fascículo 181. Rzedowski J y G Calderón de Rzedowski (eds.). Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes. Instituto de Ecología AC. Centro Regional del Bajío. Pátzcuaro, Michoacán, México. 167 pp.
- Ronquist F y J Liljeblad. 2001. Evolution of the gall wasp-host plant association. *Evolution* 55: 2503-2522.
- Ronquist F, JL Nieves-Aldrey, ML Buffington, Z Liu, J Liljeblad y JAA Nylander. 2015. Phylogeny, evolution and classification of gall wasps: the plot thickens. *PLoS ONE* 10: e0123301.
- Ronquist F. 1994. Evolution of parasitism among closely related species: phylogenetic relationships and the origin of inquilinism in gall wasps (Hymenoptera, Cynipidae). *Evolution* 48: 241-266.
- Ronquist F. 1995. Phylogeny and early evolution of the Cynipoidea (Hymenoptera). *Systematic Entomology* 20: 309-335.
- Ronquist F. 1999. Phylogeny, classification and evolution of the Cynipoidea. *Zoologica Scripta* 28: 139-164.
- Rzedowski J. 2006. Vegetación de México. 1ra edición digital. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. 504 pp.
- Sakai AK, FW Allendorf, JS Holt, DM Lodge, J Molofsky, KA With, S Baughman, RJ Cabin, JE Cohen, NC Ellstrand, DE McCauley, P O'Neil, IM Parker, JN Thompson y SG Weller. 2001 The population biology of invasive species. *Annual Review of Ecology and Systematics* 32: 305-332.

- Samways MJ, MA McGeoch y TR New (eds.). 2010. Insect conservation: a handbook of approaches and methods. Oxford University Press. Reino Unido. 441 pp.
- Sánchez-Sánchez H, G López-Barrera, JM Peñaloza-Ramírez, V Rocha-Ramírez y K Oyama. 2012. Phylogeography reveals routes of colonization of the bark beetle *Dendroctonus approximatus* Dietz in Mexico. *Journal of Heredity* 103: 638-650.
- Schönrogge K, LJ Harper y CP Lichtenstein. 2000. The protein content of tissues in cynipid galls (Hymenoptera: Cynipidae): similarities between cynipid galls and seeds. *Plant, Cell and Environment* 23: 215-222.
- Schönrogge K, T Begg, R Williams, G Melika, Z Randle y GN Stone. 2012. Range expansion and enemy recruitment by eight alien gall wasp species in Britain. *Insect Conservation and Diversity* 5: 298-311.
- Schowalter TD (ed.). 2006. Insect ecology: an ecosystem approach. Elsevier. Segunda edición. EU. 572 pp.
- Seibert TF. 1993. A nectar-secreting gall wasp and ant mutualism: selection and counter-selection shaping gall wasp phenology, fecundity and persistence. *Ecological Entomology* 18: 247-253.
- Sequencher ® version 5.4.5. DNA sequence analysis software. Gene Codes Corporation, Ann Arbor, Michigan, Estados Unidos. www.genecodes.com
- Shorthouse JD, D Wool y A Raman. 2005. Gall-inducing insects – Nature's most sophisticated herbivores. *Basic and Applied Ecology* 6: 407-411.
- Shorthouse JD. 1986. Significance of nutritive cells in insect galls. *Proceedings of Entomological Society of Washington* 88: 368-375.
- Speight MR, MD Hunter y AD Watt (eds.). 2008. Ecology of insects: concepts and applications. Wiley-Blackwell. Segunda edición. Singapur. 628 pp.
- Stille B. 1985. Population genetics of the parthenogenetic gall wasp *Diplolepis rosae* (Hymenoptera: Cynipidae). *Genetica* 67: 145-151.
- Stone GN y JM Cook. 1998. The structure of cynipid oak galls: patterns in the evolution of an extended phenotype. *Proceedings of the Royal Society of London, B* 265: 979-988.

- Stone GN y K Schönrogge. 2003. The adaptive significance of insect gall morphology. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 512-522.
- Stone GN y P Sunnucks. 1993. Genetic consequences of an invasion through a patchy environment - the cynipid gallwasp *Andricus quercuscalicis* (Hymenoptera: Cynipidae). *Molecular Ecology* 2: 251-268.
- Stone GN, A Hernández-López, JA Nicholls, E di Pierro, J Pujade-Villar, G Melika y JM Cook. 2009. Extreme host plant conservatism during at least 20 million years of host plant pursuit by oak gallwasps. *Evolution* 63: 854-869.
- Stone GN, K Schönrogge, RJ Atkinson, D Bellido y J Pujade-Villar. 2002. The population biology of Oak Gall Wasps (Hymenoptera: Cynipidae). *Annual Review of Entomology* 47: 633-668.
- Stone GN, R Atkinson, A Rokas, G Csóka y JL Nieves-Aldrey. 2001. Differential success in northwards range expansion between ecotypes of the marble gallwasp *Andricus kollari*: a tale of two lifecycles. *Molecular Ecology* 10: 761-778.
- Stone GN, RJ Atkinson, A Rokas, JL Nieves-Aldrey, G Melika, Z Ács, G Csöka, A Hayward, R Bailey, C Buckee y GAT McVean. 2008. Evidence for widespread cryptic sexual generations in apparently purely asexual *Andricus* gallwasps. *Molecular Ecology* 17: 652-665.
- Tajima F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.
- Tovar-Sánchez E y K Oyama. 2006. Effect of hybridization of the *Quercus crassifolia* x *Quercus crassipes* complex on the community structure of endophagous insects. *Oecologia* 147: 702-713.
- Triplehorn CA y NF Johnson (eds.). 2005. Borror and DeLong's Introduction to study of insects. Thomson - Brooks/Cole. Séptima edición. EU. 864 pp.
- Valencia-A S. 2004. Diversidad del género *Quercus* (Fagaceae) en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 75: 33-53.
- Valencia-Cuevas L, P Mussali-Galante, D Piñero, E Castillo-Mendoza, G Rangel-Altamirano y E Tovar-Sánchez. 2014. Hybridization of *Quercus castanea*

- (Fagaceae) across a red oak species gradient in Mexico. *Plant Systematics and Evolution* 301: 1085.
- Van Dyke F (ed.). 2008. *Conservation Biology: foundations, concepts, applications*. Segunda edición. Springer. E.U. 83-119.
- Vårdal H. 2006. Venom gland and reservoir morphology in cynipoid wasps. *Arthropod Structure & Development* 35: 127-136.
- Visser B, C Van Dooremalen, A Vázquez Ruiz y J Ellers. 2013. Fatty acid composition remains stable across trophic levels in a gall wasp community. *Physiological Entomology* 38: 306-312.
- Wachi N, Y Abe, N Inomata, AE Szmidt y H Tachida. 2012. Speciation history of three closely related oak gall wasps, *Andricus mukaigawae*, *A. kashiwaphilus*, and *A. pseudoflos* (Hymenoptera: Cynipidae) inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Molecular Ecology* 21: 4681-4694.
- Zhang DX y GM Hewitt. 2003. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology* 12: 563-584.