



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad Morelia

Transcriptómica de la ontogenia presentada por la agalla inducida por *Amphibolips michoacaensis* (Hymenoptera: Cynipidae) sobre su planta hospedera *Quercus castanea*.

## TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**PAULINA HERNÁNDEZ SOTO**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ALBERTO KEN OYAMA NAKAGAWA  
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD  
MORELIA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA  
FACULTAD DE CIENCIAS, DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
CELULAR, UNAM  
DR. MIGUEL LARA FLORES  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

MÉXICO, CD. MX.

MARZO, 2019.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad Morelia

Transcriptómica de la ontogenia presentada por la agalla inducida por  
*Amphibolips michoacaensis* (Hymenoptera: Cynipidae) sobre su planta  
hospedera *Quercus castanea*.

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**PAULINA HERNÁNDEZ SOTO**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ALBERTO KEN OYAMA NAKAGAWA  
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD  
MORELIA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA  
FACULTAD DE CIENCIAS, DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
CELULAR, UNAM  
DR. MIGUEL LARA FLORES  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

MÉXICO, CD. MX.

MARZO, 2019.



OFICIO CPCB/1031/2018

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.


LIC. IVONNE RAMÍREZ 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 Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 22 de octubre de 2018, se aprobó el siguiente jurado para el examen de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **HERNANDEZ SOTO PAULINA** con número de cuenta **511023291**, con la tesis titulada: "**Transcriptómica de la ontogenia presentada por la agalla inducida por *Amphibolips michoacaensis* (*Hymenoptera: Cynipidae*) sobre su planta hospedera *Quercus castanea***", bajo la dirección del Dr. Alberto Ken Oyama Nakagawa:

Presidente: Dr. Mauricio Ricardo Quesada Avendaño  
Vocal: Dr. Juan Servando Núñez Farfán  
Secretario: Dr. Luis Felipe Jiménez García  
Suplente: Dr. Antonio Gonzáles Rodríguez  
Suplente: Dr. Jorge Alberto Contreras Garduño

Sin otro particular, quedo de usted.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 25 de octubre de 2018.

  
DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA  
COORDINADOR DEL PROGRAMA



## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme brindado la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado y con ello cumplir mi sueño de ser una orgullosa egresada de la máxima casa de estudios de México, la UNAM. También agradezco al Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad así como a la Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad Morelia por el apoyo recibido durante esta investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme la beca para realizar los estudios de Doctorado en el programa de Posgrados de Ciencias Biológicas.

Agradezco a mi tutor principal al Dr. Ken Oyama por la confianza, apoyo y guía para el desarrollo de esta investigación sobre todo por su paciencia y aliento a concluir este trabajo. Agradezco a mi comité tutorial por su gran apoyo en la generación de datos así como en la aportación de sus valiosos conocimientos.

## **AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL**

En primer lugar, agradezco a dios por brindarme la oportunidad de realizar mis sueños, se que el siempre me acompaña, me guía y me da la fortaleza necesaria para cumplir todos mis proyectos.

A mis padres por siempre alentarme a ser una mejor persona no solo en lo personal también en lo académico, por su fe y confianza. Especialmente quiero agradecer a mi madre que ya no está conmigo, es por ella y para ella este logro, te lo debía mamá y aquí esta, es por ti que concluyo este ciclo, eres mi más grande ejemplo a seguir tu me enseñaste a perseguir y alcanzar mis sueños te amo, me haces mucha falta. Nuestros desvelos juntas están rindiendo frutos. Gracias Papa por creer en mí y por todo tu apoyo.

Agradezco a mis hermanos por todo su apoyo por inyectarme energía, alegría y confianza en todo momento, por creer y estar para mí. Ana eres mi sobrina favorita te quiero mucho. Rafa gracias por los ánimos para conseguir este logro.

Te agradezco Noe por apoyarme a lograr mis sueños se que a veces es difícil pero todo esfuerzo tiene recompensa. Que decir de mis dos motores de vida Josué y Santi ustedes son mi fuerza, mi determinación, mi fortaleza mis ganas de ser mejor y de luchar en la vida, agradezco a dios por esta hermosa familia.

Son innumerables las personas de las cuales he recibido apoyo para el desarrollo de este trabajo; agradezco a la Dra. Lourdes Agredano Moreno por todo su apoyo en el proceso de obtención de las micrografías electrónicas así como al Dr. Luis Felipe Jiménez García por todas las facilidades otorgadas.

Agradezco a la Dra. Lourdes por su gran calidez y hospitalidad durante mi estancia en Cuernavaca sin dejar de lado el gran apoyo en laboratorio y que decir del Dr. Miguel Lara una gran persona que me brindo todo su apoyo y conocimiento.

Al Dr. Víctor Rocha Ramírez por su valioso apoyo en el laboratorio así como en las colectas. A la Sra. Lolita por su gran colaboración en el laboratorio con el material, las soluciones y hasta con su ayuda en algunos experimentos. A mis compañeros de laboratorio que en su momento apoyaron este trabajo.

Agradezco al Dr. Alfredo Herrera Estrella y a la Dra. Martha Rendon por su colaboración e invaluable apoyo en la generación y ensamblaje de los transcriptomas de *novu* así como en los análisis de estos.

A la Dra. Eunice Kariño Betancourt por arduo trabajo en la generación del capítulo del libro y la Dra. Nancy Calderón Cortés por su gran aporte de conocimientos en los análisis transcriptómicos.



## Dedicatoria

A mi madre, mi modelo a seguir, agradezco a dios por haberme dado una mamá como  
tú, siempre estarás en mi corazón.

## ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	3
<b>CAPÍTULO I. Morfo-anatomía de la Ontogenia presentada por la Agalla inducida por <i>Amphibolips michoacanesis</i> sobre su planta hospedera <i>Quercus castanea</i>.....</b>	<b>13</b>
<b>ARTÍCULO REQUISITO: Developmental Morphology of bud galls induce on the vegetative meristems of <i>Quercus castanea</i> by <i>Amphibolips michoacaensis</i> (Hymenoptera: Cynipidae)</b>	
<b>CAPÍTULO II. Transcriptómica de la Ontogenia presentada por la Agalla inducida por <i>Amphibolips michoacanesis</i> sobre su planta hospedera <i>Quercus castanea</i>.....</b>	<b>18</b>
DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES.....	51
LITERATURA CITADA.....	58
<b>ANEXO: Book chapter: Ecological genomics of insect-plant interactions: The case of wasp-induced galls</b>	

## RESUMEN

Las agallas son el resultado de una compleja y elaborada interacción molecular e intracelular entre insectos inductores de agallas y sus plantas hospederas, mediante la cual el insecto altera dramáticamente el crecimiento, la morfogenética y como consecuencia la fisiología de su planta hospedera, cambios que tienen como resultado la formación de un órgano nuevo y desconocido dentro del crecimiento normal de la planta cuya función es proveer a la descendencia del insecto protección y nutrición, en otras palabras estas estructuras funcionan como “nodrizas” para los huevos del insecto, ya que este únicamente oviposita los huevos en la planta hospedera, dejando a la planta la formación de la agalla y con ello el cuidado, alimentación y protección de dicho huevo hasta su metamorfosis en adulto, proceso que le permite al insecto inductor de agallas completar su ciclo vital.

La especie *Amphibolips michoacaensis* induce agallas sobre el super hospedero *Quercus castanea*, análisis realizados a través de micrografías electrónicas muestran que esta agalla presenta una clara diferenciación tisular; tejido nutritivo, capa lignificada, tejido esponjoso y tejido epidérmico. La estructura que presenta cada uno de estos tejidos indican funciones específicas, cabe resaltar que estos tejidos muestran cambios que se presentan acorde al crecimiento de la agalla y que culminan con el “vaciado” celular de todas sus capas.

Los mecanismos moleculares a través de los cuales el insecto controla el crecimiento, diferenciación y desarrollo de la agalla aun no son claros, datos preliminares obtenidos en esta investigación, a través de comparaciones entre transcriptomas obtenidos de *novo* en diferentes estadios de crecimiento de la agalla inducida por *A. michoacaensis* sobre *Q. castanea*: estadios tempranos, medios y tardíos, muestran una sobre expresión de genes relacionados con crecimiento y diferenciación celular en estadios tempranos, mientras que en estadios tardíos de crecimiento se observa la sobre expresión de genes relacionados a procesos autofágicos y proteolíticos.

## ABSTRACT

Galls are the result of a complex and elaborate molecular and intracellular interaction between gall-inducing insects and their host plants, through which the insect dramatically alters growth, morphogenetic and as a consequence the physiology of its host plant, changes that have as result of the formation of a new and unknown organ within the normal growth of the plant whose function is to provide the offspring of the insect protection and nutrition, in other words these structures function as "wet nurses" for the eggs of the insect, since it only oviposits the eggs in the host plant, leaving the plant the formation of the gall and with it the care, feeding and protection of egg until its metamorphosis in adult, a process that allows it to complete the insect inductor of galls its life cycle.

The species *Amphibolips michoacaensis* induces galls on the super host *Quercus castanea*, analyzes carried out through electronic micrographs show that this gall has a clear tissue differentiation; nutritive tissue, lignified layer, spongy tissue and epidermal tissue. The structure of each of these tissues indicate specific functions, it should be noted that these tissues show changes that are consistent with the growth of the gall and culminating with the "emptying" of cells of all its layers.

The molecular mechanisms through which the insect controls the growth, differentiation and development of the gall are not yet clear, our preliminary data of the comparisons between transcriptomes obtained de novo at different stages of gall growth induced by *A. michoacaensis* on *Q. castanea*: early, middle and late stages show an overexpression of genes related to cellular growth and differentiation in early stages, while in late stages of growth, the over expression of genes related to autophagic and proteolytic processes.

## INTRODUCCIÓN

Las plantas son los organismos productores de la mayoría de los ecosistemas tanto terrestres como acuáticos, como base de la cadena alimenticia son fuente de alimentos de diversos animales, entre los cuales encontramos los insectos. A lo largo de la evolución se han establecido múltiples interacciones entre plantas e insectos; tróficas, reproductivas (polinización), protectoras, entre otras, en algunas de estas interacciones tanto la planta como el insecto tienen beneficios, en algunas otras la planta se ve afectada o incluso no tiene repercusión alguna por la interacción (Stam *et al.*, 2014). Diferentes especies de insectos han evolucionado de manera conjunta con diferentes especies de plantas a tal grado, que algunas especies de insectos han desarrollado la capacidad de manipular el crecimiento y diferenciación de las plantas a fin de utilizarlas a manera de “nodrizas” de su progenie. El insecto únicamente oviposita sus huevos dejando el cuidado, alimentación, y protección de la progenie a la planta. Los insectos inductores de agallas seleccionan una planta hospedadora para ovipositar su (s) huevos, induciendo con ello la generación de una estructura nueva y desconocida por el crecimiento normal de la planta, llamada agalla, la cual proporciona a su progenie, cuidado y alimentación.

Las agallas representan una interacción de herbivoría elaborada y compleja entre plantas e insectos. Existen registros fósiles de esta asociación interespecífica, desde el carbonífero superior hace 300 millones de años, existían agallas en peciolos de helechos arbóreos (Labandeira and Phillips, 1996), lo que indica una antigua y duradera relación. Actualmente se encuentran agallas en una gran variedad de plantas superiores, más del 95% de los insectos gallícolas inducen agallas en angiospermas, especialmente en dicotiledóneas (Nieves, 1998).

La palabra agalla (en inglés “gall”) se deriva del latín galla, término que hace referencia a excrecencias producida por árboles, particularmente encinos, las cuales también son conocidas con el nombre de cecidias, termino derivado del griego “kekis” una raíz más antigua que el latín (Boggs and Chatfield, 2015). Las agallas son conocidas desde la antigüedad; los griegos y chinos las usaban en la medicina herbaria, además de ser conocidas y reconocidas como una fuente de taninos y productos relacionados (Fagan, 1918)

En el pasado, particularmente en el siglo XVII, ciertas especies de agallas eran de gran valor en una amplia variedad de procesos económicos; en la fabricación de tinta, curtido, así como en fármacos astringentes. En todos los casos el alto contenido de taninos de las agallas es explotado; los taninos reaccionan con compuestos que contienen hierro para formar tinta, reaccionan con el colágeno presente en las pieles de los animales, uniendo las moléculas entre sí aumentando la resistencia de la piel al calor, a la putrefacción por agua y al ataque por microbios, la curte. Las propiedades de los taninos van desde antidiarréicos, cicatrizantes, antibacteriales, antiinflamatorios hasta antioxidantes (Fernandez and Martins, 1985)

Las ideas acerca de la naturaleza de las agallas son generalmente erróneas, dada la compleja estructura y morfología que estas presentan, son confundidas por frutas u inflorescencias propias de la planta que las presenta, siendo en realidad producto de una activa manipulación por parte de los insectos inductores de agallas, en otras palabras la agalla es el resultado de una estructura nueva y desconocida dentro del crecimiento normal de la planta en respuesta a estímulos producidos no solo por una especie diferente sino además de diferente reino, la avispa inductora de agallas (Weis y Abranhamson, 1986; Raman 2007, 2011).

No es hasta las observaciones de Marcello Malpighi (1628-1694) que se revela el origen de estas estructuras, causadas por organismos que usan las plantas como alimento y que modifican su estructura para producir un traje o envoltura para cubrir sus propios requerimientos.

Se sabe que existen diferentes tipos de organismos que pueden inducir agallas: bacterias, hongos, nematodos, ácaros e insectos. Küster (1911) distingue dos tipos de agalla basado en su estructura:

- **Agallas primitivas**, causadas por thrips y homópteros, caracterizadas por una baja diferenciación tisular y la carencia de una forma externa constante, denominadas agallas cataplásmicas.
- **Agallas estructuralmente complejas**, causadas por dípteros y cinípidos, conocidas como agallas protoplásmicas. Estas últimas se caracterizan por poseer diferenciación tisular dentro de zonas bien definidas, así como una forma y tamaño definitivo. Los insectos inductores de agallas o cecidias son reconocidos como los más complejos inductores de crecimiento anormal de plantas.

La formación de las agallas es el resultado de la compleja interacción entre el insecto inductor de agallas y su planta hospedera, en el cual el insecto se comunica con la planta hospedera y redirecciona el crecimiento normal de la planta induciendo la formación de la agalla que le permita el desarrollo de su larva, y por ende asegurar su descendencia, obteniendo beneficios como refugio, nutrientes y protección contra condiciones ambientales adversas y enemigos naturales (Stone *et al.*, 2002). Las agallas o cecidias se consideran estructuras anormales de los tejidos u órganos de las plantas en las que se desarrollan por la reacción específica a la presencia o actividad de un organismo inductor (Meyer, 1987; Shorthouse y Rohfritsch, 1992).

Existe una enorme complejidad y diversidad de agallas entre los diferentes linajes de las agallas. El tamaño y la estructura de la agalla varían y van desde pequeñas protuberancias, pústulas y granos hasta manchas peludas, grandes hinchazones y crecimientos extraños a menudo coloridas y con apéndices elaborados nada parecido a cualquier estructura típica producida por la planta, presentan formas geométricas que son desconocidas en el sistema de crecimiento normal de la planta (Raman, 2011). Una de las características fundamentales de las agallas que las distinguen de numerosas anomalías que usualmente presentan las plantas, es que la reacción de la planta ante el ataque del organismo extraño, incluyen sin excepción fenómenos de hipertrofia (crecimiento anormal de las células) e hiperplasia (multiplicación anormal de células) asociados al proceso de crecimiento anormal (Nieves, 1998), así como una re-diferenciación celular. Las agallas son el mejor ejemplo de estructuras naturales modificadas que son producto únicamente de mensajes de un organismo extraño en este caso el insecto inductor de agallas (Maresquelle, 1980). Los insectos inductores de agallas representan una alta manifestación en la regulación del crecimiento de las plantas, señales de crecimiento que no proviene de la planta misma (Raman, 2011), sino de un organismo que no pertenece ni a su especie, género y reino.

Los himenópteros (del griego hymen: membrana y pteros: ala) son un orden megadiverso que comprende hormigas, abejorros, abejas y avispas entre otros (Anento y Selfa, 1997). Existen aproximadamente 115,000 especies descritas de himenópteros (LaSalle y Gauld, 1992), siendo el orden que ocupa el tercer lugar en cuanto a riqueza de especies, siendo superado únicamente por el orden de los coleópteros y los lepidópteros. Esta cifra resulta abrumadora si comparamos el número de especies que representan a otros grupos de mayor categoría taxonómica. A pesar de esta cifra aún queda buena parte por descubrir y describir, puesto que aparece como uno de los órdenes más ricos y variados en algunos de los ecosistemas más productivos del mundo (Lasalle y Gauld, 1992).



El orden de los himenópteros se encuentran especies fitófagas, carnívoras, fluidófagas, mutualistas, parasíticas e hiperparasíticas, lo que muestra un orden especialmente diverso no solo en número de especies que reúne, también en cuanto morfologías, relaciones tróficas y a lo que comportamientos sociales se refiere.

Es conocida y reconocida la gran diversidad de interacciones existentes entre plantas e insectos, una de las más especializadas es la de los insectos que inducen la formación de agallas, crecimiento atípico que presentan las plantas en las cuales se hospedan. Existen aproximadamente 13,000 especies de insectos con esta capacidad inductora. La mayoría de los insectos inductores de agallas son hospederos órgano-tejido específicos (Mani, 1964; Abrahamson *et al.*, 1998). Varios autores (Felt, 1917, 1940; Mani, 1964) coinciden en el alto nivel de especificidad de los insectos inductores de agallas para con sus plantas hospederas, así como el órgano específico de la planta que utilizan para la inducción.

Los tejidos, así como los órganos de la mayoría de las plantas son susceptibles a una gran variedad de factores y estímulos que tienen como resultado un efecto en su crecimiento, lo cual es explotado por los insectos inductores de agallas. Para la inducción y formación de la agalla se requiere que las células de la planta afectada sean jóvenes, capaces de desarrollarse en cualquier tipo de tejido, especialmente las agallas inducidas por cinípidos, ya que estas agallas se encuentran conformadas por diferentes capas de tejidos, es por ello que los diferentes puntos de crecimientos de las plantas en donde encontramos células meristemáticas; brotes, en el cambium de las hojas, tallos y raíces, es donde la mayoría de las agallas se encuentran y desarrollan.

Los insectos inductores de agallas toman ventaja de las propiedades fundamentales de las plantas al reaccionar y convertir sus tejidos, en tejidos especializados con funciones específicas durante el crecimiento y desarrollo de la agalla.

La agalla se desarrolla a partir de la inducción del insecto en el tejido de la planta como resultado de la asociación intraespecífica planta e insecto; esta estructura proporciona a la larva del insecto nutrición y protección contra condiciones ambientales adversas y enemigos naturales (Price *et al.*, 1987).

Las plantas presentan diferentes tipos de crecimiento; normal y anormal o atípico. El crecimiento normal de las plantas se encuentra regulado por hormonas vegetales, son las responsables de regular los procesos de crecimiento y desarrollo en respuesta a las condiciones ambientales específicas, así como a los diferentes estímulos a los cuales se encuentra sujeta la planta. En tanto que el crecimiento patológico usualmente conlleva enfermedades y pérdida de funciones y el crecimiento anormal o atípico resulta en un cambio en los patrones de crecimiento y diferenciación (Bloch, 1965). El crecimiento referido como anormal o atípico, frecuentemente es caracterizado por alteraciones y crecimiento excesivo del o de los órganos de la planta, provocando que esta pierda el control del crecimiento del área afectada. Las especies inductoras de agallas, en su mayoría insectos, tienen la capacidad de manipular a la planta en su propio beneficio mediante la formación de agallas, induciendo un crecimiento atípico; estas estructuras producidas por los tejidos de las plantas, pero inducidas por organismos de diferente especie y reino (insectos inductores de agallas), proporcionan al insecto inductor un sistema de “incubación y nodrizas” para sus larvas, lo que le permite asegurar su descendencia y completar su ciclo de vida.

Los cinipoideos constituyen una de las principales superfamilias de himenópteros incluidas en la sección *Parasítica* del suborden *Apocrita*. Con más de 3000 especies conocidas, es el cuarto grupo de himenópteros parásitos más numeroso en especies a escala mundial (Nieves-Aldrey y Fontal Cazalla, 1999). Esta superfamilia se encuentra relativamente poco estudiada, sobre todo los grupos parasitoides tropicales y probablemente una importante fracción de las especies de la fauna de estos insectos todavía no se encuentra descrita.

Los cinipoideos son insectos de pequeño y mediano tamaño, generalmente de 1 a 6 mm de longitud a excepción de algunos representantes de las familias, *Ibaliidae* y *Liopteridae* que pueden superar hasta los 20 mm, se trata por lo general de insectos de colores sombríos negros, rojizos, ambarinos, castaños brillantes o mates, pero nunca con tonalidades metálicas que presentan otros himenópteros como los calcídidos o crísidos. El carácter morfológico que identifica mejor al grupo es la venación alar reducida, con pterostigma (celdilla en la parte externa de las alas) ausente y la presencia de una característica celda marginal, cerrada o no en el margen anterior de las alas anteriores. Los tarsos se componen de cinco artejos. El abdomen está por lo general comprimido lateralmente (Nieves-Aldrey, 2001).

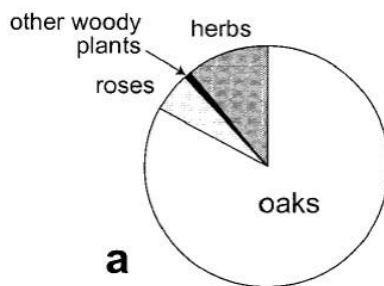
Siguiendo la reciente clasificación de Ronquist (1995b y 1999) se admite que en el ámbito mundial la superfamilia comprende cinco familias, *Austrocynipidae*, *Liopteridae*, *Ibaliidae*, *Cynipidae* y *Fagitidae*. La mayoría de los representantes de esta superfamilia son parasitoides, del tipo endoparasitoides cenobiontes (Askew y Shaw, 1986; Gauld y Bolton, 1988). Las larvas de estos insectos son holometábolos (suceden las fases de embrión, larvapupa e imago o adulto).

La familia Cynipidae es singular dentro de la familia cynipoidea ya que todos sus representantes son fitófagos especializados, inducen la formación de agallas en las plantas o son inquilinos de estas mismas, a diferencia de otras familias que incluyen solamente insectos parásitos de estadios inmaduros de otros insectos. La familia cinipidae se encuentra dividida en dos grupos, los insectos inductores de agallas y los insectos asociados a las agallas llamados inquilinos. Ashmead (1903a, b, c y d) divide a las familias en seis tribus, basado en caracteres biológicos y morfológicos, cinco de las cuales son para los inductores de agallas (Aylacini, Diplolepidini, Eschatocerini, Pediaspidini y Cynipini) y solo en una tribu encontramos a los inquilinos (Synergini).

La familia *cynipidae* es la más rica en especies de todos los cinipoideos, dependiendo de la fuente consultada esta cifra va de 1000 a 1400 (Ritchie,1993; Fergusson y Hanson, 1995; Liljeblad y Ronquist, 1998) hasta 3000 y 6000 el número de especies estimadas por Nordlander (1984). Actualmente se han descrito aproximadamente 1370 especies (Csóka *et al.*, 2005).

En particular las agallas inducidas por cinípidos soportan complejas comunidades compuestas por la avispa inductora de agallas e inquilinos, estos últimos también cinípidos sin embargo carecen de la capacidad de inducir agallas, sus larvas fitófagas viven a expensas de las agallas ya formadas. Aunque carecen de capacidad cecidogénica, las larvas de los inquilinos a menudo tienen el efecto de modificar de algún modo las agallas hospedadoras, ensanchándolas, atrofiándolas o deformándolas en mayor o menor medida, estos efectos son con frecuencia dependientes de la etapa de desarrollo en la cual se encuentre la agalla durante el ataque de los inquilinos (Evans, 1995; Garries *et al.*, 1996; Shorthouse, 1980). Las agallas además de ser un microhabitat para el cinípido también se ha observado que lo es para otras especies de artrópodos, presentan interacciones con hormigas, las agallas inducidas por especies de *Andricus*, *Dissholcaspis* y *Dryocosmus* producen néctar que atrae hormigas y protegen a la agalla del ataque de parasitoides (Stone *et al.*, 2002).

La gran mayoría de especies de cinípidos, todos los de la tribu *cinipini* y la mayor parte de los inquilinos de la tribu *Synergini*, que en conjunto constituyen más del 80% de todas las especies de cinípidos, aparecen asociadas exclusivamente a plantas de la familia de las fagáceas, principalmente del género *Quercus*, lo que determina la distribución Fig. 1.



**Figura 1.** Proporción de especies de plantas que son atacadas por las avispas inductoras de agallas.  
(Ronquist and Liljeblad 2001).

La familia Cynipidae comenzó a inducir agallas primitivas en plantas herbáceas, posteriormente, ocurrió una rápida evolución con colonización a especies leñosas, primero rosáceas y finalmente fagáceas donde ocurrió la mayor radiación adaptativa y especiación del grupo (Ronquist y Liljeblad, 2001). El género más conocido de la familia Fagaceae son los encinos, al parecer estos representaron al principio de la interacción un espacio libre de herbívoros debido al alto contenido de taninos (Roskam, 1992). Otros factores involucrados en esta enorme radiación adaptativa son la especificidad, la partición espaciotemporal de nichos y la presión selectiva de los parasitoides que han favorecido morfologías complejas y estructuras de agallas que permiten escapar al ataque (Cornell, 1983; Askew, 1984). La mayor diversificación del grupo en conjunto con las plantas fagáceas del género *Quercus* (se conocen 1000 especies de cinípidos en 450 especies de *Quercus*) es uno de los hechos más notables en la evolución de los cinípidos y constituyen, en conjunto con los *Agaonidae* en *Ficus*, la mayor especiación de insectos fitófagos en un único género de plantas (Ronquist y Liljeblad, 2001).

## **Objetivo general**

Determinar a través de herramientas moleculares e histológicas la participación a nivel molecular de la larva de *Amphibolips michoacaensis* en la inducción de la agalla en *Q. castanea*, así como la morfología de la agalla que induce.

## **Objetivos específicos**

- Describir la morfología de la agalla inducida por *Amphibolips michoacaensis* sobre *Quercus castanea*.
- Obtener y analizar transcriptomas de *novο* en diferentes estados de crecimiento de la agalla inducida por *Amphibolips michoacaensis* sobre *Quercus castanea* para identificar los mecanismos moleculares de control genético relacionados a la formación y crecimiento de la agalla.

## CAPÍTULO I

### **Morfo-anatomía de la Ontogenia presentada por la agalla inducida por *Amphibolips michoacanesis* sobre su planta hospedera *Quercus castanea*.**

Los insectos inductores de agallas tienen una imperativa demanda por hospederos específicos, que les permitan completar su ciclo vital. Esta demanda es evidente dado el alto nivel de especificidad por parte de los insectos inductores de agallas por especies particulares de plantas, así como el órgano específico dentro de sus hospederos, las agallas de los cinípidos pueden formarse sobre hojas, tallos, yemas, flores, frutos y en partes subterráneas de la planta como raíces y estolones. El comportamiento reproductivo de estos insectos que se encuentra altamente sincronizado con el crecimiento de su planta hospedera, su alta especialización alimentaria, así como la dinámica evolutiva evidencian el alto grado de fidelidad de estos insectos para con sus hospederos.

Las agallas de los cinípidos son del tipo histioide prosoplásmicas (Rohfritsch, 1992) es decir, presentan estructuras morfológicas anormales, cualitativamente diferentes a los órganos de las plantas donde las originan, con un alto grado de diferenciación tisular dependiente de la especie del cinípido inductor.

Los diferentes tipos de factores en juego en la formación pueden ser investigados considerando que una agalla es producida por un insecto, como consecuencia de una acción mecánica sobre la planta (picadura de alimentación o de puesta), que se puede

acompañar de la introducción de una sustancia (saliva o producto de secreción de las glándulas del aparato de puesta), permitiendo el desarrollo "*in situ*" de huevos y larvas.

Además, se sabe que es necesario un estímulo continuo por parte de la larva para la formación de la agalla ya que cuando la larva es muerta por enemigos naturales o insecticidas la agalla frena su crecimiento. (Harper *et al.*, 2004)

El desarrollo de las agallas puede dividirse en tres etapas:

- La iniciación
- Crecimiento
- Maduración

La secuencia de acontecimientos en el proceso de la formación de las agallas de cinípidos comienza con la oviposición de la avispa en el interior del tejido vegetal, cabe señalar que este tejido es meristemático (Stone *et al.*, 2002), el cual es necesario para que se pueda desarrollar la agalla, posteriormente ocurre una lisis (rotura de la pared celular) de las células vegetales que entran en contacto con el huevo, introducido por el insecto, formando de esta manera la cámara larval (Bronner, 1973) (Fig. 2).

Al depositar huevos de *Biorhiza pallida* (avispa inductora de agallas) sobre películas ya sea de gelatina de albúmina, celulosa o pectina se constata en todos los casos una destrucción de estas sustancias bajo los huevos depositados. Propiedades proteolíticas, celulolíticas y pectinolíticas de los huevos explican la lisis de las células vegetales (Nieves-Aldrey, 1998).

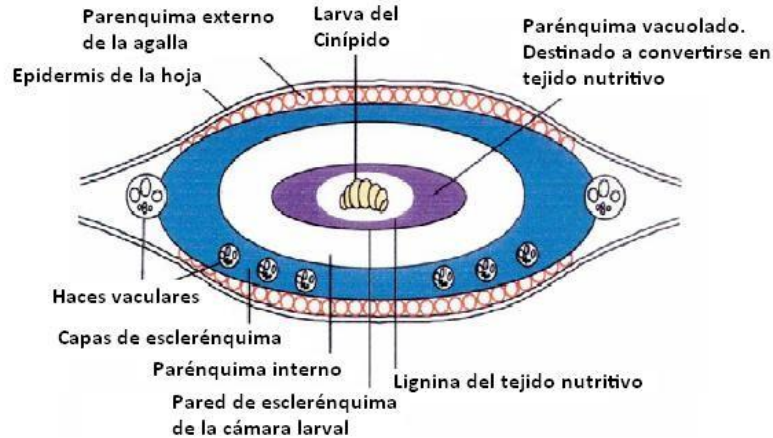


La fuerte especificidad entre el cinípido y el hospedador pudiera ser explicada en parte por esta capacidad lítica ya que estudios específicos realizados con encinos de Estados Unidos, Inglaterra y Japón indican que los compuestos poliméricos de diferentes especies de encinos varían encontrándose la celulosa en un rango de 31 al 50%, los pentosanos entre el 17 y 24% y la lignina entre el 19 y 30 % (Fengel y Wegener, 1984; Pettersen, 1984). Estudios realizados con cinco especies diferentes de encinos presentes en el estado de Puebla muestran también diferencias en los contenidos de celulosa, lignina y pentosanos (Honorat-Salazar y Hernández-Pérez, 1998). Estas diferencias pueden ser una limitante para que permita la especificidad entre el agallero y el encino al cual parasitan.

El hospedero además de responder con necrosis produce metaplasia celular, es decir se producirían una serie de procesos de inhibición del crecimiento y de la diferenciación normal. Durante la fase de crecimiento las células cercanas a la larva joven toman caracteres de células jóvenes e incrementan la masa celular que rodea la larva. Las células que revisten la cámara larval se diferencian y constituyen las células nutritivas, las cuales son importantes para la alimentación de la larva. A esta fase le siguen reacciones de hipertrofia y de multiplicación celular o hiperplasia, que son las reacciones ordinariamente más importantes y las más visibles en el proceso. (Stone *et al.*, 2002). Los fenómenos de multiplicación celular se producen particularmente en el seno de órganos todavía en desarrollo.

La larva de la avispa al rozar con las células nutritivas por la acción de alimentación dispara la conversión de las células vacuoladas del parénquima en células nutritivas.

Finalmente, la fase de maduración se caracteriza por un decremento de la división celular.



**Figura 2.** Las agallas de los cinípidos consisten en una capa externa de tejido epidérmico, una corteza de esclerenquima y una o más capas de tejido nutritivo que contienen a larva (Stone y Schönrogge, 2003).

En las agallas de cinípidos se producen fenómenos de diferenciación histológica, de los cuales resulta la cavidad larval del cinípido y varias capas titulares Fig 2, una capa de tejido nutritivo, un estuche o cubierta más o menos lignificada, un tejido cortical con numerosos haces vasculares que conectan el tejido vascular con la planta y una capa más externa o epidermis (Stone y Schönrogge, 2003).

El tejido nutritivo y la cubierta lignificada que envuelven a la larva constituyen la "agalla interna"; la epidermis y el tejido cortical configuran la "agalla externa". El tamaño de la agalla interna es constante, mientras que la agalla externa suele variar según las especies (Nieves-Aldrey, 1998).

El género *Amphibolips* pertenece a la tribu Cynipini, se asocia aparentemente solo con encinos de la sección Lobatae o encinos rojos (Liljeblad *et al.*, 2008), *Q. castanea* es un encino rojo de amplia distribución en México (Valencia, 2004), que presenta un amplio

espectro de relaciones con diferentes especies de agalleros entre los cuales se encuentra el género *Amphibolips*.

De acuerdo con Kinsey (1937) ésta especie de encino presenta al menos 5 especies de agalleros diferentes al norte de su distribución. Sin embargo, en trabajos recientes se reportaron 18 especies diferentes de insectos asociadas a *Q. castanea* por lo que es considerado un super hospedero (Maldonado-López *et al.*, 2015). Es interesante como bajo un mismo genoma en este caso el de *Q. castanea* se produzcan 48 formas diferentes de agallas (Maldonado y Pascual-Alvarado *com. Pers.*), este hecho apoya la hipótesis que sugiere que el insecto regula la forma de la agalla y no la planta, en otras palabras, la agalla no es más que el fenotipo extendido del insecto (Stern, 1995).

Dado que la agalla inducida por *A. michoacaensis* se desarrolla en el super hospedero *Q. castanea* y que este encino produce al menos 48 agallas diferentes, es de nuestro interés conocer la morfo-anatomía que presentan las células que conforman esta agalla, y si esta morfo-anatomía presenta cambios durante el crecimiento de la agalla. Por lo que se planteó una colecta de estas agallas en diferentes tiempos de crecimiento, determinado por el diámetro de la agalla y realizar una serie de cortes que nos permitiera observar a través de microscopía electrónica las características de las células que conforman la agalla inducida por *A. michoacaensis* sobre *Q. castanea*, así como identificar las capas titulares que conforman esta agalla.

De dichos análisis se obtuvieron resultados que produjeron la publicación del artículo;

## DEVELOPMENTAL MORPHOLOGY OF BUD GALLS INDUCED ON THE VEGETATIVE MERISTEMS OF *QUERCUS CASTANEA* BY *AMPHIBOLIPS* *MICHOACAENSIS* (HYMENOPTERA: CYNIPIDAE)

PAULINA HERNÁNDEZ-SOTO<sup>1, 4, 6</sup>, MIGUEL LARA-FLORES<sup>2</sup>, LOURDES AGREDANO-MORENO<sup>3</sup>, LUIS  
FELIPE JIMÉNEZ-GARCÍA<sup>3</sup>, PABLO CUEVAS-REYES<sup>5</sup> AND KEN OYAMA<sup>1, 4</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad, Universidad Nacional Autónoma de México. Morelia, Michoacán, México.

<sup>2</sup>Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León, Universidad Nacional Autónoma de México. León, Guanajuato, México.

<sup>3</sup>Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.

<sup>4</sup>Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad Morelia, Universidad Nacional Autónoma de México. Morelia, Michoacán, México.

<sup>5</sup>Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. <sup>6</sup>Corresponding author: gerco777@yahoo.com

**Abstract:** A gall is the result of complex interactions between a gall inducing-insect and its host plant. Certain groups of insects have the ability to induce a new structure, a gall, on plant organs by altering the normal growth of the host involved plant organ. The gall usually provides shelter and nutrients, in addition to protection against adverse environmental conditions and natural enemies to the inducing insect and its offspring. The ecological uniqueness of a gall is that it allows the inducing-insect to complete their life cycles. In this study, we have described the structures of different stages of growth of a gall induced by *Amphibolips michoacaensis* on the buds of leaves on *Quercus castanea* (Fagaceae) to know the subcellular changes during development. The gall consist of various layers such as a nutritive tissue, a lignified sheath, a spongy layer and an outermost epidermis around a centrally located larval chamber. The nutritive cell of the larval chamber show nuclear and nucleolar hypertrophy in the early phases of growth. The granular profile of the nucleolus suggests an active synthesis of ribosomes indicating an accelerated protein synthesis in these cells. During early stages of growth, the cells of the spongy layers within galls are nucleate and nucleolate and include amyloplasts, and the cytoplasm is less abundant. During later growth stages, the spongy cells are enucleate and enucleolate. Chloroplasts occur in the epidermal cells during early stages of growth, indicating that galls are photosynthetically active in early stages of growth. During intermediate stages of growth, a gradual loss of cellular components occurs commencing in the epidermal cells and progressing towards the nutritive cells.

**Key words:** *Amphibolips michoacaensis*, Cynipidae, gall morphology, Hymenoptera, *Quercus castanea*

**Resumen:** La formación de una agalla es el resultado de una compleja interacción entre el insecto inductor de agallas y su planta hospedera. Ciertos grupos de insectos tienen la habilidad de inducir una nueva estructura, la agalla, sobre los órganos de las plantas alterando el crecimiento normal del órgano de la planta involucrado. Las agallas usualmente proveen refugio y nutrientes, además de protección contra condiciones ambientales adversas y enemigos naturales al insecto inductor y a su descendencia. La particularidad ecológica de la agalla es que permite al insecto inductor completar su ciclo de vida. En este estudio, nosotros hemos descrito la estructura de los diferentes estadios de crecimiento de la agalla inducida por *Amphibolips michoacaensis* sobre brotes de hojas de *Quercus castanea* Née (Fagaceae) para conocer los cambios subcelulares durante su desarrollo. La agalla consiste de

varias capas tales como tejido nutritivo, una capa de células lignificadas, tejido esponjoso y una capa epidérmica externa que rodean a una cámara larval central. Las células del tejido nutritivo de la cámara larval presentan hipertrofia de núcleo y nucléolo en las fases tempranas de crecimiento. El perfil granular del nucléolo sugiere una síntesis activa de ribosomas indicando un incremento en la síntesis de proteínas en estas células. Durante fases tempranas de crecimiento, las células del tejido esponjoso de la agalla son nucleadas y nucleoladas e incluye amiloplastos y el citoplasma es menos abundante. Durante las fases tardías del crecimiento, las células del tejido esponjoso son enucleadas y enucleoladas. Los cloroplastos se presentan en las células epidérmicas en las fases tempranas del crecimiento, lo que indica que las agallas son fotosintéticamente activas en estadios tempranos de crecimiento. Durante las fases intermedias de crecimiento se observa una pérdida gradual de los componentes celulares que comienza en las células de la epidermis y avanzan hasta las células nutritivas.

**Palabras clave:** *Amphibolips michoacaensis*, Cynipidae, Hymenoptera, Morfología de agallas, *Quercus castanea*

**A**pproximately 13,000 species of insects belonging to Thysanoptera, Hemiptera, Coleoptera, Lepidoptera and Hymenoptera are known today as gall inducing agents (Dreger-Jauffret and Shorthouse, 1992; Raman *et al.*, 2005). Species of the Cynipoidea (Hymenoptera) induce complex and diversified galls on various plants (Ronquist, 1995, 1999). The Cynipidae are unique because a majority of their species recognized under Aylacini, Diplolepidini, Eschatocerini, Pediaspidini and Cynipini, are specialist plant feeders and they induce galls and only those of the Syndergini are associated with gall-inducing Cynipidae (Ronquist, 1994). A majority of the Cynipidae are associated with Fagaceae and particularly with *Quercus* (Ronquist and Liljeblad, 2001; Csoka *et al.*, 2005).

Gall-inducing insects are specialist plant feeders and many of them remaining tied to specific plant. The gall is a product of the interspecific association of the plant with the insect, which develops a specific novel structure in response of the insect stimulus (Weis and Abrahamson, 1986; Raman, 2007, 2011). Gall-inducing insects actively manipulate the host plant to induce a structure that provides nutrition to their larvae and protection against adverse environmental conditions and natural enemies (Price *et al.*, 1987; Stone and Schönrogge, 2003). The galls generated by the Cynipidae are the most diverse and structurally complex and they are considered the most evolved galls produced by insects (Nieves-Aldrey, 1998; Raman *et al.*, 2005; Csoka *et al.* 2005). The galls induced by the Cynipidae comprise multiple and highly differentiated cell layers. The nutritive tissue and lignified sheath enveloping the larva form the “inner gall” and the cortical tissue the “outer gall” (Bronner, 1977). The internal gall size is consistent while the external gall usually varies according to species (Nieves-Aldrey, 1998). Development of a gall can be seen to include three phases: initiation, growth and maturation (Maresquelle and Mayer, 1965). The gall development starts with the wasp laying eggs in the meristematic tissue of the host plants (Bronner, 1973; Rey, 1992). The plant usually responds with necrosis of cells immediately beneath and around the egg, whereas the adjacent cell layers below and around begin to proliferate. During the growth phase, the cells surrounding the larva turn hypertrophied and hyperplased, both of which are the most visible responses in gall growth process (Meyer and Maresquelle, 1983). The cells lining the larval

chamber are differentiated as nutritive cells, feeding the growing larvae (Bronner, 1992; Rey, 1992; Brooks and Shorthouse, 1997). The criticality of the developing cynipid larva for the growth and maturation of the gall has been demonstrated: the gall ceases to grow, should the larvae die prematurely (Rey, 1992; Brooks and Shorthouse, 1997; Nieves-Aldrey, 2001). Finally, the maturation phase is characterized by a decrease in cell division activity, most of the gall tissues turn lignified as the larva matures and pupates. The gall eventually desiccates.

Although the overall morphology of cynipid galls may vary, the patterns of the internal tissues layers of the gall are similar in the known galls induced by the Cynipidae, with an outer cortical parenchyma and an inner cavity that contains one to many larval chambers. Each larval chamber is usually encapsulated by a layer of sclerenchyma. Lining the sclerenchyma is the inner gall composed of nutritive parenchyma cells that accumulate lipids, sugars and amino acids (Bronner, 1992; Harper *et al.*, 2004). Starch concentration increases away from the larval chambers while enzymes, lipids and sugar concentration increase towards the larval chambers (Bronner, 1992). All Cynipidae generate this essential nutritive tissue that serves as a source of nourishment for the larva (Rey, 1992). Bronner (1992) reports specific characteristics for inner nutritive cells such as enlarged nucleus and nucleolus, fragmented vacuole, low content of starch and high contents of lipids and proteins. About 80 % of all the Cynipidae galls form on oak (*Quercus*) and rose (*Rosa*) (Ronquist and Liljeblad, 2001; Harper *et al.*, 2004). The majority of the few studies about Cynipidae galls have been made in roses (LeBlanc and Lacroix, 2001; Leggo and Shorthouse, 2006), and one or two about the internal structure of galls induced by cynipid on *Quercus*; the knopper galls on acorns of *Q. robur* induced by *Andricus quercuscalicis* and “Oak Apple Gall” in buds of the English oak *Q. robur* by *Biorhiza pallida* (Harper *et al.*, 2004).

However, there are no reports of ultrastructural studies in *Quercus* galls induced by the Cynipidae in Mexico, with approximately 160 species; Mexico is one of the centers of species diversification of genus *Quercus* (Nixon, 1993). In this study, we described the morphological and anatomical characteristics in different stages of growth of the bud gall induced by *Amphibolips michoacaensis* on *Quercus*

*castanea* an endemic species with a wide distribution in Mexico. We compared the cell structure of different stages of growth of galls using electron micrographs of the tissues to know the changes involved in the different layers during the development of the gall wasp.

## Material and methods

**Collection of specimens.** Galls of *Amphibolips michoacaensis* Nieves-Aldrey & Maldonado (Cynipidae) were collected in April-May in 2011 and 2012 on trees of *Quercus castanea* in central Mexico (19°66'17.5" N; 101°16' 70.2"W). Galls of different sizes that contained larvae were sampled and measured their diameter, smalls (7 mm diameter), mediums (14-24 mm diameter) and big (36-56 mm diameter) (n = 80). The collected galls were dissected and the tissue of larval chamber, spongy tissue and epidermis were taken for further analysis. *Amphibolips michoacaensis* is a new species described recently from galls from *Q. castanea* (Nieves-Aldrey *et al.*, 2012).

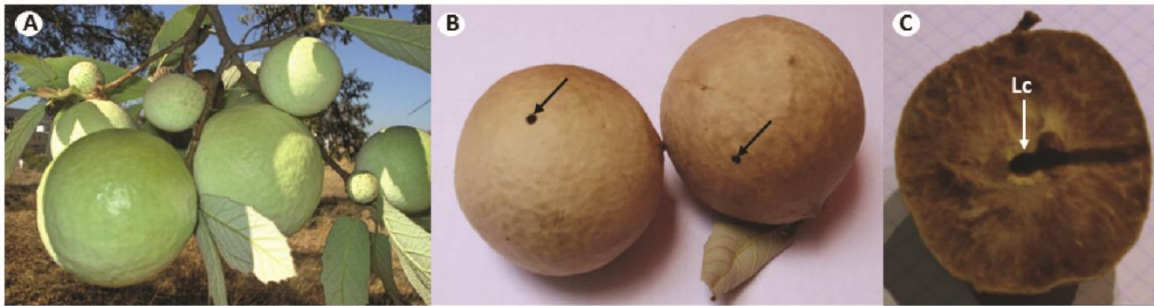
**Electron microscopy.** Tissues were prepared following the protocols described in Jiménez-García and Segura-Valdéz (2004). Briefly, tissues were fixed with 4 % paraformaldehyde plus 6 % glutaraldehyde for 24 h at room temperature 30 °C. They were then postfixed with 1 % osmium tetroxide for 3 h and dehydrated with a series of graded ethanol and propylene oxide. Embedding was performed with epoxy resin at 60 °C for 16 h. Thin sections 250-350 nm, were placed on copper grids, stain with 3 % toluidine blue and covered with Formvar. Sections were contrasted with 5 % uranyl acetate and 0.5 % lead citrate. Grids were observed with a transmission electron microscope (JEOL 1010, JEOL, Peabody, MA) working at 80 kV. Images were obtained with a charge-coupled device camera coupled to the microscope.

## Results

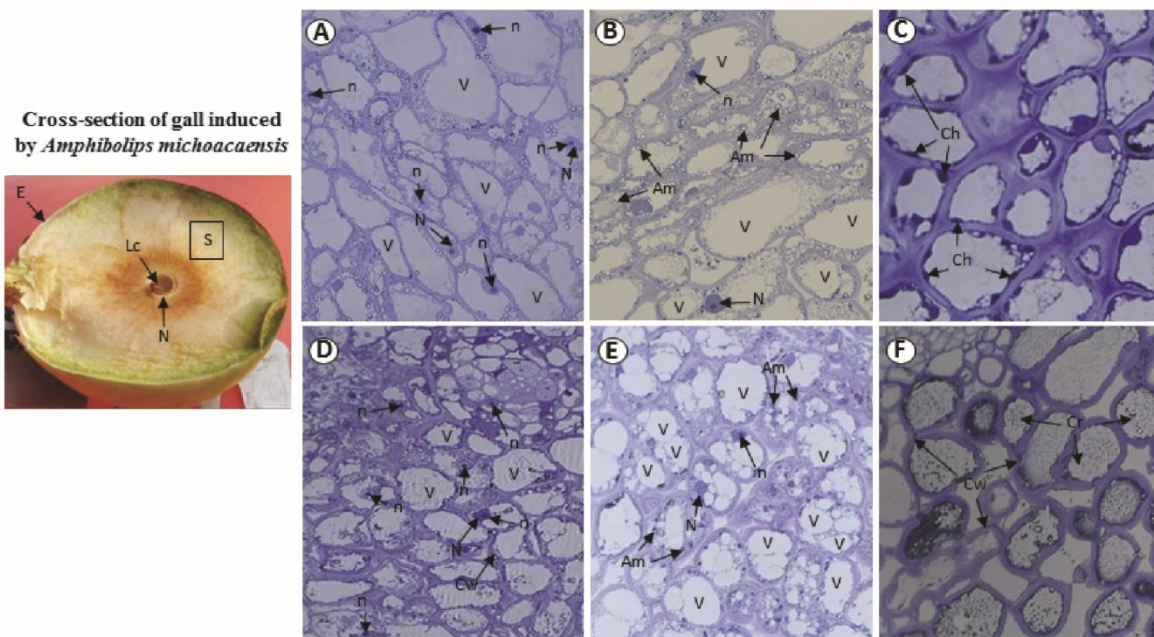
*Amphibolips michoacaensis* induced galls in the buds of *Quercus castanea*. The spherical galls measured up to 60 mm of diameter; they are soft to human feel and spongy and green during early stages and turns brown on maturation (Figure 1A, B). The gall induced by *A. michoacaensis* includes a centrally located single larval chamber occupied by one larva (Figure 1C). Three layers of tissue occur in the galls induced by *A. michoacaensis*: the nutritive, the spongy and the epidermal cells.

The nutritive cells in growing galls of 6 mm of diameter showed a centrally located large vacuole, with a few amyloplasts in the cytoplasm (Figures 2A, 3A) and hypertrophy of nucleus and nucleolus (Figures 2A, 3B, C). The nucleolus appears granular (Figure 4B). In the cytoplasm, the endoplasmic reticulum and many ribosomes were present (Figures 4A, C). In the cells of spongy tissue, the number of amyloplasts were more than that were evident in the nutritive cells (Figures 2B, 3D) and the structure of nucleus and nucleolus present a certain amount of degradation in their structures compared with those of nutritive cells (Figures 3E, F). Changes in nucleus morphology were visible: a segregated nucleus, less compact and less dense is markedly reduced compared with nutritive cells while central nucleolus present blanched regions and less dense. The epidermal cells show thickened cell walls, many chloroplasts (Figures 2C, 3G, H) and numerous mitochondria (Figure 3I). When gall size increases to 14 mm of diameter, some structural changes were observed in their cell layers. The nutritive cells showed hypertrophy of nucleus and nucleolus, the nucleus appears segregates less dense and less compact, the nucleolus present blanched regions, the morphology the nutritive cells are similar to the spongy cells in galls of 6 mm of diameter (Figure 5A). The number of amyloplasts increased in nutritive cells (Figure 5A), than in previous sizes (6 mm in diameter) (Figure 3A), and large vacuole fragmented occurred (Figures 2D, 5A). The cells of spongy tissue had a few amyloplasts, appear cytoplasmic remains, a thickened cell wall, few cells had nucleus and nucleolus and the vacuoles were fragmented (Figures 2E, 5B, C). In the epidermal cells thickened cell walls and few cytoplasmic remains can be observed (Figures 2F, 5D). The epidermal cells did not show chloroplasts compared with the smaller galls that had a large number of chloroplasts (Figure 3H); only thickened cell walls and few cytoplasmic remains can be observed (Figures 2F, 5D).

Some nutritive cells in galls of 24 mm of diameter showed a gradual degradation process of nucleus and nucleolus, while in other cells the nucleus and nucleolus remained intact in structure with a prominent nuclear envelope (Figures 6A-C). In some nutritive cells amyloplasts were evident (Figure 6B). The vacuoles of nutritive cells were fragmented and autophagic vacuoles were apparent (Figures 6C). In the spongy tissue, cells with large vacuoles and cells with fragmented vacuoles were present (Figure 6D, E), the cell walls were thick and autophagic vacuoles were apparent (Figure 6E) and cytoplasmic debris were present in some cells with greater levels than the others (Figure 6E,



**Figure 1.** Galls induced by *Amphibolips michoacaensis* on *Quercus castanea*. A Galls in different stages of growth in the tree, the galls are smooth and green light in color. B Mature galls, the growth stop and the gall has a brown color and hard tissue; in these galls, the holes made by the insects from inside to leave the gall after a complete development can be observed (arrows). C Cross-section of mature gall, the single larval chamber (Lc) in the center of the gall surrounded by sclerenchyma lignified cells (light brown sheath) and the tunnel made by the insect can be observed.



**Figure 2.** Cross-section of gall induced by *Amphibolips michoacaensis*; single larval chamber (Lc), nutritive (N), spongy (S) and epidermal (E) cells (color photo at the left). A-C Light micrographs of the different layers in gall of 6 mm in diameter. A Nutritive cells present hypertrophied nucleus (N) and nucleolus (n) and big central vacuole (V). B Spongy cells present numerous amyloplasts (Am). C Epidermal cells show numerous chloroplasts (Ch). D-F Light micrographs of the different layers in gall of 14 mm in diameter. D Nutritive cells show hypertrophied nucleus (N) and nucleolus (n). E Spongy cells present fragmented vacuoles (V) and nucleolus (n). F Epidermal cells had only cytoplasmic remains (Cr) and thickened cell walls (Cw).

F). The most epidermal cells include cytoplasmic debris (Figures 6G, H), whereas other cell were empty (Figure 6I). Both spongy and epidermal cell layers bore thickened cell walls.

The nutritive cells of galls of 36 mm of diameter rarely include a nucleus and a nucleolus (Figure 7A) and the number of autophagic vacuoles and the content of cytoplasmic remains increased (Figure 7B) compared with the nutritive cells in galls of 24 mm of diameter (Figure 6C), resembling more to the cells of spongy tissue of galls of 24 mm of diameter (Figure 6D). There are a few spongy cells with cytoplasmic remains and most of them kept the cell

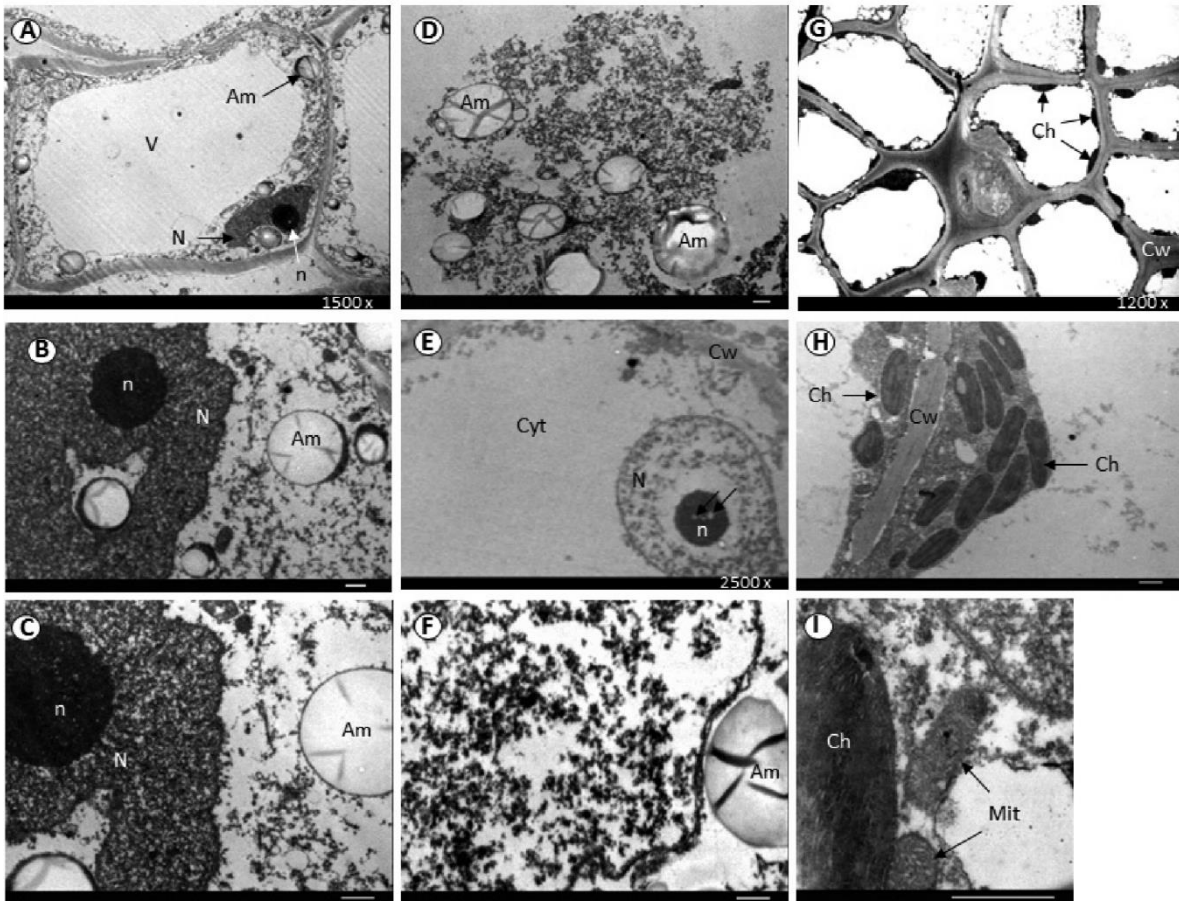
membrane (Figures 7C, D). The epidermal cells were vacant (Figure 7E). The morphology of cells in the spongy tissue and epidermal cells were nearly identical at this stage.

Nutritive cells of galls of 56 mm of diameter showed few cytoplasmic remnants (Figures 8A, B) similar to cells of spongy tissue in galls of 36 mm in diameter (Figure 7C). Most of the spongy cells were empty, cells had lignified walls and few cells still included cytoplasmic remains (Figures 8C, D). Epidermal cells were empty (Figures 8E, F). In this gall size, there was no real differences between the three different layers of cells that form the gall; nutritive, spongy and epidermal cells.

## Discussion

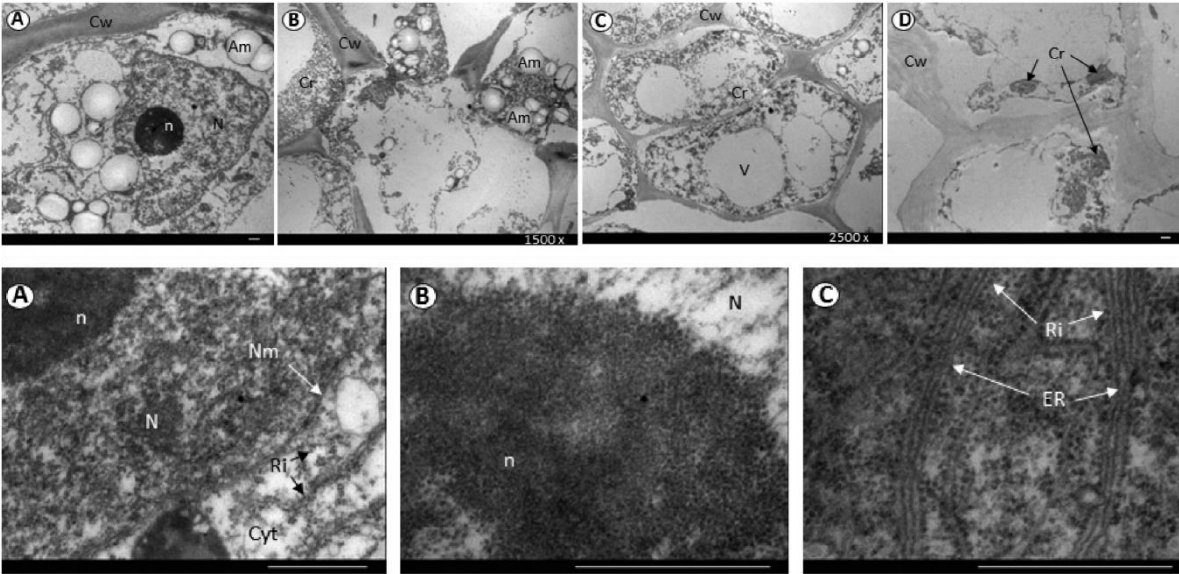
The present study shows that the structure of gall induced by *Amphibolips michoacaensis* in different stages of growth is similar to galls induced by others Cynipidae such as hypertrophied nucleus and nucleolus and abundance of ribosomes in nutritive cells (Rothfritsch, 1974; Bronner, 1992; LeBlanc and Lacroix, 2001; Leggo and Shorthouse, 2006). Bronner (1992) reported numerous plastids and mitochondria in the nutritive cells of the Cynipidae galls, whereas in the galls induced by *Amphibolips michoacaensis* both mitochondria and chloroplasts occurred in epidermal

cells of galls during early stages of growth. In galls induced by *Diplolepis rosaefolii* (Cynipidae) on leaves of *Rosa virginiana*, fragmented vacuoles occur in cells located at the periphery of nutritive tissue but they are either reduced or absent in cells closet to the larval chamber (LeBlanc and Lacroix, 2001). In galls induced by *A. michoacaensis*, the cells of nutritive and spongy tissues present large vacuoles during early stages of growth, whereas during later stages of growth they appear fragmented until their disappearance finally. In galls induces by the Cynipidae, *Andricus quercuscalicis* and *Biorhiza pallida* on *Quercus robur*, the immediate layers surrounding the larva had enlarged cells filled



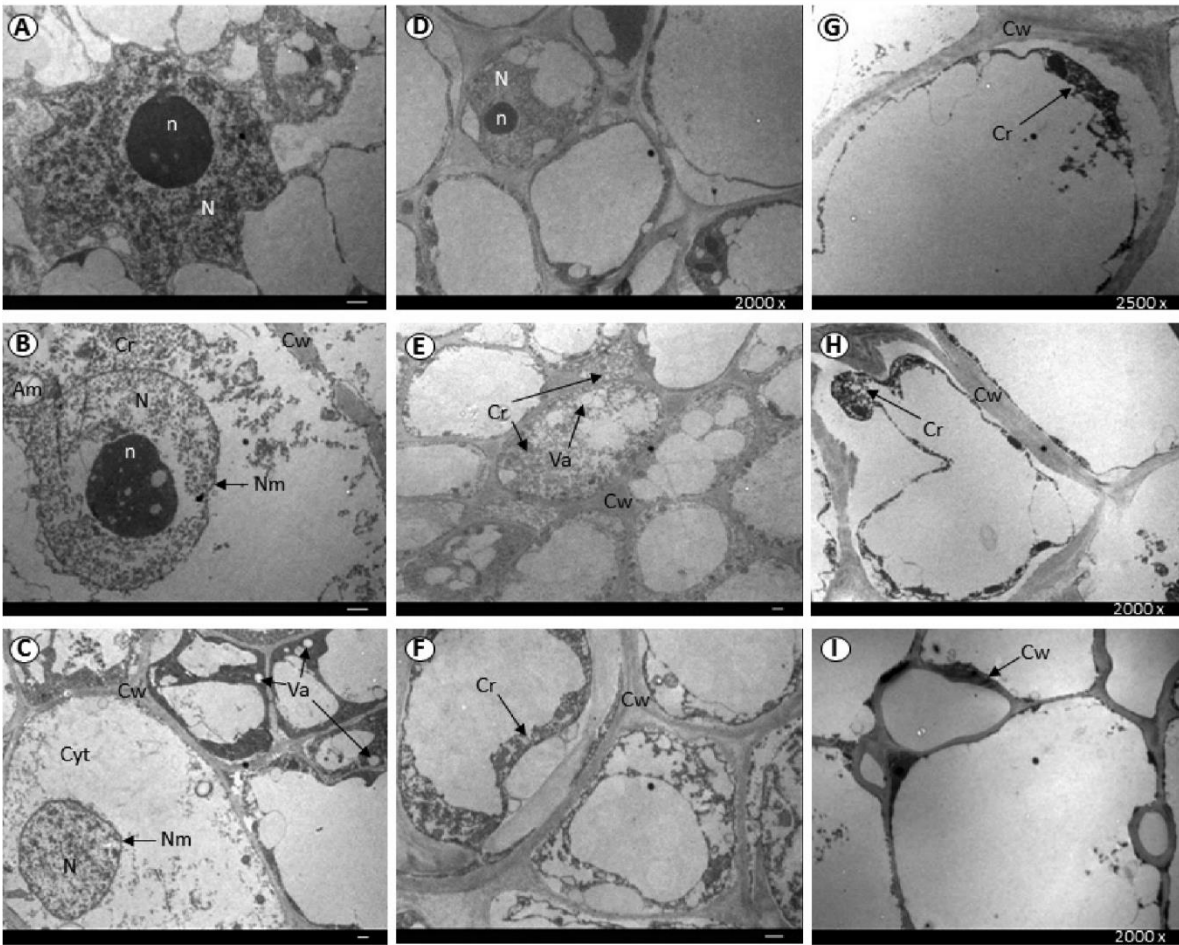
**Figure 3.** Ultrastructural morphology of galls with 6 mm in diameter. A-C Cells in nutritive tissue. The nucleus (N) and nucleolus (n) are hypertrophied, the cytoplasm contains few amyloplasts (Am) and a big vacuole (V). D-F Cells in spongy tissue. The internal organization of the nucleus (n) is lost. An increment in the number of amyloplasts (Am) is observed in cytosol (Cyt). G-H Cells in epidermal tissue containing mitochondria (Mit) and numerous chloroplasts (Ch) (bar = 1  $\mu$ m).



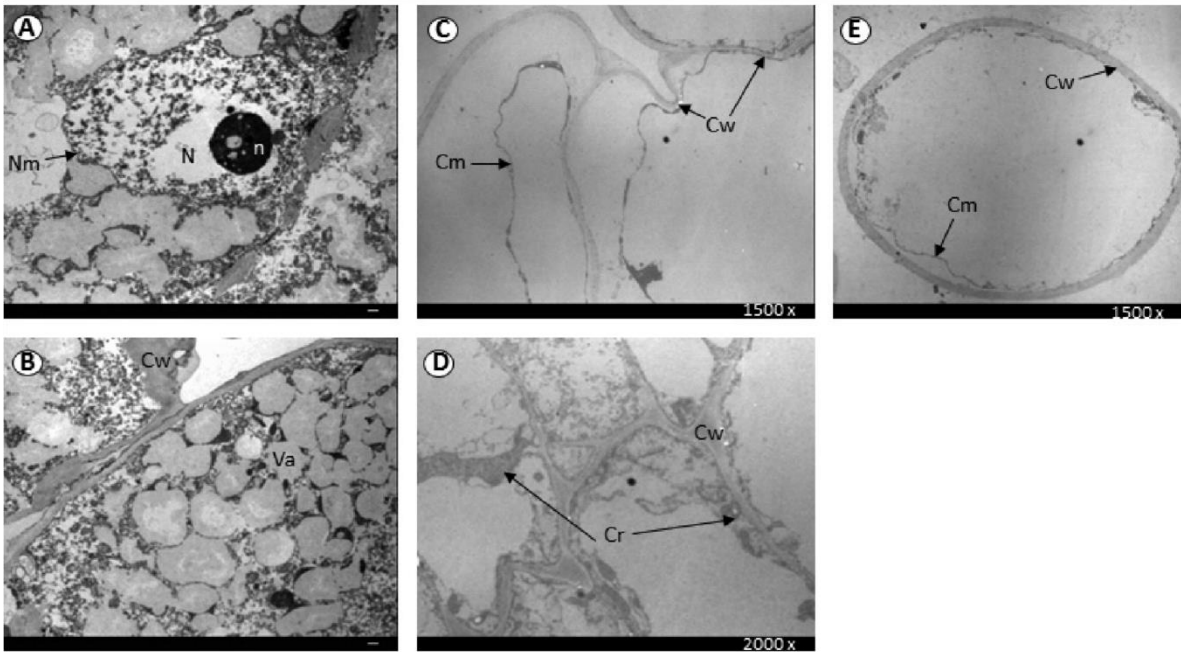


**Figure 4.** A-C Ultrastructural morphology of nutritive cells in galls of 6 mm in diameter. The nucleus (N) and nucleolus (n) are dense; the nucleolus has a granular structure and the cytoplasm (Cyt) present rough endoplasmic reticulum (ER) and ribosomes (Ri) (bar = 1  $\mu$ m).

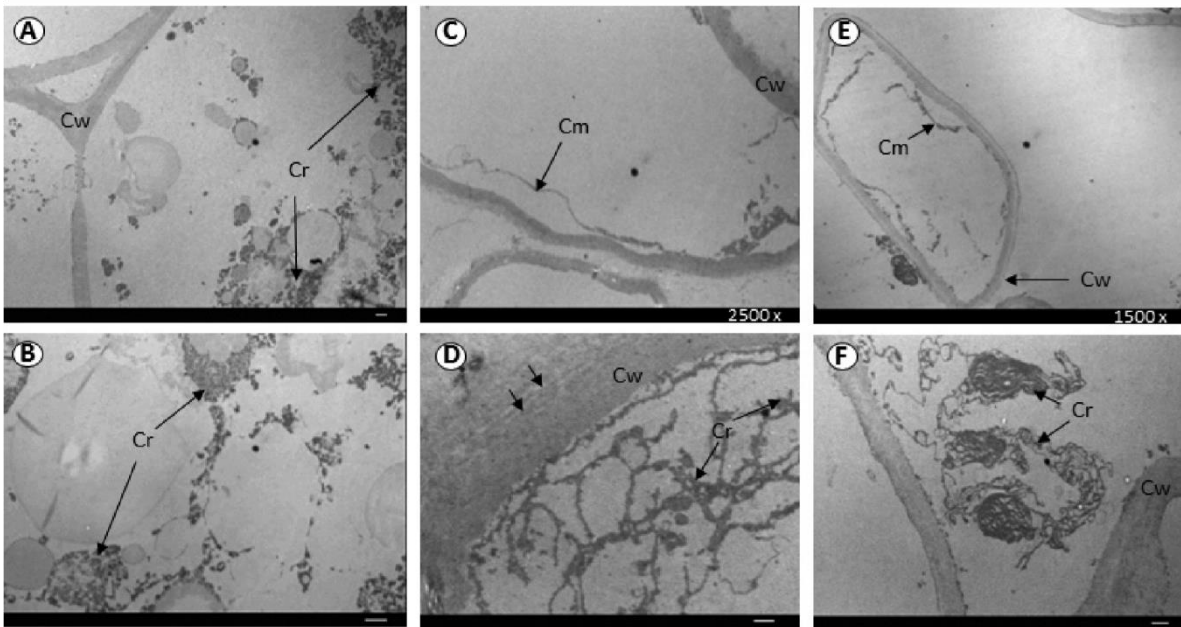
**Figure 5.** Ultrastructural morphology of galls of 14 mm in diameter. A Cells in nutritive tissue surrounding the larval chamber present engorged cell walls (Cw), abundant amyloplasts (Am), hypertrophied nucleolus (n) and cytoplasm (Cyt). B-C Spongy tissue cells, single or some vacuoles (V) per cell and less amyloplasts (Am) than proximal cells to the chamber. D Cells in epidermal tissue show cytoplasmic remains (Cr) and engorged cell wall (Cw) (bar = 1  $\mu$ m).



**Figure 6.** Ultrastructural morphology of galls of 24 mm in diameter. A-C Cells of nutritive tissue present hypertrophied nucleus (N) and nucleolus (n) with loss of structure, present nuclear membrane (Nm) and in some cells appear autophagic vacuole (Va). D-F Cells of spongy tissue show big and fragmented vacuoles (V), autophagic vacuoles (Va) with poor cytoplasmic content (Cyt) and occasionally cells with nucleus (N) and nucleolus (n). G-I Epidermal cells show membranes disjoined to cell wall (Cw), remains cytoplasmic (Cr) and engorged cell wall (bar = 1µm).



**Figure 7.** Ultrastructural morphology of galls of 36 mm in diameter. A-B Nutritive cells present a great amount of autophagic vacuoles (Va) and few cells with nucleus (N) or nucleolus (n). C-D Spongy cells present cytoplasmic remains (Cr) and thickened cell wall (Cw). E The epidermal cells present cell membrane (Cm) and thickened cell wall (Cw) (bar = 1  $\mu$ m).



**Figure 8.** Ultrastructural morphology of galls of 56 mm in diameter galls. A-B Nutritive cells present few cytoplasmic remains (Cr). C-D Spongy tissue cells present cell wall (Cw) and cytoplasmic remains (Cr). E-F Epidermal cells (bar = 1  $\mu$ m).

with lipidic materials with enlarged nuclei and nucleoli (Harper *et al.*, 2004), agree with the found in nutritive cells in the galls induced by *A. muchoacaensis*. The presence of chloroplasts in epidermal cells suggest photosynthetic activity during early stages of gall growth.

The most impressive events of growth and metabolic process during gall development, such as proteins synthesis and generation of energy materials, occur during early stages of growth. The nucleolus, where the ribosomal subunits are assembled, appears granular (Hernández-

Verdún, 2006). The nucleolar hypertrophy and the increment of ribosome biogenesis in plant cells stimulate induce proliferation as a result of greater biosynthetic demand (Montanaro *et al.*, 2008). In later stages of growth, the total absorption of this energy, the assimilation of proteins and the absorption of all cellular components occurred; these processes occurred from outer to inner cell layers. All these processes finished with a thickened cell wall maintaining the shape and hardness of the galls that provide protection to the wasp during the pupal stage (Stone *et al.*, 2002).

The larvae of gall-inducing Cynipidae can alter the physiology of host tissues (Leggo and Shorthouse, 2006), the structure and anatomy of layers of gall is related with the stage of development of insect inside of this structure. The changes in the nutritive, spongy and epidermal cells show the specific requirements of insect in growth and metamorphosis. A complex interaction between insects and plants manifests in galls induced by insects, among which the most diversified group is the Cynipidae (Stone and Schönrogge, 2003). Galls provide food, shelter and protection to the larvae of the Cynipidae enabling them to complete their life cycles. In this study, we explain the differentiation and structure of cells that make the galls induced by *Amphibolips michoacaensis* on *Quercus castanea* leaves.

## Acknowledgments

Authors thank to A. Raman and two anonymous reviewers that improved earlier drafts of this manuscript. PHS acknowledges financial support from CONACYT (scholarship no. 43987) and the Posgrado en Ciencias Biológicas (graduate program) of the Universidad Nacional Autónoma de Mexico (UNAM). This project was supported by SEMARNAT-CONACYT grants 2004-C01-97, 200623728, CONACYT 38550-V, 2007-80493 and DGAPAUNAM grants IN209108, IN229803 and IV201015.

## Literature Cited

- Bronner R. 1973. Propriétés lytiques des œufs de *Biorhiza pallida* Ol. OO<sub>2</sub>. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris* **276**:189-192.
- Bronner R. 1977. Contributions à l'étude histochimique des tissus nourriciers des zoocécidies. *Marcellia* **40**:1-134.
- Bronner R. 1992. The role of nutritive cells in the nutrition of cynipids and cecidomyiids. In: Shorthouse J.D. and Rohfritsch O. Eds. *Biology of Insect-Induced Galls*, pp. 118-140. Oxford University Press, Oxford.
- Brooks S.E. and Shorthouse J.D. 1997. Biology of the rose stem galler *Diplolepis nodulosa* (Hymenoptera: Cynipidae) and its associated component community in central Ontario. *The Canadian Entomologist* **129**:1121-1140.
- Csóka G., Stone G.N. and Melika G. 2005. Biology, ecology and evolution of gall-inducing Cynipidae. In: Raman A., Schaefer C.W. and Withers T.M. Eds. *Biology, Ecology and Evolution of Gall-Inducing Arthropods*, Volume 2 pp. 573-642. Science Publishers, New Hampshire.
- Dreger-Jauffret F. and Shorthouse J.D. 1992. Diversity of gall-inducing insects and their galls. In: Shorthouse J.D. and Rohfritsch O. Eds. *Biology of Insect-Induced Galls*, pp. 8-33. Oxford University Press, Oxford.
- Harper L.J., Schönrogge K., Lim K.Y., Francis P. and Lichtenstein C.P. 2004. Cynipid galls: insect-induced modifications of plant development create novel plant organs. *Plant Cell and Environment* **27**:327-335.
- Hernández-Verdún D. 2006. Nucleolus: from structure to dynamics. *Histochemistry and Cell Biology* **125**:127-137.
- Jiménez-García L.F. and Segura-Valdéz M.L. 2004. Visualizing nuclear structure *in situ* by atomic force microscopy. *Methods in Molecular Biology* **242**:191-199.
- LeBlanc D.A. and Lacroix C.R. 2001. Developmental potential of galls induced by *Diplolepis rosaefolii* (Hymenoptera: Cynipidae) on the leaves of *Rosa virginiana* and influence of *Periclistus* species on the *Diplolepis rosaefolii* galls. *International Journal of Plant Sciences* **162**:29-46.
- Leggo J.J. and Shorthouse J.D. 2006. Development of stem galls induced by *Diplolepis trifurca* (Hymenoptera: Cynipidae) on *Rosa aciculais* (Rosaceae). *The Canadian Entomologist* **138**:661-680.
- Maresquelle H.J. and Meyer J. 1965. Physiologie et morphogénèse des galles d'origine animale (zoocécidies). In: Ruhland W., Ashby E., Bonner J., Geiger-Huber M., James W.O., Lang A., Müller D. and Stälfelt M.G. Eds. *Handbuch der Pflanzenphysiologie, Band XV: Differenzierung und Entwicklung, Teil 2*. Pp. 280-329. Springer-Verlag, Berlin.
- Meyer J. and Maresquelle H.J. 1983. *Anatomie des Galles*. Gebrüder Borntraeger, Berlin.
- Montanaro L., Treté D. and Derenzi M. 2008. Nucleolus, ribosomes and cancer. *The American Journal of Pathology* **173**:301-310.
- Nieves-Aldrey J.L. 1998. Insectos que inducen la formación de agallas en las plantas: una fascinante interacción ecológica y evolutiva. *Boletín S.E.A.* **23**:3-12.
- Nieves-Aldrey J.L. 2001. Hymenoptera Cynipidae. Fauna Iberica Vol. 16. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid.
- Nieves-Aldrey J.L., Pascual E., Maldonado-López Y., Medianero E. and Oyama K. 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.
- Nixon K.C. 1993. The genus *Quercus* in Mexico. In: Ramamoorthy T.P., Bye R., Lot A. and Fa J. Eds. *Biological*

- Diversity of Mexico: Origins and Distribution*, pp 447-458. Oxford University Press, Oxford.
- Price P.W., Fernandes G.W. and Waring G.L. 1987. Adaptive nature of insect galls. *Environmental Entomology* **16**:15-24.
- Raman A. 2007. Insect-induced plant galls of India: unresolved questions. *Current Science* **92**:748-757.
- Raman A. 2011. Morphogenesis of insect-induced plant galls: facts and questions. *Flora* **206**:517-533.
- Raman A., Schaefer C.W. and Withers T.M. Eds. 2005. *Biology, Ecology, and Evolution of Gall-Inducing Arthropods*. Science Publishers, New Hampshire.
- Rey L.A. 1992. Developmental morphology of two types of hymenopterous galls. In: Shorthouse J.D. and Rohfritsch O. Eds. *Biology of Insect-Induced Galls*, pp. 87-101. Oxford University Press, Oxford.
- Rohfritsch O. 1974. Infrastructure du tissu nourricier de la galle de l'*Aulax glechomae* L. sur *Glechoma hederacea* L. *Protoplasma* **81**: 205-230.
- Ronquist F. 1994. Evolution of parasitism among closely related species: phylogenetic relationships and the origin of inquilineism

*Received: June 17th, 2015*

*Accepted: July 2nd, 2015*

- in gall wasp (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.
- Ronquist F. and Liljeblad J. 2001. Evolution of the gall wasp-host plant association. *Evolution* **55**:2503-2522.
- Stone G.N. and Schönrogge K. 2003. The adaptive significance of insect gall morphology. *Trends in Ecology and Evolution* **18**:512-522.
- Stone G.N., Schönrogge K., Atkinson R.J., Bellido D. and Pujade-Villar J. 2002. The population biology of oak gall wasps (Hymenoptera: Cynipidae). *Annual Review of Entomology* **47**:633-668.
- Weis A.E. and Abrahamson W.G. 1986. Evolution of host plant manipulation by gall makers: ecological and genetic factors in the *Solidago-Eurosta* system. *The American Naturalist* **127**:681-695.

## CAPÍTULO II

### **Transcriptómica de la ontogenia presentada por la agalla inducida por *Amphibolips michoacanesis* sobre su planta hospedera *Quercus castanea*.**

Las agallas inducidas por los cinípidos parecen proveer las instrucciones específicas acerca de las características tanto morfo-anatómicas como fisiológicas necesarias que deben presentar las diferentes capas tisulares que conforman la agalla. En la caracterización morfo-anatómica de la agalla inducida por *A. michoacaensis* sobre *Q. castanea*, se describen las características de las capas tisulares que conforman esta agalla; células nutritivas, tejido esponjoso y epidermis. Estas características morfoanatómicas son características y específicas para cada tejido y cambian a corde al crecimiento (tamaño) de la agalla (Hernández-Soto *et al.*, 2015).

Las células nutritivas en estadios tempranos de desarrollo presentan grandes vacuolas, hipertrofia de núcleo y nucléolo; este último con estructura granular, retículo endoplasmático rugoso, una gran cantidad de ribosomas, así como una pequeña cantidad de amiloplastos en el citoplasma. Las células del tejido esponjoso presentan una gran cantidad de amiloplastos, núcleo y nucléolo hipertrofiados con pérdida en su estructura en comparación a las células nutritivas. Las células de la epidermis presentan paredes celulares engrosadas y una gran cantidad de cloroplastos y mitocondrias. En función al crecimiento de la agalla las células de estos tejidos se “vacían” de afuera hacia adentro (Hernández-Soto *et al.*, 2015).

Tomando en cuenta que la función de las células nutritivas es proporcionar alimento a la larva del insecto, es coherente que las células de este tejido presenten grandes cantidades de ribosomas, ya que esto se puede traducir en síntesis de proteínas. Es importante resaltar la estrecha relación que se presenta entre la estructura de las diferentes capas titulares que conforman la agalla con la función que cada una de ellas desempeña.

Las respuestas morfogénicas de las plantas son alteradas como respuesta a los estímulos de oviposición del insecto y la alimentación por parte de la larva, pero aún se sabe poco o nada sobre las señales implicadas en la comunicación planta-insecto que inducen la formación de la agalla. El presente trabajo explora los mecanismos involucrados en la formación y desarrollo de la agalla a través de análisis y comparaciones transcriptómicas, tanto de tejido agallado vs hoja, así como comparaciones entre transcriptomas de agallas a diferentes tiempos de crecimiento y desarrollo. La sobre expresión, así como la represión de los genes en agalla vs hoja y entre sus diferentes estadios permitirá identificar los procesos involucrados en el crecimiento y desarrollo de la agalla producida por *Q. castanea* e inducida por *A. michoacaensis*.

## **Materiales y Métodos**

Agallas inducidas por *A. michoacaensis* Nieves-Aldrey y Maldonado (Cynipidae) fueron colectadas y almacenadas en nitrógeno líquido, en abril-mayo en 2011 y 2012 de árboles de *Q. castanea*, además de la colecta de hojas, en la cuenca de Cuitzeo (19°66'17.5" N; 101°16'70.2" W). Agallas de diferentes tamaños que contuvieran la larva de *A. michoacaensis*, pequeñas (7 mm de diámetro), medianas (14-24 mm de diámetro) y grandes (36-56 mm de diámetro).

## Extracción de RNA

Se retiraron las larvas que contenían las agallas colectadas de 7, 8, 11, 13, 18, 25 y 51.8 mm de diámetro y se realizó la extracción de RNA total así como dos muestras de hoja, usando RNAeasy Kit QIAGEN.

## Ensamblado de secuencias

Se prepararon 9 bibliotecas a partir de RNA total con insertos de 480 pb aproximadamente para posteriormente secuenciar en formato MiSeq 2 x 300 (Tabla 1). Para el ensamblaje del transcriptoma se utilizó Trinity (Trinityrnaseq 2.0.6), el primer ensamble contenía múltiples contigs con secuencias relacionadas, para reducir esta redundancia, se tomó la secuencia más larga de cada cluster (Tabla 2). Los análisis subsecuentes fueron realizados con este reducido set de datos (48,705 componentes).

Para comparar el ensamblaje de secuencias de *de novo* se utilizó blastx en paralelo con la búsqueda de secuencias proteicas no redundantes (nr). Posteriormente los resultados obtenidos de blastx se usaron en Blast2GO para búsqueda de sus anotaciones funcionales.

## Resultados

**Tabla1.** Librerías obtenidas de agallas de diferentes diámetros producidas por *Q. castanea* e inducidas por *A. michoacaensis*

Librería	Diámetro Agalla	Reads
VR1TA6SS01.05	7	2,893,488
VR1TA6SS02.06	8	2,951,096
VR1TA6SS03.15	11	2,841,117
VR1TA6SS04.03	13	1,770,134
VR1TA6SS05.09	18	2,500,707



VR1TA6SS06.25	25	2,314,790
VR1TA6SS07.18	51.8	3,021,797
VR1TA6SS08.27	Hoja 1	3,118,683
VR1TA6SS09.22	Hoja 2	3,569,072

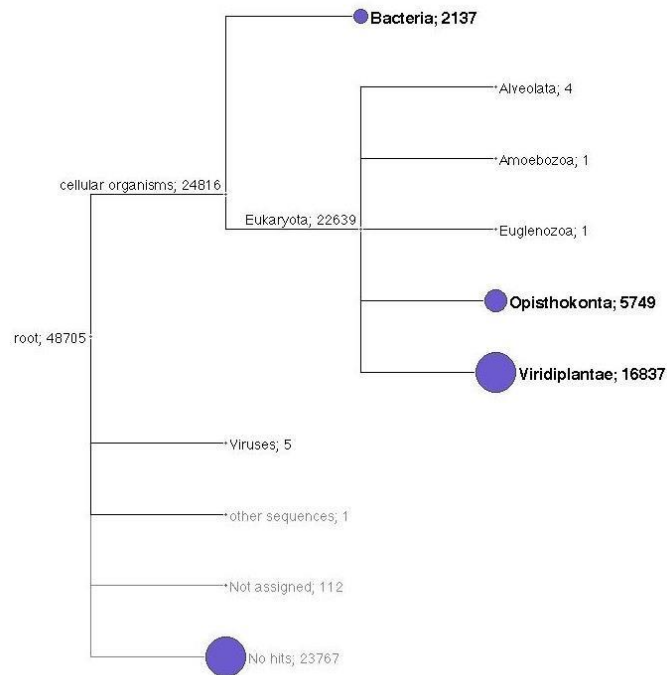
**Tabla2.** Estadísticas del ensamblaje del transcripto de *novovo* de la agalla producida por *Q. castanea* e inducida por *A. michoacaensis*.

<b>Especie</b>	<b>Ensamblado N50</b>	<b>Total de Bases</b>	<b>Promedio de GC</b>
<i>Quercus castanea</i> (Gall) My Seq	1602	157 457 546	39.18
Isoformas más largas por gen	987	79 115 922	39.18

El ensamble del transcripto de *novovo* de la agalla producida por *Q. castanea* e inducida por *A. michoacaensis* resultó en 48,705 contings (secuencia más larga de cada cluster). La predicción protéica resultó en un 48.8% sin hit en la base de datos de nr, un 51.2 % con hit en la base de datos nr, de los cuales 28.66% fueron asociados a con un término de Ontología Genica (GO descripción del gen y atributos del producto génico).

NOTA: La anotación funcional de nuevos datos de secuencia es un requisito principal para la utilización de enfoques genómicos funcionales en la investigación de plantas, Blast2GO es una herramienta bioinformática integral para la anotación funcional de secuencias y la extracción de datos en las anotaciones resultantes, principalmente basadas en el vocabulario de ontología de genes (GO) (Conesa and Götz, 2007).

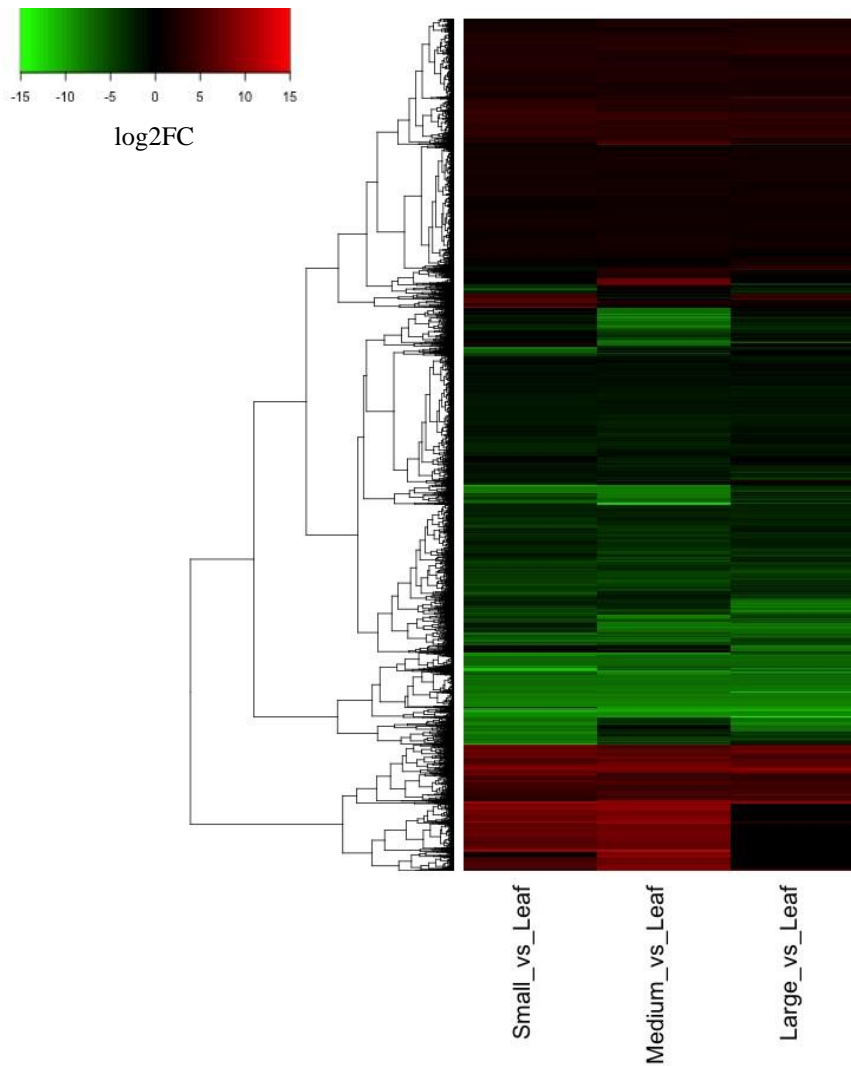
La identificación de y entre familias, muestra tres componentes principales en el ensamblaje; árbol, insecto y bacteria Fig. 1.



**Figura 1.** Distribución de especies del ensamblaje del transcriptoma de *novo* de la agalla producida por *Q. castanea* e inducida por *A. michoacaensis*. El tamaño de los círculos azules refleja el número de secuencias asociadas a cada componente.

## Análisis de expresión diferencial

Los cambios a nivel de expresión diferencial entre el tejido no agallado (hoja) y el tejido agallado (agalla), mostraron 11,816 transcritos diferencialmente expresados (Fig. 2), de los cuales 2627 transcritos son agalla específicos y 1354 no tuvieron hit en la base de datos nr.



**Figura 2.** Perfil Transcriptómico. Diferencias en la expresión durante los diferentes estadios de crecimiento de la agalla vs hoja.

Las categorías sobre expresadas al comparar las fases tempranas de crecimiento de la agalla con las fases tardías de crecimiento, se encuentran asociadas a eventos de ciclo celular, división celular, división nuclear y procesos mitóticos como citocinesis (separación física de la célula), al igual que categorías asociadas; citocinesis dependiente de citoesqueleto, procesos citocinético mitótico, se encuentran sobre expresadas, proceso que además involucra una serie proteínas que forman parte de los microfilamentos y microtúbulos del citoesqueleto, categorías también sobre expresadas.

Asociado a esto también se observan categorías asociadas a la fisión de organelos, los cuales también es necesario se dividan durante la división celular.

Las categorías relacionadas a la regulación de ciclo celular mitótico, la transición de fase del ciclo celular mitótico y regulación de transición también se encuentran sobre expresadas.

En un organismo en crecimiento o desarrollo es primordial la división celular; posterior a esto se dan procesos de diferenciación celular, procesos cuyo objetivo es la especialización celular que producirán una función específica. Dentro de las categorías sobre expresadas durante la fase de crecimiento de la agalla se encuentran las asociadas al desarrollo post embrionario, multicelular y procesos de regulación de ambas, así como categorías de desarrollo anatómico, asociadas a la progresión de un estadio celular inicial a un estado maduro, morfogénesis post embrionaria y morfogénesis estructural anatómica (Sánchez and Yamanaka, 2014).

La morfogénesis es un proceso postembrionario mediante el cual se generan y organizan estructuras anatómicas. Las agallas inducidas por cinípidos son consideradas estructuralmente las más complejas, ya que poseen una serie de capas con características particulares cada una de ellas, así como funciones específicas, como las que presenta la agalla inducidas por cinípidos; tejido nutritivo, tejido esponjo, epidermis (Price *et al.*, 1987). La sobre expresión de las categorías antes mencionadas indica cómo durante la fase de crecimiento de la agalla se comienza con la diferenciación morfológica posterior a la división celular que también se da durante esta fase de crecimiento de la agalla (Fehér and Magyar, 2015).

La categoría de formación, morfogénesis y desarrollo post embrionario de órganos (florales) y desarrollo de brotes sugieren que estas son utilizadas por las avispas inductoras de agallas para la formación de la agalla. Es interesante puntualizar que la formación de esta agalla se hace a partir de los brotes que dan origen a las hojas de *Q. castanea*, mecanismos propios de la planta los cuales al parecer utiliza *A. michoacaensis* “engañando” a la planta al hacerla creer que está formando órganos propios, hojas y flores, los cuales son de suma importancia tanto para la alimentación de la planta como

para su reproducción (Becker *et al.*, 2011; Kalve *et al.*, 2014), ya que también se muestra una sobre expresión de categorías relacionadas con el desarrollo de estructuras del sistema reproductivo (Tabla 3).

Procesos de biosíntesis y biogénesis se encuentran sobre expresados en las agallas pequeñas, los cuales están íntimamente relacionados a procesos de preparación para la división celular: biosíntesis de nucleótidos de pirimidina, nucleótidos, nucleósidos fosfatos, biogénesis de complejos proteicos, biogénesis de componentes celulares, proceso que resulta en la biosíntesis, ensamblaje y disposición de las macromoléculas constituyentes de componentes celulares. Incluye la biosíntesis y modificaciones macromoleculares que participan en la síntesis o el ensamblaje de los componentes celulares, biosíntesis de compuestos orgánicos, organonitrogenados, orgánico cíclicos, aromáticos, nitrogenados, heterocíclicos, organofosfato, macromoléculas celulares, procesos biosintéticos relacionados a la construcción de moléculas complejas a partir de moléculas más sencillas y tetraterpenoides (Neufeld and Edgar, 1998; Polymenis and Schmidt, 1999) (Tabla 3).

Se identificó la sobre expresión de categorías relacionadas a biogénesis de ribosomas; biogénesis de complejo ribonucleoproteína, pre-ribosomas, subunidades ribosomales, procesamiento de RNAr e hidrólisis así como procesos biosintéticos de regulación de RNA, regulación de macromoléculas celulares y regulación de procesos biosintéticos celulares (Tabla 3).

Respecto a metabolismos encontramos categorías sobre expresadas en el metabolismo de nucleótidos, nucleótidos de pirimidina, nucleósido fosfato, compuestos que contienen pirimidinas, compuestos orgánicos cíclicos, compuestos celulares aromáticos, compuestos heterocíclicos, compuestos nitrogenados, procesos metabólicos de RNA y RNAr, ácido nucleico, ácido monocarboxílico, procesos de regulación del metabolismo celular, moléculas pequeñas, metabolismo primario y secundario, fenilpropanoides, lignina, piruvato, ácido carboxílico, organofosfato, especies reactivas de oxígeno, ácidos orgánicos y de DNA. Además de la sobre expresión de categorías funcionales relacionadas a la regulación negativa de metabolismo de macromoléculas,

regulación de metabolismo de compuestos nitrogenados, de biosíntesis y regulación de macromoléculas celulares y procesos biosintéticos.

La sobre expresión de categorías de regulación; regulación negativa de la expresión genética, epigenética, silenciamiento génico, silenciamiento de cromatina, transcripción (templado DNA) de procesos de biosíntesis y regulación metabólica de RNA y procesos biológicos, reflejan la diferenciación celular que se puede estar dando durante el desarrollo de la agalla, ya que dependiendo del tipo celular en el cual se diferencia cada una de las células es la batería de genes que se expresa.

La Organización de cromosomas, modificación de DNA, alquilación del DNA, lesiones por alquilación en DNA y RNA resultan de compuestos endógenos, agentes ambientales y fármacos alquilantes, así como la sobre expresión de categorías relacionadas a la organización del núcleo. La sobre expresión de categorías relacionadas son la modificación de histonas, metilación (metilación de lisina) de histonas y modificaciones covalentes de cromatina son procesos que se encuentran asociados a la regulación de genética, la estructura y modificaciones de la cromatina representan un nivel adicional de regulación para todos los procesos metabólicos del DNA incluidos transcripción, recombinación, reparación del DNA, replicación, formación del centrómero, etc. actuando como una plataforma donde se integran las señales biológicas y tienen lugar las respuestas moleculares (Bártová *et al.*, 2008).

El punto de control de expresión génica mejor conocido y más importante en eucariotas es el inicio de la transcripción, los cuales determinan si un gen se transcribirá y con qué frecuencia Tabla 3. La sobre expresión de estas categorías muestran un alto grado de regulación en el proceso de formación y crecimiento de la agalla.

La sobre expresión de las categorías; componentes (partes) celulares, intracelulares, componentes de organelos y organelos, así como de organización de componentes celulares, organelos, estroma, componentes de plastidios y citoplasmáticos, plastidios indican una gran actividad de generación y organización intracelular, en el estadio temprano de crecimiento de la agalla inducida por *A. michoacaensis* sobre *Q. castanea* esto se correlaciona con las mitocondrias la cantidad de amiloplastos observados durante fases tempranas de crecimiento Tabla 3.

También podemos hablar de una gran movilización dentro de la célula, por la sobre expresión de categorías relacionadas a; procesos basados en microtúbulos asociados al citoesqueleto, actividad motora (catálisis de movimiento a través de los microtúbulos), unión a tubulina, complejos asociados a microtúbulo, citoesqueleto y proteínas de unión al citoesqueleto, así como el transporte intracelular proteico, transporte nuclear (movimiento dirigido de sustancias dentro, fuera o dentro del núcleo) y exportación nuclear, exportación de RNA desde el núcleo, transporte nucleoplasmático (movimiento dirigido de moléculas entre el núcleo y el citoplasma), transporte intracelular, transporte de proteínas, RNA, ácidos nucleicos, lo que indica la gran movilidad y actividad intracelular que se presentan en las células en estadios tempranos de crecimiento.

Es interesante encontrar sobre expresión de procesos reproductivos (desarrollo), desarrollo de estructuras reproductivas, progresión de las estructuras que se utilizan en el proceso de creación de nuevos individuos, desde su formación hasta las estructuras maduras, que al asociar con las categorías de desarrollo de sistemas de brotes reproductivos, morfogénesis y desarrollo de órganos florales y desarrollo de gametofito, indica que la avispa inductora de agallas estimula mecanismos de reproducción del huésped y dada la importancia de la reproducción en cualquier especie, la planta redirige sus recursos para procesos de reproducción sin identificar que realmente está alimentando y cuidando al “gameto-larva” de un insecto el de la avispa inductora de agallas Tabla 3.

Se puede observar una gran sobre expresión de categorías relacionadas a partes celulares, intracelulares, partes de organelos y organelos, organización de componentes celulares y organelos Tabla 3, necesarios en los procesos de crecimiento celular y diferenciación.

Las sobre expresión de conexiones celulares indica la comunicación existente entre las células que conforman la agalla, las cuales pueden estar censando las señales producidas por el insecto en desarrollo, así como las condiciones ambientales.

Los resultados de las categorías sobre expresadas reflejan una gran movilidad intracelular; procesos basados en microtúbulos, citoesqueleto, actividad motora, unión a tubulina, además de Transporte nuclear, nucleoplasmático, exportación de RNA del núcleo, exportación nuclear, transporte de RNA, transporte de ácidos nucleicos y transporte intracelular de proteínas indican una gran actividad entre el núcleo y el citoplasma.

**Tabla 3.** Categorías Funcionales sobre expresadas en estadios tempranos de desarrollo FS Down.

	<b>Categoría Funcional</b>	<b>Dc</b>	<b>D,M</b>	<b>B</b>	<b>Reg</b>	<b>M</b>	<b>Res</b>	<b>AN</b>
1	intracellular non-membrane-bounded organelle							
2	non-membrane-bounded organelle							
3	pyrimidine nucleotide biosynthetic process							
4	cell part							
5	Cell							
6	intracellular part							
7	Intracellular							
8	pyrimidine nucleotide metabolic process							
9	pyrimidine-containing compound biosynthetic process							
10	intracellular organelle							



11	cellular component organization or biogenesis	yellow						
12	Organelle	light green						
13	developmental process		orange					
14	pyrimidine-containing compound metabolic process					dark green		
15	microtubule-based process	orange						
16	intracellular organelle part	light green						
17	microtubule cytoskeleton	orange						
18	single-organism developmental process		orange					
19	organelle part	light green						
20	ribosome biogenesis			dark blue				
21	cellular component biogenesis			dark blue				
22	multicellular organismal development		orange					
23	histone methylation							light blue
24	motor activity	orange						
25	macromolecule methylation							
26	Methylation							
27	tubulin binding	orange						
28	cell cycle	yellow						
29	protein methylation							
30	ribonucleoprotein complex biogenesis			dark blue				
31	single-multicellular organism process							
32	protein alkylation							
33	multicellular organismal process							
34	cell division	yellow						
35	cytoskeleton-dependent cytokinesis	yellow						



61	organonitrogen compound biosynthetic process			dark blue				
62	ribonucleoprotein complex							
63	developmental process involved in reproduction		yellow					
64	cell cycle process	yellow						
65	reproductive process							
66	regulation of DNA metabolic process				red	dark green		
67	histone lysine methylation							light blue
68	organelle organization							
69	peptidyl-lysine methylation							
70	regulation of developmental process		yellow					
71	heterocycle metabolic process					dark green		
72	membrane-bounded organelle							
73	macromolecular complex							
74	negative regulation of gene expression				red			
75	intracellular membrane-bounded organelle							
76	negative regulation of macromolecule metabolic process				red	dark green		
77	regulation of nitrogen compound metabolic process				red	dark green		
78	cellular nitrogen compound metabolic process				red	dark green		
79	chromosome organization							light blue
80	nucleobase-containing compound metabolic process					dark green		
81	regulation of nucleobase-containing compound metabolic process				red	dark green		
82	organic cyclic compound biosynthetic process			dark blue				
83	aromatic compound biosynthetic process			dark blue				
84	nitrogen compound metabolic process					dark green		
85	regulation of multicellular organismal development		yellow		red			

86	gene silencing				Red			
87	cellular nitrogen compound biosynthetic process			Dark Blue				
88	regulation of gene expression, epigenetic				Red			Light Blue
89	cellular protein localization							
90	cellular macromolecule localization							
91	intracellular protein transport							
92	plastid stroma							
93	nucleotide biosynthetic process			Dark Blue				
94	regulation of cell cycle	Yellow			Red			
95	DNA alkylation							Light Blue
96	nucleobase-containing compound biosynthetic process			Dark Blue				
97	DNA modification							Light Blue
98	heterocycle biosynthetic process			Dark Blue				
99	regulation of multicellular organismal process				Red			
100	negative regulation of metabolic process				Red	Dark Green		
101	RNA metabolic process					Dark Green		
102	macromolecular complex subunit organization							
103	organic substance metabolic process					Dark Green		
104	cellular macromolecule metabolic process					Dark Green		
105	peptidyl-lysine modification							
106	cullin-RING ubiquitin ligase complex							
107	anatomical structure development		Yellow					
108	structural molecule activity							
109	nucleoside phosphate biosynthetic process			Dark Blue				
110	cellular metabolic process					Dark Green		
111	(-) regulation of nitrogen compound metabolic process				Red			

112	(-) regulation of nucleobase-containing compound metabolic process				Red			
113	rRNA metabolic process					Dark Green		
114	nuclear transport							
115	nucleocytoplasmic transport							
116	negative regulation of biological process				Red			
117	post-embryonic morphogenesis		Yellow					
118	nucleic acid metabolic process					Dark Green		
119	Preribosome			Dark Blue				
120	monocarboxylic acid metabolic process					Dark Green		
121	regulation of cellular metabolic process				Red	Dark Green		
122	negative regulation of nucleic acid-templated transcription				Red			
123	negative regulation of gene expression, epigenetic				Red			Light Blue
124	chromatin silencing				Red			Light Blue
125	negative regulation of transcription, DNA-templated				Red			Light Blue
126	rRNA processing							Light Blue
127	(-) regulation cellular macromolecule biosynthetic process				Red			
128	negative regulation of RNA metabolic process				Red	Dark Green		
129	negative regulation of RNA biosynthetic process				Red			
130	anatomical structure morphogenesis		Yellow					
131	negative regulation of cellular biosynthetic process				Red			
132	negative regulation of macromolecule biosynthetic process				Red			
133	organophosphate biosynthetic process			Dark Blue				
134	anatomical structure formation involved in morphogenesis		Yellow					
135	macromolecule metabolic process					Dark Green		
136	negative regulation of cellular metabolic process				Red	Dark Green		

137	negative regulation of biosynthetic process									
138	intracellular transport									
139	cytoskeletal protein binding									
140	organ formation									
141	regulation of primary metabolic process									
142	small molecule metabolic process									
143	protein binding									
144	cell-cell junction									
145	establishment of localization in cell									
146	establishment of protein localization									
147	floral organ formation									
148	RNA export from nucleus									
149	nucleus organization									
150	plastid part									
151	cellular localization									
152	peptidyl-amino acid modification									
153	macromolecule biosynthetic process									
154	single-organism process									
155	single-organism organelle organization									
156	phosphotransferase activity, carboxyl group as acceptor									
157	Cytoplasm									
158	protein deneddylation									
159	cell junction									
160	floral organ development									
161	ubiquitin ligase complex									

162	floral organ morphogenesis								
163	protein transport								
164	post-embryonic organ development								
165	cellular macromolecule biosynthetic process								
166	cytoplasmic part								
167	protein complex assembly								
168	nucleotide metabolic process								
169	regulation of nucleic acid-templated transcription								
170	regulation of transcription, DNA-templated								
171	cleavage involved in rRNA processing								
172	protein complex biogenesis								
173	regulation of RNA biosynthetic process								
174	organelle fission								
175	post-embryonic organ morphogenesis								
176	gametophyte development								
177	negative regulation of cellular process								
178	nucleoside phosphate metabolic process								
179	shoot system development								
180	regulation of RNA metabolic process								
181	nuclear export								
182	oxidoreductase activity, acting on diphenols and related substances as donors, oxygen as acceptor								
183	transferase complex								
184	extracellular region								
185	regulation of cellular macromolecule biosynthetic process								
186	phenylpropanoid metabolic process								
187	carboxypeptidase activity								

188	lignin metabolic process					█		
189	reproductive system development		█					
190	reproductive structure development		█					
191	regulation of macromolecule biosynthetic process			█	█			
192	establishment of RNA localization							
193	RNA localization							
194	oxidoreductase activity, acting on diphenols and related substances as donors							
195	RNA transport							
196	nucleic acid transport							
197	single organism reproductive process		█					
198	nucleobase-containing small molecule metabolic process					█		
199	regulation of cellular biosynthetic process			█	█			
200	macromolecular complex assembly							
201	lyase activity							
202	regulation of biosynthetic process			█	█			
203	pyruvate metabolic process					█		
204	response to light stimulus						█	
205	Plastid							
206	response to chemical						█	
207	carboxylic acid metabolic process					█		
208	organelle envelope		█					
209	Ribosome			█				
210	macromolecule localization							
211	organophosphate metabolic process					█		
212	response to radiation						█	



213	organ morphogenesis								
214	flower development								
215	protein localization								
216	regulation of biological process								
217	secondary metabolic process								
218	external encapsulating structure								
219	regulation of mitotic cell cycle								
220	transcription, DNA-templated								
221	biological regulation								
222	response to drug								
223	drug transport								
224	regulation of cellular process								
225	cyclo-ligase activity								
226	regulation of reactive oxygen species metabolic process								
227	Cellularization								
228	Envelope								
229	oxoacid metabolic process								
230	nucleic acid-templated transcription								
231	organic acid metabolic process								
232	response to red or far red light								
233	protein targeting								
234	response to abiotic stimulus								
235	protein complex subunit organization								
236	reproductive shoot system development								
237	ribosomal subunit								

238	cellular component assembly							
239	ncRNA processing							
240	regulation of macromolecule metabolic process							
241	nuclear division							
242	carbon-oxygen lyase activity							
243	regulation of cell cycle phase transition							
244	regulation of mitotic cell cycle phase transition							
245	cell cycle phase transition							
246	mitotic cell cycle phase transition							
247	tetraterpenoid biosynthetic process							
248	regulation of metabolic process							

\*Las categorías funcionales, Dc = División celular, D, M = Desarrollo y Morfogénesis, B = Biosíntesis, Reg = Regulación, M = Metabolismo, Res = Respuesta y AN =Actividad en Núcleo.

Las categorías funcionales sobre expresadas durante fases tardías vs las fases tempranas de crecimiento se encuentran asociadas a la respuesta a diversos compuestos así como estímulos entre los que destacan endógenos y otros organismos, lo que indica que la planta reconoce la existencia de señales que provienen de otro organismo.

También se encuentran sobre expresadas categorías relacionadas a componentes del cloroplasto así como a la biosíntesis de diversos compuestos, entre los que podemos destacar la biosíntesis de Metabolitos secundarios y procesos relacionados al metabolismo secundario. Carneiro e Isaias (2015) reportan un gradiente bidireccional de metabolitos en agallas, propuesto por Bronner (1992), al parecer la larva de *A. michoacaensis* conserva la defensa química natural de su hospedero en la agalla, con el fin de evitar que la agalla sea parasitada por otros organismos Tabla 4.

Se puede observar la sobre expresión de categorías asociadas a procesos de catabolismo y autofagia así como la regulación de negativa de algunos procesos metabólicos y actividad proteolítica que reflejan la absorción total de nutrientes que ocurre en esta fase de acuerdo a los resultados reportados en esta fase de desarrollo Hernández-Soto y colaboradores (2015).

Cabe resaltar la gran cantidad de categorías de transferasas también se encuentran sobre expresadas durante la fase tardía de crecimiento.

**Tabla 4.** Categorías Funcionales sobre expresadas en estadios tardíos de desarrollo FS Up.

	Categoría Funcional	Res	Plas	B	Cat	Reg	Tran
1	response to stimulus						
2	response to chemical						
3	oxidoreductase activity						
4	cofactor catabolic process						
5	porphyrin-containing compound catabolic process						
6	tetrapyrrole catabolic process						
7	response to organic substance						
8	photosynthetic membrane						
9	Photosystem						
10	kinase activity						
11	response to endogenous stimulus						
12	response to acid chemical						
13	response to oxygen-containing compound						
14	catalytic activity						
15	phosphotransferase activity, alcohol group as acceptor						
16	single-organism process						
17	transferase activity						



44	inositol phosphate metabolic process						
45	S-glycoside biosynthetic process						
46	glycosinolate biosynthetic process						
47	hydrolase activity, acting on glycosyl bonds						
48	alcohol biosynthetic process						
49	oxidoreductase activity, acting on single donors						
50	single-organism localization						
51	cation binding						
52	response to stress						
53	oxidoreductase activity, acting on paired donors						
54	Thylakoid						
55	hormone-mediated signaling pathway						
56	cellular response to endogenous stimulus						
57	cellular response to hormone stimulus						
58	organic hydroxy compound biosynthetic process						
59	hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds						
60	metal ion binding						
61	response to hexose						
62	S-glycoside metabolic process						
63	glycosinolate metabolic process						
64	response to monosaccharide						
65	metal ion transport						
66	cellular response to organic substance						
67	signal transducer activity						
68	monooxygenase activity						
69	Photosynthesis						



96	regulation of peptidase activity						
97	sulfate transport						
98	sulfur compound metabolic process						
99	sulfur amino acid biosynthetic process						
100	tetrapyrrole binding						

\*Las categorías funcionales, Res = Respuesta, Plas = Plastidio, B = Biosíntesis, Cat =Catabolismo, Reg = Regulación, M = Metabolismo y Tran = Trasferasas

En estadios intermedios comparados con estadios tempranos de crecimiento se pueden identificar categorías funcionales sobre expresadas relacionadas a división celular, ciclo celular y procesos mitóticos además de procesos de morfogénesis; órgano floral, órgano post-embriónica y formación de órganos. En estadios intermedios de crecimiento aún no se alcanza el diámetro máximo que presentan las agallas en estadios finales de crecimiento, por lo que en esta fase todavía se observan categorías asociadas a la división celular Fig. 4



**Figura 4.** Agalla inducida por *A. michoacaensis* sobre *Q. castanea* en diferentes etapas de crecimiento.

El que categorías relacionadas a la regulación negativa de la expresión de algunos genes, así como de algunos procesos metabólicos se encuentren sobre expresadas sugieren la regulación selectiva que se lleva a cabo durante el crecimiento de la agalla Tabla 5.

**Tabla 5.** Categorías Funcionales sobre expresadas en estadios intermedios de desarrollo MS Down.

	<b>Categoría Funcional</b>	<b>Dc</b>	<b>D y M</b>	<b>Reg</b>	<b>Mic</b>
1	microtubule-based process				
2	microtubule cytoskeleton				
3	Cytoskeleton				
4	cytoskeletal part				
5	cytoskeleton-dependent cytokinesis				
6	motor activity				
7	cell division				
8	tubulin binding				
9	mitotic cytokinetic process				
10	mitotic cytokinesis				
11	Cytokinesis				
12	microtubule associated complex				
13	cytokinetic process				
14	floral organ formation				
15	anatomical structure formation involved in morphogenesis				
16	mitotic cell cycle process				
17	floral organ morphogenesis				
18	mitotic cell cycle				
19	post-embryonic organ morphogenesis				
20	cell cycle				
21	post-embryonic morphogenesis				
22	regulation of cell cycle				



23	organ formation				
24	cell cycle process				
25	gene silencing				
26	negative regulation of metabolic process				
27	negative regulation of gene expression				
28	negative regulation of macromolecule metabolic process				
29	response to organic cyclic compound				

\*Las categorías funcionales, Dc = División celular, D y M = Desarrollo y Morfogénesis, Reg = Regulación y Mic = Microtúbulos.

Las categorías funcionales sobre expresadas en estadios intermedios de desarrollo encontramos categorías que marcan el inicio de procesos relacionados con el catabolismo Fig. 6.

**Tabla 6.** Categorías Funcionales sobre expresadas en estadios intermedio de desarrollo MS Up.

	Categoría Funcional	M	Cat	Oxi-re
1	oxidoreductase activity			
2	catalytic activity			
3	flavonoid metabolic process			
4	peptide transport			
5	oxidoreductase activity			

\*Las categorías funcionales; M = Metabolismo, Cat = Catabolismo y Oxi-re = Oxido reductasa

Las categorías funcionales sobre expresadas en los estadios intermedios de crecimiento vs los estadios tardíos reflejan actividad de crecimiento; ciclo celular, mitosis, citocinesis, que aún se da en estadios intermedios pues aun la agalla no presenta su tamaño final Fig. 4, por lo que no es raro encontrar en estos estadios división celular, así como procesos de desarrollo post-embryonico y reproductivo. También se puede observar la sobre expresión de procesos de biogénesis de componentes celulares, pirimidinas,

aminoácidos así como procesos metabólicos; metabolismo secundario y fenilpropanoides importantes para mantener las defensas en la agalla Tabla 7.

**Tabla 7.** Categorías Funcionales sobre expresadas en estadios intermedio de desarrollo FM Down.

	<b>Categoría Funcional</b>	<b>Dc</b>	<b>D y M</b>	<b>B</b>	<b>M</b>	<b>R</b>
1	intracellular organelle					
2	Organelle					
3	developmental process					
4	cellular component organization or biogenesis					
5	microtubule-based process					
6	membrane-bounded organelle					
7	cell part					
8	Cell					
9	intracellular membrane-bounded organelle					
10	Intracellular					
11	intracellular part					
12	organelle part					
13	pyrimidine nucleotide biosynthetic process					
14	carbon-oxygen lyase activity, acting on phosphates					
15	cell cycle					
16	pyrimidine nucleotide metabolic process					
17	flavonoid metabolic process					
18	single-organism biosynthetic process					
19	single-organism developmental process					
20	secondary metabolic process					
21	pyrimidine-containing compound biosynthetic process					

22	cell cycle process	Yellow				
23	plastid stroma					
24	lyase activity					
25	intracellular organelle part					
26	multicellular organismal development		Orange			
27	phenylpropanoid metabolic process				Dark Green	
28	macromolecule methylation					
29	Methylation					
30	cellular component organization					
31	single-multicellular organism process					
32	cleavage involved in rRNA processing					
33	cellular amino acid biosynthetic process			Dark Blue		
34	multicellular organismal process					
35	mitotic cell cycle process	Yellow				
36	small molecule biosynthetic process			Dark Blue		
37	organic acid biosynthetic process			Dark Blue		
38	carboxylic acid biosynthetic process			Dark Blue		
39	histone methylation					
40	organic cyclic compound metabolic process				Dark Green	
41	mitotic cytokinetic process	Yellow				
42	mitotic cytokinesis	Yellow				
43	intracellular non-membrane-bounded organelle					
44	non-membrane-bounded organelle					
45	cellular aromatic compound metabolic process				Dark Green	
46	cellular component biogenesis			Dark Blue		
47	carbon-oxygen lyase activity					

48	mitotic cell cycle	Yellow				
49	response to drug					Grey
50	drug transport					
51	single-organism cellular process					
52	plastid envelope		Orange			
53	protein methylation					
54	Plastid					
55	external encapsulating structure					
56	cytoskeleton-dependent cytokinesis	Yellow				
57	motor activity					
58	reproductive process		Orange			
59	pyrimidine-containing compound metabolic process				Dark Green	
60	plastid part					
61	developmental process involved in reproduction		Orange			
62	cell division	Yellow				
63	post-embryonic development		Orange			
64	DNA metabolic process				Dark Green	
65	protein alkylation					
66	sulfur compound metabolic process				Dark Green	
67	cytokinetic process	Yellow				

\*Las categorías funcionales, Dc = División celular, D y M = Desarrollo y Morfogénesis, B = Biosíntesis, Reg = Regulación y M = Metabolismo.

Las categorías sobre expresadas en estadios tardíos de crecimiento vs estadios intermedios muestran pocas categorías relacionadas a procesos biosintéticos y metabólicos Tabla 8.

Categorías relacionadas a la respuesta a diversos estímulos también se encuentran sobre expresadas, así como una mayor cantidad de procesos catabólicos.

**Tabla 8.** Categorías Funcionales sobre expresadas en estadios intermedio de desarrollo FM Up.

	<b>Categoría Funcional</b>	<b>B</b>	<b>M</b>	<b>Res</b>	<b>Cat</b>	<b>Tran</b>
1	kinase activity					
2	catalytic activity					
3	transferase activity					
4	oxidoreductase activity					
5	inositol phosphate metabolic process					
6	inositol phosphate biosynthetic process					
7	polyol biosynthetic process					
8	alcohol biosynthetic process					
9	transferase activity, transferring phosphorus-containing groups					
10	phosphotransferase activity, alcohol group as acceptor					
11	organic hydroxy compound biosynthetic process					
12	protein kinase activity					
13	secondary metabolic process					
14	response to endogenous stimulus					
15	response to acid chemical					
16	response to organic substance					
17	alcohol metabolic process					
18	inorganic anion transport					
19	phenylpropanoid metabolic process					
20	response to hormone					
21	response to chemical					

22	organic hydroxy compound metabolic process					
23	response to oxygen-containing compound					
24	polyol metabolic process					
25	response to stimulus					
26	O-acetyltransferase activity					
27	thylakoid part					
28	cofactor catabolic process					
29	porphyrin-containing compound catabolic process					
30	tetrapyrrole catabolic process					
31	secondary metabolite biosynthetic process					

\*Las categorías funcionales, B = Biosíntesis, M = Metabolismo, Res = Respuesta. Cat =Catabolismo y Tran = Transferasa.

Resultados de los análisis transcriptómicos obtenidos se incluyen en el capítulo “Ecological genomics of insect-plant interactions: The case of wasp-induced galls”.

## DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

Lacaze-Duthiers (1983) fue el primero en describir el tejido que rodeaba la cámara larval, desde entonces numerosos trabajos han descrito las características citológicas de las células nutritivas de las agallas, en términos generales estas se caracterizan por:

- Un abundante citoplasma y una reducida y fragmentada vacuola (Molliard 1897; Meyer 1948).
- Hipertrofia del núcleo y nucléolo (Molliard 1897; Meyer 1950; Garrigues 1951; Woll 1954 a, b)
- Y abundantes organelos citoplasmáticos (Meyer 1948; Garrigues 1951).

Estudios ultra-estructurales (Jaufret 1972, 1973; Meyer 1973; Rey 1976,1979; Rohfritsch (1971 a, b; 1974) reportan las características de las células nutritivas:

- Núcleo hipertrofiado con frecuencia lobulado, el nucléolo hipertrofiado.
- Ribosomas abundantes en el citoplasma con frecuencia agrupados en polisomas. Ribosomas y polisomas muchas veces unidos al ergastoplasma (retículo endoplásmico rugoso)
- Plastidios y mitocondrias numerosas, pobremente diferenciados frecuentemente agrupados alrededor del núcleo.
- Y son comunes vacuolas autofágicas.

Al comparar estas características con las características observadas en las células del tejido nutritivo que conforman la agalla inducida por *A. michoacaensis*, se pueden identificar similitudes; hipertrofia de núcleo y nucléolo, grandes cantidades de ribosomas en estadios tempranos de desarrollo y en estadios intermedios grandes cantidades de amiloplastos en las células nutritivas, así como en el tejido esponjoso de la agalla. En estadios tempranos de desarrollo la vacuola central se encuentra sin fragmentar mientras que en estadios tardíos de desarrollo también son visibles vacuolas autofágicas.

Entre las excepciones encontradas con reportes previos se encuentran las grandes cantidades de mitocondrias. En estadios tempranos de crecimiento de la agalla inducida por *A. michoacaensis* se pueden observar mitocondrias, pero no en grandes cantidades, también se observa una gran cantidad de cloroplastos en estadios tempranos de desarrollo que desaparecen en estadios intermedios y finales de crecimiento. Es importante remarcar que las características de los diferentes tejidos que conforman la agalla inducida por *A. michoacaensis*, se ven modificadas respecto al crecimiento de la agalla (Hernández-Soto *et al.*, 2015).

Con base en la sobre expresión de categorías asociadas a crecimiento y desarrollo post- embrionario son congruentes con el visible crecimiento del diámetro de esta agalla (Fig. 4). Las categorías sobre expresadas con la regulación de ciclo celular y mitosis dejan claro el hecho de que el proceso de crecimiento de la agalla se encuentra regulado y no solo se trata de un crecimiento descontrolado, como es el caso de los tumores tanto en plantas como en animales, los cuales pueden afectar el crecimiento y desarrollo de la planta (Raghavan, 2000).

Bronner (1992) y Hernández-Soto *et al.* (2015) reportan que las células nutritivas de la agalla producidas por cinipidos presentan hipertrofia de nucléolo. Durante la inducción y crecimiento de la agalla existe una gran demanda biosintética, ya que se requiere un incremento de biomasa en las células que se encuentran en división, además de la demanda de biosíntesis de alimento por parte de la larva. La hipertrofia observada en las células del tejido nutritivo en estadios tempranos de desarrollo de la agalla inducida por *A. michoacaensis* concuerda con la sobre expresión de las categorías funcionales relacionadas a la síntesis de ribosomas también en estadios tempranos de desarrollo (Tabla 3).

Existen reportes sobre un incremento en la tasa de transcripción y traducción genética en el tejido nutritivo de la agalla, además el citoplasma de estas células es rico en ribosomas y contiene grandes cantidades de proteína (Shönrogge *et al.*, 2000). Las células nutritivas en estadios tempranos de desarrollo seguramente



también presentan grandes cantidades de proteínas dada la gran cantidad de ribosomas presentes en su citoplasma (Hernández-Soto *et al.*, 2015).

Las categorías relacionadas a morfogénesis y desarrollo post embrionario de órganos (florales) y desarrollo de brotes propios de las hojas de *Q. castanea* al parecer son mimetizados y utilizados por *A. michoacaensis*, haciendo creer a la planta que está formando órganos propios, hojas y flores, órganos de suma importancia tanto para la alimentación de la planta así como para su reproducción, lo anterior apoyado en la sobre expresión de categorías relacionadas con el desarrollo de estructuras del sistema reproductivo de la planta encontrada en fases tempranas de crecimiento de la agalla (Tabla 3).

Como se mencionó anteriormente, durante el crecimiento y desarrollo de la agalla existe un incremento en el número de células que da como resultado el crecimiento de la agalla. Pero además existen procesos de diferenciación dentro de este crecimiento controlado por la larva, que dan como resultado la diferenciación de estas células y como consecuencia las diferentes capas que conforman la agalla.

La gran cantidad de amiloplastos encontrados en las células del tejido nutritivo en estadios tempranos de crecimiento indican la alteración en el metabolismo normal de las células de *Q. castanea*. La selección ciertas rutas metabólicas, dada la regulación positiva y negativa durante el crecimiento de la agalla podrían no solo explicar la alteración de rutas metabólicas específicas si no también cuales de estas rutas son utilizadas durante la generación de la agalla.

La reorganización en el centro de mando de la célula el núcleo, indica el control que ejerce *A. michoacaensis* sobre la base de la maquinaria propia de la planta su DNA, esto evidenciado por la sobre expresión de las categorías clasificadas en Actividad Nuclear Tabla 3.

Las vacuolas de las células vegetales son organelos multifuncionales fundamentales para las estrategias de desarrollo de la planta. Comparten algunas de sus propiedades básicas con las vacuolas de las algas y levaduras, así como con los lisosomas de las células animales. La mayoría de las células maduras de

los tejidos vegetativos de las plantas tienen una gran vacuola central que ocupa más del 90% de su volumen celular que tiene un impacto significativo en la fisiología del organismo (Marty, 1999). La vacuola tiene numerosas funciones; reservorios de iones y metabolitos incluyendo pigmentos, mantenimiento de la presión de turgencia, la homeostasis protoplasmática, secuestro de xenobióticos y digestión de constituyentes citoplasmáticos. Las vacuolas están involucradas en la respuesta celular a factores bióticos y ambientales que producen estrés (Hatsugai y Hara-Nishimura, 2010).

En los órganos vegetativos de las plantas las vacuolas actúan en combinación con la pared celular para generar turgencia, conducen la fuerza para la rigidez hidráulica y el crecimiento. En semillas y tejidos especializados de almacenamiento sirven como sitios para el almacenamiento de proteínas de reserva y carbohidratos solubles. De esta manera, las vacuolas tienen funciones físicas y metabólicas que son esenciales para la vida vegetal (Marty, 1999).

La gran vacuola central en las células cercanas la cámara larval observada en la agalla inducida por *A. michoacaensis*, podríamos presumir su función como almacenamiento de proteínas de reserva y carbohidratos solubles necesarios para la alimentación de la larva dada la cercanía de estas células a la larva de *Amphibolips michoacaensis*.

Adicionalmente a estas funciones, la vacuola se encuentra involucrada en la defensa de las plantas contra patógenos y herbívoros. Las plantas carecen de células inmunes, cada célula tienen que defenderse ella misma contra los patógenos que las atacan. Las células vegetales contienen una gran vacuola central en que acumulan una gran variedad de enzimas hidrolíticas y compuestos antimicrobiales lo que indica que las vacuolas juegan un papel importante en la defensa de las plantas estrés (Hatsugai y Hara-Nishimura, 2010).

En plantas saludables algunas fitoanticipinas como los glucósidos cianogénicos y los glucosinolatos son comúnmente almacenadas en la vacuola

como precursores inactivos, fácilmente convertidos por enzimas, en antibióticos biológicos activos en respuesta a infección por patógenos o daño por herbívoros (Hatsugai y Hara-Nishimura, 2010).

El sistema de defensa de las plantas contra patógenos consta de múltiples capas. La primera línea de defensa involucra defensas físicas como la cutícula y la pared celular y constitutivamente producen compuestos antimicrobianos fitoanticipinas (las fitoanticipinas son sintetizadas por la planta a una tasa constante por lo que siempre están presentes en sus tejidos a diferencia de las fitoalexinas que solo son producidas en respuesta a un estímulo como la invasión de un patógeno), las cuales proveen una resistencia contra el ataque de un amplio rango de patógenos. (Hatsugai y Hara-Nishimura I, 2010)

Este sistema de defensa es evidente en las agallas inducidas por *Amphibolips michoacaensis* ya que las células externas de la agalla se lignifican acuerdo con el crecimiento de la agalla. Se puede observar cómo estas células externas tienen engrosadas su pared celular. Algunos patógenos burlan estas barreras o compuestos e intentan colonizar el tejido. Una segunda línea de defensa se encuentra dado por la producción de metabolitos secundario que inhiben la proliferación y propagación del patógeno, categorías sobre expresadas desde fases tempranas hasta fases tardías de crecimiento de la agalla inducida por *A. michoacaensis*.

En el caso de las agallas producidas por *A. michoacaensis* las vacuolas parecen más estar teniendo funciones físicas (mantenimiento de la turgencia) y de almacenamiento de proteínas y carbohidratos, sin embargo la gran vacuola central que presentan las células cercanas a la larva podrían tener también función de defensa, la primera línea de defensa de la agalla esta en las células externas las cuales poseen paredes engrosadas y lignificación, si algún patógeno ó parasito evade esta primera línea, e intenta llegar a la larva para parasitarla, se encontraría antes con las células que rodean a esta y estas células desencadenarían una segunda línea de defensa antibióticos almacenado como precursores inactivos en sus vacuolas.

Las respuestas celulares a las señales externas requieren de un control coordinado de proteínas quinasas y fosfatasas. Las quinasas son un grupo de enzimas que catalizan el intercambio de grupos fosfato entre compuestos fosforilados ricos en energía y otros substratos. La actividad de numerosas enzimas es controlada por este tipo de modificación covalente basada en la adición de fosfatos. Algunas enzimas aumentan su actividad cuando son fosforiladas, mientras que en otras la actividad disminuye. Lo opuesto es válido también, la desfosforilación ó substracción de fosfatos, algunas enzimas aumentan su actividad cuando son desfosforiladas mientras que en otras la actividad disminuye.

Las proteínas quinasas (enzimas que fosforilan proteínas) y las proteínas fosfatasas (enzimas que liberan fosfatos de las proteínas), son responsables del mantenimiento del equilibrio necesario en numerosos procesos metabólicos. La fosforilación de proteínas es un proceso reversible y una estrategia fundamental que utilizan las células eucariontas para regular sus funciones básicas. Las proteínas quinasas y fosfatasas son importantes posterior a la traducción de los reguladores de numerosos procesos celulares. Estas enzimas regulan las vías metabólicas y están íntimamente involucradas en redes de señalización celular. Proteínas quinasas y fosfatasas son componentes comunes de las vías de transducción de señales en todos los eucariotas y se han adaptado en las distintas especies a los diferentes estímulos para dar respuestas fisiológicas específicas (Turck *et al.*, 2004), además juegan un papel importante en la percepción y transducción de señales medio ambientales y de desarrollo.

En los animales, levaduras y plantas las quinasas son proteínas clave en estos procesos (Mizoguchi *et al.*, 1995). En estadios tempranos e intermedio de crecimiento de la agalla inducida por *A. michoacaensis* se observa la sobre expresión de Actividad Kinasa lo que indica una fina regulación y control por parte de la larva durante el desarrollo y crecimiento de la agalla.

Las categorías sobre expresadas asociadas al catabolismo y autofagia en fases tardías de crecimiento de la agalla inducida *A. michoacaensis* reflejan el “vaciado celular que observan en estas fases (Hernández-Soto *et al.*, 2015). La larva *A. michoacaensis* consume hasta el último componente celular presente en todas las células que conforman la agalla, proceso que al parecer también se encuentra bajo regulación dada la sobre expresión de Autofagia en estadios tardíos de crecimiento.

## LITERATURA CITADA

- Abrahamson W.G., Melika G. Scrafford and Csoka G. 1998. Gall-inducing insects provide insights into plant systemic relationships. *American Journal of Botany* 85: 1159-1165.
- Anento J.L. and Selfa J. 1997. CATALOGUS 16: Insecta, Hymenoptera: Catálogo preliminar de la familia Ichneumonidae (Insecta, Hymenoptera) *Catalogus SEA* 16:9-13
- Abrahamson W.G., Melika G. Scrafford and Csoka G. 1998. Gall-inducing insects provide insights into plant systemic relationships. *American Journal of Botany* 85: 1159-1165.
- Ashmead W.H. 1903a. Classification of the gall-wasp and the parasitic cynipoids. Or the superfamily Cynipoidea. I. *Psyche* (Cambridge, Mass.) 10: 7-13.
- Ashmead W.H. 1903b. Classification of the gall-wasp and the parasitic cynipoids. Or the superfamily Cynipoidea. II. *Psyche* (Cambridge, Mass.) 10: 59-73.
- Ashmead W.H. 1903c. Classification of the gall-wasp and the parasitic cynipoids. Or the superfamily Cynipoidea. III. *Psyche* (Cambridge, Mass.) 10: 140-155.
- Ashmead W.H. 1903d. Classification of the gall-wasp and the parasitic cynipoids. Or the superfamily Cynipoidea. I. *Psyche* (Cambridge, Mass.) 10: 210-215.
- Askaew R.R. 1984. The biology of gall Wasp. En *Biology of gall Insects*. Ananthkrishnan T.N. (Ed.) Oxford and IBH, New Delhi, India 223:271
- Askaew R.R. y Shaw M.R. 1986. Parasitoids communities: their size, structure and development. *Insects parasitoids*. Waage J. and Greathead D. (Eds.) Academic Press. London 225-264.

- Bártová E., Krejčí J., Harničarová A., Galiová G. and Kozubek S. 2008. Histone Modifications and Nuclear Architecture: A Review. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 56: 711-721.
- Becker A., Alix K. and Damerval C. 2011. The evolution of flower development: current understanding and future challenges. *Annals of Botany* 107: 1427-1431.
- Bloch R. 1965. Abnormal development in plants: A survey. *Handb. Pflanzenphysiol* 15: 156-183
- Boggs J. and Chatfield. 2015. Insect and Mite Galls: Myths and Misconceptions. *American Nurseryman*. 22-27.
- Bronner R. 1992. The role of nutritive cells in the nutrition of Cynipids and Cecidomyiids. In Shorthouse J.D. and Rohfritsch O (Eds.) *Biology of Insectinduced galls*. Oxford: Oxford University Press. 118-140.
- Carneiro R.G. and Isaias R.M. 2015. Gradients of metabolite accumulation and redifferentiation of nutritive cells associated with vascular tissues in galls induced by sucking insects. *AoB PLANTS* 7: 1-16
- Cones A. and Götz S. 2007. Blast2GO: A Comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. *International Journal of Plant Genomics*. 2008: 1-12.
- Coronell H.V. 1983. The secondary chemistry and complex morphology of galls formed by the Cynipidae (Hymenoptera): why and how? *American Midland Naturalist* 110: 225-234
- Csóka György, Graham N. Stone and George Melika. 2005. *Biology, Ecology and Evolution of Gall-inducing Cynipidae*. Science Publishers 574-642.
- Edgar B.A. 2006. How flies get its size: genetics meets physiology. *Nat Rev Genet*, 12: 907-916.
- Fagan M.M. 1918. The uses of insects galls. *The American Naturalist* 614:155-176
- Fehér A. and Magyar. 2015. Coordination of cell division and differentiation in plants in comparison to animals. *Acta Biologica Szegediensis* 59: 275-289.

- Felt E.P. 1917. New gall midges. J.N.Y. Entomol. Soc. 25: 193-196
- Felt E.P. 1940. Plant Galls and Galls Markers. Comstock Itacha, London and New York  
354 pp.
- Fengel D. y G. Wegener. 1984. Wood chemistry, ultrastructure, reactions. Walter de Gruyter. Berlin, Alemania. p : 28-65.
- Ferguson N.D.M. y Hanson P.E. 1995. The cynipoid families. Cynipidae. The Hymenoptera of Costa Rica. Hanson P.E. y Gauld I.D. (Eds.). Oxford University Press. Oxford. New York and Tokio : 253-256.
- Fernandes G.W.A. y Martins R.P. 1985. Tumores de plantas As galhas. CIÊNCIA HOJE. 19 :58-64.
- Garrigues R. 1951. Recherches sur les cécides, le cancer et l'action des carbures cancérigènes sur les végétaux. Thésé, Doctorat es Sciences, Lyon, France.
- Gauld I. and Bolton B. (Eds). 1988. The Hymenoptera. Oxford University Press,  
Oxford 332 pp
- Hatsugai N. y Hara-Nishimura I. 2010. Two vacuole-mediated defense strategies in plants. Plant Signaling and Behavior 5:12 1568-1570.
- Hernandez-Soto P., Lara-Flores M., Agredano-Moreno L., Jiménez-García L.F., Cuevas-Reyes P. and Oyama K. 2015. Developmental morphology of bud galls induce don the vegetative meristems of *Quercus castanea* by *Amphibolips michoacensis* (Hymenoptera: Cynipidae). Botanical Sciences 93: 685-693
- Honorato-Salazar J. Armando y Hernández-Pérez Jorge.1998. Determinación de componentes químicos de la madera de cinco especies de encino del estado de Puebla. *Madera y Bosque* 4(2) 79-93.
- Jastrzebski K., Hannan K., Tchoubrieva E.B, Hannan R.D. and Pearson B.R. 2007. Coordinate regulation of ribosome biogenesis and function by the ribosomal protein S6 Kinase, a key mediator of mTOR function. Growth Factors 25 (4) 209-226



- Jauffret F. 1972. Transformations ultrastructurales du méristème apical du *Taxus baccata* L. en tissu nourricier sous l'action de *Taxomyia taxi* Inch. C.R. Acad. Sci. 74 : 226-229
- Jauffret F. 1973. Etude ultrastructurales de la transformation du méristème apical de l'*Euphorbia cyparissiae* L. en tissu nourricier sous l'action du *Bayeria capitigena* (Bre.) C.R. Acad. Sci. 276 : 1177-1180.
- Kalve S., De Vos D. and Beemster G.T.S. 2014. Leaf development : a cellular perspective. *Frontiers in Plant Science* 5 : 1-25.
- Kinsey, A.C. 1937. Order Hymenoptera, Family Cynipidae. En: insects and Archnids from Canadian Amber. Carpenter F.M., Folsom J.W., Essig, E.O., Kinsey A.C., Brues C.T., Boesel M.W. and Ewing H.E. (Eds.) University of Toronto Studies, Geological Series 40. University of Toronto Press. Toronto 21-27
- Küster E. 1911. Die Gallen der Pflanzen. Ein Lehrbuch der Botaniker und Entomologen. Leipzig pp 437.
- LaSalle J. and Gauld I.D. 1992. Parasitic Hymenoptera and the biodiversity crisis. *Redia* 74: 315-334
- Labandeira C.C. and Phillips T.L. 1996. A carboniferous insect gall: insight into early history of the Holometabola. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (16) 84708474
- Liljeblad J., Ronquist F., Nieves-Aldrey J.L., Fontal-Cazalla F., Ros-Farre P., Gaitros D. and Pujade-Villar J. 2008. A fully web-illustrated morphological phylogenetic study of relationship among oak gall wasp and their closest relatives (Hymenoptera: Cynipidae). *Zootaxa* 1796 : 1-73
- Lacaze-Duthiers H. 1983. Recherches pour servir á l'histoire des galles. *Ann. Sci. Bot. Ser. III.* 19: 273-354
- Liljeblad J. y Ronquist F. 1998. A phylogenetic analysis of higher-level gall wasp relationships (Hymenoptera: Cynipidae). *Systematics Entomology* 23: 229252

- Maldonado-López Y., Cuevas-Reyes P. and Oyama K. 2015. Diversity of gall wasp (Hymenoptera: Cynipidae) associated with oak trees (Fagaceae: *Quercus*) in fragmented landscape in Mexico. *Arthropod Plant Interactions* 10: 1
- Mani M.S. 1964. *Ecology of Plant Galls*. Junk Publishers, The Hague 434 pp.
- Maresquelle H.J. 1980 La morphogenèse dans l'impasse ? Reflexions d'un cécidologue. *Soc. Bot. Fr. Actual Bot.* 127 : 9-16
- Marty F. 1999. Plant Vacuoles. *The Plant Cell*. Vol 11 587-599
- Meyer J. 1948. Observations sur les premiers effets cytologiques de la cécidogenèse chez deux cécidomydes. *Rev. Gén. Bot.* 55 :256-290.
- Meyer J. 1973. Evolution cytologique ultrastructurale des cellules nourricières de la galle du *Diastrophus rubi*. *Htg. Sur le Rubus caesuis L.C.R. Acad. Sci.* 276 : 387-389.
- Meyer J. 1987. *Plant galls and galls inducers*. Ger Gerbrüder Borntraeger Berlin Mizoguchi T., Hayashida N., Yamaguchi-Shinozaki K., Kamada H. and Shinozaki K. 1995. Two genes that encode ribosomal protein S6 kinase are induced by cold or salinity stress in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 358 : 199-204.
- Molliard M. 1897. Hypertrophie pathologique des cellules végétale. *Rev. Gen. Bot.* 9: 35-39.
- Montanaro L., Treré D. and Derenzini M. 2008. Nucleus, Ribosomes and Cancer. *The American Journal of Pathology* 173: 301-309.
- Neufeld T.P. and Edgar B.A. 1998. Connections between growth and the cell cycle. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 6: 784-790
- Nieves-Aldrey J.L. and Fontal-Cazalla F. 1999. Fología y Evolución del Orden Hymenoptera En: Melic. A. (Ed.) *Evolución y Filogenia de Artropoda Vol. Monográfico de la SEA* 26: 459-474.

Pettersen, R. C. 1984. The chemical composition of wood. *In*: Rowell, R. M. (Ed.).

The chemistry of solid wood. American Chemical Society. Washington. p: 57126

Polymenis M. and Schmidt E.V. 1999. Coordination of cell growth with cell division. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1: 76-80.

Raghavan V. 2000. *Developmental Biology of Flowering Plants*. Springer Science Business Media, New York p 323-337.

Rey L. 1976. Recherches comparées sur trois types d'hyménoptéroécidies (Cynipidae et Tenthredinidae). Etude morphologique, histologique, et ultrastructurale de développement et de la différenciation. Essais expérimentaux, Thèse Doctorat es Sciences, Nantes Francia.

Rey L. 1979. Observations ultrastructurales sur le tissu nourricier de la galle provoquée par *Andricus albopunctatus* Sch. Sur *Quercus pedunculata*. Ehrh. *Bull. Soc. Fr.* 126: 179-190

Ritchie A.J. 1993. Cynipoidea. *Hymenoptera of the world: an identification guide to families*. Goulet H. y Huber J.T. (Eds.). Agriculture Canada. Ottawa : 521-536.

Rohfritsch O. 1971a. Développement cécidien et rôle parasite dans quelques galles d'arthropodes. *Marcellia* 37 : 233-339

Rohfritsch O. 1971b. Infrastructure des cellules du tissu nourricier de la galle de *Geocrypta galii* Lw. Sur *Galium mollugo* L. *C.R. Acad. Sci.* 272 : 76-78.

Rohfritsch O. 1974. Infrastructure du tissu nourricier de la galle de *Aulax glechomae* L. sur *Glechoma hederacea* L. *Protoplasma* 81 : 205-230.

Rohfritsch O. 1992. Patterns in gall development. *Biology of insect-induced galls*. Shorthouse J.D. y Rohfritsch O. (Eds.) Oxford University Press. New York: 60-86.

Ronquist F. 1995b. Phylogeny and early evolution of the Cynipoidea (Hymenoptera) *Systematic Entomology* 20: 309-335

Ronquist F. y Liljeblad J. 2001. Evolution of the Gall Wasp-Host Plant Association. *Evolution* 55 (12) 2503-2522.

- Ronquist F., Rasnitsyn A.P, Roy A., Eriksson K and Lindgren M. 1999. Phylogeny of the Hymenoptera: a cladistic of Rasnitsyn's data. *Zoological Scripta* 28: 1350.
- Roskam J.C. 1992. Evolution of the Gall-Inducing Guild. In: *Biology of insects induced galls*. Shorthouse J.D. and Rohfritsch O. (Eds.) Oxford University Press New York 35-48
- Sánchez A.A. and Yamanaka S. 2014. Rethinking: Stem cell, Regeneration and Plasticity. *Cell* 157:110-119
- Schönrogge K., Harper L.J, y Lichtenstein C.P. 2000. The protein content of tissues in cynipid galls (Hymenoptera: Cynipidae): Similarities between cynipid galls and seeds. *Plant Cell and Environment* 23: 215-222.
- Shorthouse J.D. 1980 Modifications of galls of *Diplolepis polita* by inquiline *Periclistus pirata* Colloque international de Cécidologie et de Morphogenèse pathologique, Strasbourg Soc. Bot. Fr. (Actual Bot.) 127: 79-84
- Shorthouse J.D. and Rohfritsch O. 1992. *Biology of insect-induced galls*. New York Oxford University Press
- Stam J.M., Kroes A., Li Y., Gols R., Loon J. A., Poelman E.H. and Dicke M. 2014. Plant interactions with multiple insect herbivores: from community to genes. *Annual Reviews of Plant Biology*. 65: 689-713.
- Stern D. L. 1995. Phylogenetic Evidence that Aphids, rather than Plants, Determine Gall Morphology. *Proc. R. Soc. Lond.* 260:85
- Stone G.N. and Schönrogge K. 2003. The adaptive significance of insect gall morphology. *Trends Ecol. Evol.* 18: 512-522.
- Stone G. N., Schönrogge Karsten, Atkinson Rachel J., Bellido David y Pujade-Villar Juli 2002. The population biology of oak gall Wasps (Hymenoptera: Cynipidae). *Annu. Rev. Entomol.* 47:633–68
- Turck, F., Zibermann F., Kosma S.C., Thomas G. and Nagy F. 2004. Phytohormones participate in an S6 kinase signal transduction pathway in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 134: 1527-1535.

Woll E. 1954a. Beiträge zum Differenzierungsproblem an Hand der Zytologie von Pfaanzengallen. Z. Bot. 42: 1-29.

Woll E. 1954b. Untersuchungen über die cytologische Differenzierung einiger Pfaanzengallen. Planta 43:477-494

Valencia-A. Susana 2004. Diversidad del género *Quercus* (Fagacea) en México.  
Boletín de la Sociedad Botánica de México 75: 33-53.

## ANEXO

# Ecological genomics of insect-plant interactions:

## The case of wasp-induced galls

Paulina Hernández Soto, Eunice Kariñho Betancourt, Hernando Rodríguez Correa, Nancy Calderón  
Cortés, Pablo Cuevas Reyes and Ken Oyama Nakagawa

### Contents

1	Introduction.....	2
2	Host-parasite interaction.....	3
2.1	Host response to galling insects.....	5
2.2	Gall maker insects and the Cynipidae family.....	6
3	Ecological genomics and the study of biotic interactions.....	7
3.1	Empirical evidence of functional genomics approach for the study of plant responses to natural enemies .....	9
4	Ecological genomics of <i>Quercus castanea</i> galls induced by <i>Amphibolips michoacaensis</i> .....	11
4.1	Methodological approach for the study of gall development.....	12
4.1.1	Sequencing and assembly of <i>Quercus castanea</i> transcriptome.....	13
4.1.2	Differential expression analysis of RNA-seq.....	13
4.1.3	Functional annotation.....	14
4.2	Differential expression of genes during gall development.....	15
4.2.1	Functional annotation of overexpressed transcripts.....	15
4.2.2	Functional annotation of repressed transcripts.....	16
5	Conclusions and further directions.....	17
	References.....	20

## 1 Introduction

The interaction of plants and animals is one of the largest and most complex interaction among organisms. From microorganism to vertebrates, all kind of animals feed exclusively on plant tissues. Despite immense diversification in plant-animal interactions over the past 450 million years (Scott et al. 1992; Labandeira 1998; Price 2002; Iannuzzi and Labandeira 2008), specialized associations, in particular those of plants with insects lingers (KariñhoBetancourt 2018). Consumer-resource interactions are central for the study of ecological dynamics and include a variety of specialized types of biological interactions such as prey-predator, plant-herbivore, host-parasite and victim-exploiter systems. Antagonistic interactions, in particular, the association of plants with natural enemies (e.g. herbivores, parasites), have been a rich field for the study of gene and genome functioning (e.g. Staskawicz et al. 1995; Smith and Boyko 2007; War et al. 2012). In recent years, molecular techniques of DNA sequencing and amplification (e.g. polymerase chain reaction, PCR) to predict the function of genes in their sequence or their interactions with other genes, have contributed to illuminate the ecological conditions, evolutionary histories and genetic architecture of biotic interactions resulting in adaptive evolution. For instance, the study of gen and genome duplications in the context of plant-herbivore interactions, has been crucial for the understanding of plant-insect codiversification patterns (e.g. Wheat et al. 2007).

The main goal of ecological genomics studies is to understand the genetic mechanisms underlying responses of organisms to their natural environments (Ungerer et al. 2008). This is being achieved by the interdisciplinary approach of applied ecology and functional genomics to identify and characterize genes with ecological and evolutionary

relevance. In this chapter, we consider the significance of this new area of study, from both an ecological and genomic perspective, using the parasite-plant interaction as a model to study ecological dynamics of biotic interactions. On the basis of functional analysis of gene expression, we examine the specialized association of gall-inducing insect-host plant. In particular, we discuss the induce response of *Quercus castanea* to infection by *Amphibolips michoacaensis* during gall development, focusing on patterns of differential expression of genes related to plant development and defense against natural enemies. Also, we discuss the methodological and analytic approaches for the study of gene expression in response to gall induction. Our focus here is not, however, to detail many new and powerful genetic and genomic techniques currently available to evolutionary and ecological functional genomics, but to review the methods for particular analysis of gene expression in the context of the specialized interaction between plants and parasites. We finally drawn approaches that are likely to be useful in the study of biological interactions and offer thoughts on where the field of ecological genomic is headed in the future.

## **2 Host-parasite interaction**

Parasitism is a long-term, highly specialized interaction between host and parasitic species (Combes 2001). Parasitic species of plants can drastically alter the attributes of their host by the induction of galls, which are considered abnormal structures of plant tissues and cells, developed by the specific reaction to the presence of an inducing organism (Meyer 1987; Shorthouse and Rohfritsch 1992). Fossil records of galls in petioles of arboreal ferns dating from the Upper Carboniferous, 300 million years ago, are the earliest evidence of the specific



an complex associations between plants and galling organisms (Phillips and Labandeira 1996). Since then, host plants and gall-inducing parasites have coevolved and jointly radiated (Ronquist and Liljeblad 2001). Currently, galls are highly diverse (Figure 1) and occur in almost all the major classes of plants, 95% of which are induced in angiosperms, especially in dicots (Nieves, 1999).

Based on their structure, galls can be classified as primitive and complex (Küster 1911). Primitive galls (i.e. cataplastic) are induced by thrips and homopterous, characterized by a low tissue differentiation and the lack of a constant external form. Complex galls (i.e. protoplasmic) are induced by dipterans and cynipids. These galls have clear tissue differentiation within well-defined areas and definite shape and size. Gallinducing insects are recognized as the most complex inducers of abnormal plant growth. Such insects are macroparasites well known for their ability to alter the morphology, physiology and metabolism of the host plant (Begon et al. 2006; Schowalter 2016). Depending the developmental phase, these induced changes include for example, the increase in lipid and sugar concentration within the gall chamber (Brooner 1992), and variation in the concentration of secondary metabolites (e.g. Nyman and Julkunen-Tiitto 2000; Tooker et al. 2008). Galls induced by insects, usually support certain communities composed of the larvae of the inducing insect, and non-inducing insects' larvae that live at the expense of the already formed gall (Shorthouse 1982; Evans 1995; Garries et al. 1996), fungus and ants (Stone et al. 2002), among others. Hence, galls are extremely rich microhabitats, and the core of diverse interspecific interactions, that benefits more than one species.

## 2.1 Host response to galling insects

The gall development starts with the insect laying eggs in the meristematic tissue of the host plant (Bronner 1973; Rey 1992). When gall is induced, significant changes in cell metabolism and differentiation occur (Figure 2), especially in cells surrounding the larval chamber (Bronner 1992; Rey 1992; Brooks and Shorthouse 1997). Gall developmental phases include: initiation, growth and maturation. The initiation phase starts with the wasp laying eggs in the host-plant tissue (Box 1), leading to cell necrosis around the hatched eggs, and proliferation of adjacent cell layers. During growth phase, cells surrounding the larvae increase in size and number, which leads to a significant size increase of gall. Maturation phase is characterized by a decrease in cell division, and lignification of gall tissue as larvae matures (Stone et al. 2002; Csóka et al. 2005). Changes in the chemical composition within galls along plants' development and differences in the concentration of secondary compounds of gall vs. non-galled tissue are common during the parasite development. For instance, Hartley (1998) analyzed the chemical composition of galled and non-galled leaf tissue in 20 species of gall-former on 11 different plant species. She found significant differences between galled and non-galled tissue in levels of secondary compounds. Gall tissue generally contained higher levels of phenolic compounds than nongalled plant tissue. Also, the gall tissue produced by the same plant in response to different species of gall former, differed in chemical composition as did the gall-tissue from young and mature galls of the same species. Such chemical changes suggest that the biosynthetic machinery of phytochemicals could be somehow regulated by the galling insects (Cornell 1983; Stone and Schönrogge 2003). Therefore, the biosynthetic, physiological and metabolic changes that come with gall induction, support the hypothesis that galling insects are the major drivers of gall growth

(Raman 2011), and actively manipulate the host plant to induce a structure that provides nutrition to their larvae and protection against adverse environmental conditions and natural enemies (Price et al. 1987; Stone and Schönrogge 2003; Hernández-Soto et al. 2015).

## **2.2 Gall-maker insects and the Cynipidae family**

Gall-inducing arthropods belong to many different taxa (Table 1). Each parasite taxon is closely related with the host (Felt 1940, Mani 1964), and most of them are tissue-specific (Shorthouse 1982). Approximately 13,000 species of insects have the ability to induce galls, distributed in seven different orders. Among the richest families of gall-inducing insect species are the family Cecidomyiidae of the order Diptera and the family Cynipidae or gall wasps that form "gall wasps" of the order Hymenoptera (Dreder-Jauffret and Shorthouse 1992). The growth and development of galls induced by gallipidae or wasps represent one of the most complex and intimate relationships between plants and insects in nature (Shorthouse and Rohfritsch 1992). The Cynipidae family is unique within the Cynipoidea superfamily, since all its representatives are specialized phytophagous, either inducing the formation of galls or just host of plants. The Cynipidae family is divided into two groups; gall-inducing insects and gall-associated insects called tenants, which can take advantage of the gall already formed by another cynipid but lacking the ability to induce "novo" galls. According to Abrahamson et al. (1998) 87% of all cynipids attack specifically certain species of *Quercus* (Fagaceae).

The cynipid (Cynipini, Hymenoptera) – oak (*Quercus* spp., Fagaceae) association is extremely specialized, and portrays a great example of coevolution by an antagonistic interaction. The Cynipidae family began to induce primitive galls in herbaceous plants.

Subsequently, a rapid evolution occurred with colonization of woody species, first rosaceous and finally fagaceous, where the greatest adaptive radiation and speciation of the group occurred (Ronquist and Liljeblad 2001). The close association and joint diversification of cynipids and oaks, has been attributed to particular factors such as the chemical composition of the host plants. It has been suggested that oaks may represented an herbivore-freed space due to the high content of tannins (Roskam 1992). Other factors involved in this great adaptive radiation are the specificity, the partition of spatio-temporal niches and the selective pressure of the parasitoids that have favored complex gall morphologies (Cornell 1983, Askew 1984). The major codiversification of oaks and cynipids, constitute, along with the Agaonidae in *Ficus* spp., the major speciation event of phytophagous insects in a single genus of plants (Ronquist and Liljeblad 2001).

### **3 Ecological genomics and the study of biotic interactions**

When considering the interaction of organisms with their biotic and abiotic environment, we would like to identify the genes and gene functions that matter most in a given ecological interaction (Ungerer et al. 2008). In order to identify candidate genes or genome regions implicated in ecologically important traits of non-model plants, different approaches can be follow (Table 2). Population genomics, molecular population genetics and field experiments in natural populations, are techniques that contribute to identify variation in genotypes/phenotypes and determine their significance in ecological and evolutionary process. In order to identify common genotypic variation among individuals, genome-wide association (GWAS) is usually performed. For the search of candidate genes, quantitative

trait locus (QTL) mapping, reverse genetics and expression profile techniques, can be implemented (Anderson and Mitchell-Olds 2011; Song and Mitchell-Olds 2011). Methods using high throughput sequencing to explore gene function, includes expression techniques such as microarray technology and transcriptome profiling. These techniques usually represent a “first pass” at identify potentially ecological important loci and must be followed up by additional experiments.

Having identified a new sequence, the comparison with sequence databases (e.g. expressed sequence tag; ESTs databases, Bouchez and Höfte 1998) is the simplest way to obtain (essentially biochemical) functional information. However, gene “function” can be visualized in different ways depending on the process in which it is involved: (1) biochemical function (e.g. protein lyase), (2) cellular function (e.g. a role in a signal transduction path), (3) developmental function (e.g. role in patter on differentiation, or (4) adaptive function (when the gene product contributes to the fitness of the organism). Such biological functions can be address in more detail through the expression analysis of gene product (RNA and/or protein). Nonetheless, the facility with which a high throughput approach can be used for the study of gene expression and function depends largely on the level of regulation that is being addressed (Bouchez and Höfte 1998). For instance, Roelofs et al. (2008) reviewed functional genomic studies that addressed the subcellular response of plants and soil-dwelling animals to abiotic stress factors, such as temperature, drought and salinity. They found that at the level of effector genes there is significant overlap between plants and soil animals in response to stress factors. For example, plants and invertebrate soil animals shared the gene induction of heat shock proteins (Hsp; Feder and Hofmann 1999) in response to heat stress. However, at the gene regulatory level, transcription factors related to stress shown highly dissimilar patterns (Roelofs et al. 2008). The above shows that, the data obtained from functional

genomic approaches is important for our understanding of how organisms interpret signals to enact developmental programs or respond to stimuli (Drapek et al. 2017), and ultimately for comprehend the mechanistic bases of organisms' interactions.

### **3.1 Empirical evidence of functional genomics approach for the study of plant responses to natural enemies**

Induced responses of plants to insect attack implicate hundreds, up to several thousand of differentially expressed and regulated genes. These responses involve (1) phytohormone-mediated signal transduction (Zheng and Dicke 2008), (2) specific proteins that trigger defensive/immune reactions (e.g. Zipfel 2008) and (3) transcription factors regulating defense-associated proteins/genes (Eulgem et al. 2000; Eulgem 2005).

Three major signal transduction paths are responsible for induced responses of plants to natural enemies. The shikimic acid pathway, the ethylene (ET) pathway and the jasmonate pathway, characterized by the phytohormones salicylic acid (SA), the ET and the jasmonic acid or jasmonate (JA), respectively (Dicke and Van Poecke 2002; Traw and Bergelson 2003; Heil et al. 2004; Howe 2004). Of these phytohormones, JA seems to play a key role in plant-insect interactions. For instance, transcriptomic studies have shown that biosynthesis of alkaloids (toxic nitrogen-based compounds characteristic of Solanaceae, usually implicated in defense mechanism against herbivores, Wink 2003; KariñhoBetancourt et al. 2015), is jasmonate-dependent. Biondi et al. (2002) have documented a considerable increase of PMT activity (PMT; putrescine-N-methyltransferase is the enzyme catalyzing the first committed step in the tropane alkaloid pathway, Moyano et al. 2003), as well as an

increase in polyamine contents and tropane alkaloids after methyljasmonate treatment in transformed roots of *Hyoscyamus muticus* (Solanaceae). Also, empirical evidence derived from microarrays and transcription profiling studies has shown that the attack of herbivore insects directly reprograms metabolism, inducing transcriptional changes on JA-related genes. For instance, attack of *Pieris rapae* larvae (Lepidoptera: Pieridae) induces JA genes in *Arabidopsis* sp. (De Vos et al. 2006), and two cultivar varieties of white cabbage *Brassica oleracea* (Broekgaarden et al. 2007).

Specific proteins that triggers defensive/immune reactions are involved in defensive mechanisms such as pathogen recognition paths (e.g. perception of pathogen-molecular patterns; PAMP (Zipfel 2008; Dodds and Rathjen 2010), programmed cell death (hypersensitive reaction; HR), modifications of cell walls as well as the production of defensive compounds (Somssich and Hahlbrock 1998; Veronese et al. 2003; Eulgem 2005). For instance, protein expression analysis in *Arabidopsis* sp., showed that defense responses by flagellin, a protein ubiquitously present in flagella of gram-negative bacteria, is activated by the specific recognition of the peptide flg22 (most conserved domain of flagellin), in a process involving the FLS2 gene, which encodes a leucine-rich repeat serine/threonine protein kinase (Gomez-Gomez et al. 2001).

Gene expression of the *defense cascade* involves the spatio-temporal transcriptional regulation of metabolic pathways, controlled by a complex network involving many regulatory proteins known as transcription factors. Transcriptional factors are proteins that binds to specific cis-regulatory DNA sequences to control the rate of transcription of genetic information from DNA to messenger RNA. The transcriptional factors recognize the promoters of target genes and activate or repress their expression in response to developmental and/or other environmental cues (Yan et al. 2018). Major response of plants

to injury rests in the production of secondary metabolites. Biosynthesis of secondary metabolites starts from basic pathways, such as the glycolysis, and subsequently diversifies, largely depending on cell type, developmental stage and environmental cues (Patra et al. 2013). Transcription factors with defined functions in regulation of secondary metabolism were originally identified through two main routes; cloning of genes associated with mutations or screening for proteins binding to defined promoter cis-elements. One recent approach to identifying and assigning function to plant transcriptional factors is based in the sequence identification of a group of putative transcriptional factors of unknown function, and then, systematically characterize them (Davies and Schwinn 2003). Larger scale studies identifying many transcriptional factors for secondary metabolism have been conducted in model (e.g. *Arabidopsis* sp.) and non-model plant species (e.g. *Medicago truncatula*; May 2002) for the last decades. One good example is the collaborative projects across many laboratories for the identification of the *myb* genes in *Arabidopsis*. General outputs from the MYB project are already available, such as the phylogeny analysis, transcript abundance data and the generation of a gene knockout collection (Kranz et al. 1998; Meissner et al. 1999; Davies and Schwinn 2003).

#### **4 Ecological genomics of *Quercus castanea* galls induced by *Amphibolips michoacaensis***

The genus *Quercus* (Fagaceae) is native to the Northern hemisphere and includes close to 400-600 deciduous and evergreen species extending from cool temperate to tropical latitudes in America, Asia, Europe and North Africa (Valencia 2004). *Amphibolips michoacaensis* (Hymenoptera: Cynipidae), a recently described species of gall-insect (Nieves-Aldrey et al.



2012), induces galls in *Q. castanea*, a Mexican oak widely distributed throughout the country. The galls produced by *A. michoacaensis* reach up to 60 mm in diameter, and show a great ontogenetic variation in physiological and morphological attributes (e.g. coloration) (see Hernández-Soto et al. 2015). Oak trees are known for the production of phenolic compounds. When ingested, phenolic compounds such as tannins and flavonoids alter the enzymatic digestive activity of consumers, mainly insects (Feeny 1976; Rhoades and Cates 1976; Barbehenn and Constabel 2011). These secondary metabolites are present in the upper part of the foliage and the oak galls. In some *Quercus* species (e.g. *Q. robur*) tannins show a differential distribution between gall and non-galled tissues (the gall tissues have a lower nutrient concentration and higher phenol levels, than non-galled tissues, Hartley 1998).

A study carried out by Maldonado-López (2010), showed that oak species have extremely diverse galls. Host- plants that hold diverse type of galls have been called as "super-host", supporting the hypothesis that the insect regulates the gall shape, i. e. galls are the extended phenotype of parasitic insects (Stern 1995), produced by the same genetic bases. *Q. castanea* is associated with 18 different species of gall inducing insects. Currently, the precise mechanisms that induce the formation and development of hostplants galls are unknown (Redfern 2008, 2011). Hence, the genetic regulation and the induced mechanisms involved in the controlled gall growth are not yet fully understood (Raman and Dhilepan 1999, Wool et al. 1999).

#### **4.1 Methodological approach for the study of gall development**

Tissue of non-galled leaves (NG) and galled leaves of *Quercus castanea* was collected from a natural population. Gall tissue (G) was sampled during growth and mature phase of gall development. Tissue from small galls; S (7mm diameter) and medium galls; M (14-24 mm)

at the growth phase, and large galls; L (36-56 mm) at mature phase, along with nongalled tissue; NG, was liquid-nitrogen frozen and stored at -70°C. The obtaining and analysis of RNA-seq to construct *Q. Castanea* transcriptome, was carried out as follows (Figure 3).

#### **4.1.1 Sequencing and assembly of *Quercus castanea* transcriptome**

Nine libraries from RNA with inserts of + -480 pb were set for sequencing in Illumina MySeq 2x300. For checking the quality of high throughput sequence FastQC application and Trimmomatic command line, were used (cite?). The primary assembly contained multiple contigs with related sequences. To reduce redundancy, for each cluster the longest sequence was retained. All subsequent analyses were performed on the reduced data set (48,705 components). The *novo* transcriptome assembly was performed using Trinity (Trinityrnaseq 2.0.6) assembly method. To compare the *novo* assembled contig sequences, Blastx searching method was used in parallel to search for non-redundant protein sequences.

#### **4.1.2 Differential expression analysis of RNA-seq**

Differential expression of G and NG genes of *Quercus castanea* was analyzed using Bioconductor package edgeR (edgeR 3.20.9) for gene differential expression analysis. This method allows to determine whether there is evidence that counts for a transcript or exon are significantly different across experimental conditions. For achieve this, an overdispersed Poisson model is used to account for both biological and technical variability. Empirical

Bayes methods are used to moderate the degree of overdispersion across transcripts, improving the reliability of inference. The methodology can be used even with the most minimal levels of replication, provided at least one phenotype or experimental condition is replicated (Robinson et al. 2010).

### **4.1.3 Functional annotation**

For functional annotation and data mining search, Blast2GO platform was employed. Blast2GO is a bioinformatics platform for high-quality functional annotation and analysis of genomic datasets. Blast2GO suite is an integrated and biologist-oriented tool for the high-throughput and automatic functional annotation of DNA or protein sequences based on the Gene Ontology vocabulary. Its main function is to assign information about the biological function of gene or protein sequences by making use of diverse public resources like comparison algorithms and databases. The software identifies already characterized similar sequences, and transfers its functional labels to the uncharacterized sequences (Götz et al. 2008; Vieler et al. 2012). Hence, functional categories were assigned to all predicted genes of *Quercus castanea* transcriptome. Transcripts were then grouped in more than 70 functional categories based on GO biological processes. Differential expression of functional categories of gall-specific transcripts was assessed using enrichment tests based on the Fisher's "false discovery rate" or FDR, to both expressed and repressed groups of transcripts.

## 4.2 Differential expression of genes during gall development

*De novo* assembly of G and NG of *Quercus castanea* results in 48,705 contigs (longest sequence of each cluster), with a protein prediction of 48.8% without hit in the database from a 51.2% with hit in the nr database, of which, 28.66% were associated to a GO term. Transcriptome assembly of G at different development phases showed three principal components: the tree, insect and bacteria (Figure 4). Gene expression analysis of G vs. NG showed 11, 816 transcripts differentially expressed (Figure 5).

### 4.2.1 Functional annotation of overexpressed transcripts

Functional categories of overexpressed genes of G vs. NG, include those associated to cell division such as mitotic cytokinetic process, developmental cell growth, cell wall biogenesis, embryo development that ends dormancy, DNA replication, hormone-mediated signaling pathway and DNA repair, among others. Also, categories associated with the preparation of the cell for its division such as pyrimidine nucleotide biosynthetic process, cellulose metabolic process and transport of auxins, were overexpressed (Figure 6). Since early phases of gall development are characterized by hypertrophy and hyperplasia reactions (Stone et al. 2002), genes associated to cell division are expected to be overexpressed as in the case of *Q. castanea* galls.

When comparing mature (L) vs. growing (MS) developmental phases, gene expression of functional categories associated to transmembrane transport of amino acids,

ions and carbohydrates, showed an overexpression pattern (Figure 7). A previous morphoanatomical study in *Q. castanea* galls induced by *A. michoacaensis*, showed an accumulation of amyloplasts (i.e. non-pigmented organelles found in some plant cells, responsible for the synthesis and storage of starch granules, through the polymerization of glucose, (Wise 2007), which suggests an active synthesis of ribosomes and an increase in protein synthesis, across gall development (Hernández-Soto et al. 2015). Larvae consumption of amyloplasts from outside to inside of cell walls, especially during mature phase, is associated with cell functions related to transmembrane transport (amino acids, ions, carbohydrates, etc.), which in *Q. castanea* galls are overexpressed in mature.

Accumulation of carbohydrates within the spongy mesophyll cells of galls induced by wasps on *Q. castanea*, is consistent with metabolic changes induced by some gallinducing fungi. Galls of the “manchurian wild rice” *Zizania latifolia* (Poaceae) induced by the fungus *Ustilago esculenta*, exhibited a significant accumulation of hormones amino acids and carbohydrates with growth, in particular, during early developmental stages.

#### **4.2.2 Functional annotation of repressed transcripts**

When compared G vs. NG, several functional categories of repressed transcripts (FDR 0.5) were identified. They were associated with formation and function of chloroplast, chloroplast components, photosystem, chloroplast organization, electron transport chain of photosystem, thylakoid lumen, regulation of photosynthesis and binding to tetrapyrroles, and molecules related to defense and hormone signaling such as glucosinolates and salicylic acid (Figure 8).

A previous morpho-anatomical study in *Quercus castanea* galls induced by *Amphibolips michoacaensis* showed that only early developmental stages of galls possess chloroplasts (see Hernández-Soto et al. 2015). It is possible that in this case, chloroplasts were more active in earlier developmental phases (e.g. initiation phase), and we only capture the reduced activity that came with gall's age. Chloroplasts as many tetrapyrroles play important roles in photosynthesis and resistance to stress conditions (Zhang et al. 2015). Repression of chloroplasts and other tetrapyrroles related genes, have been implicated in induced responses by pathogens. In *Arabidopsis thaliana* repression of chloroplast genes, resulted from the shoot infection by pathogenic *Plasmodiophora brassicae* that induces the formation of root galls (Irani et al. 2018). Genes related to glucosinolates and salicylic acid, repressed in *Q. castanea* galls during gall growth, may suggest a temporal deactivation of plant defence (especially in early phases of development).

Repressed functional categories of mature (L) vs. growing (MS) developmental phases are related to regulation of cell cycle such as nuclear division, cytokinetic mitotic processes and repression of cellular differentiation, among others (Figure 9).

## **5 Conclusions and further directions**

In this chapter we have focused on parasite–plant interaction. We discussed recent functional genomics research in wasp- induced galls of *Quercus castanea*, and reviewed the methods and significance of ecological genomics approach. Transcriptomic profile of *Q. castanea* galls induced by wasp exposes the *switches* in cell cycle and secondary metabolism along gall development and demonstrates the importance of enzymes involved in phenols

biosynthesis and chlorophyll for gall growth and maintenance. Differential expression patterns shown in wasp galls, suggest phenotype manipulation by the wasp larvae and physiological constraints of host plant for enzyme channeling in different biosynthetic branches of phenolic compounds. This study is a good example of how analytic methods using high throughput sequencing to explore gene function in natural populations of non-model species, can enlighten the way in which organism interpret signals to activate developmental programs or respond to environmental stimuli. Contributing thus, to evince the mechanistic bases of organisms' interactions. Nonetheless, an important challenge in this type of studies is the fact that different cells can show different patterns of gene expression, so new technologies of third generation of massive sequencing (e.g. nova seq), as well as the development of instruments that allow the dissection of cell types (e.g. laser dissection) will make it possible in the short term to analyze gene expression at a finer level.

Natural variation provides opportunities to address fundamental ecological and evolutionary questions that cannot be fully answered by the use of model plants alone or a single analytical approach. By bringing together genomics, bioinformatics and biostatistics tools, and approaches of molecular biology, evolution and ecology, the ecological genomics field is developing rapidly. Yet, the study of adaptive mechanisms that have evolved in response to biotic stress will continue to be a challenge. Broader collaboration between ecologists, evolutionary biologists and molecular geneticists is crucial to characterize natural variation within and among species and to dissect genetic bases of adaptive traits. For achieve this, we suggest future research in non-model plants should consider classical approach of applied ecology, as both the starting and ending points of investigation, to characterize ecological important traits and confirm function of genes. Characterization of ecological traits should include experimental and field studies linked to biochemical analysis. Genomic

approaches should come after the account of phenotypic variation of putative adaptive traits. This approach may include genome-wide scan of DNA polymorphism, and candidate gene approaches (e.g. quantitative trait locus (QTL) mapping, and expression profile analysis), among other techniques. This research avenue will contribute to integrate diverse genomic/transcriptomic/proteomic data (e.g. sequence, map position, mRNA and protein expression and allelic variation) into an ecological and evolutionary framework.



## References

- Abrahamson WG, Melika G, Scrafford R, Csóka G (1998) Gall- inducing insects provide insights into plant systematic relationships. *85*:1159–1165. doi: 10.2307/2446348
- Anderson JT, Mitchell-Olds T (2011) and Approaches. *Funct Ecol* 25:312–324. doi: 10.1111/j.13652435.2010.01785.x.Ecological
- Barbehenn R V., Constabel PC (2011) Tannins in plant-herbivore interactions. *Phytochemistry* 72:1551– 1565. doi: 10.1016/j.phytochem.2011.01.040
- Begon M, Townsend CR, Harper JL (2006) *Ecology: from individuals to ecosystems*. Blackwell Publishing, Oxford, United Kingdom
- Biondi S, Scaramagli S, Oksman-Caldentey KM, Poli F (2002) Secondary metabolism in root and callus cultures of *Hyoscyamus muticus* L.: The relationship between morphological organisation and response to methyl jasmonate. *Plant Sci* 163:563–569. doi: 10.1016/S0168-9452(02)00161-9
- Bouchez D, Höfte H (1998) Functional Genomics in Plants 1. *Plant Physiol* 118:725–732. doi: 10.1104/pp.118.3.725
- Broekgaarden C, Poelman EH, Steenhuis G, et al (2007) Genotypic variation in genome-wide transcription profiles induced by insect feeding: *Brassica oleracea* - *Pieris rapae* interactions. *BMC Genomics* 8:1– 13. doi: 10.1186/1471-2164-8-239
- Bronner R (1992) The role of nutritive cells in the nutrition of cynipids and cecidomyiids. In: Shorthouse JD, Rohfritsch O (eds) *Biology of insect-induced galls*. Oxford University Press, pp 118–140
- Combes C (2001) *Parasitism: the ecology and evolution of intimate interactions*. University of Chicago Press
- Cornell H V. (1983) The Secondary Chemistry and Complex Morphology of Galls Formed by the Cynipinae (Hymenoptera): Why and How? *Am Midl Nat* 110:225–234
- Csóka G, Stone GN, Melika G (2005) Biology, Ecology and Evolution of gall-inducing Cynipidae. In: Raman A, Schaefer CW, Withers TM (eds) *Biology, ecology and evolution of gall-inducing arthropods*. Science Publishers, New Hampshire, USA, pp 569–636
- Davies KM, Schwinn KE (2003) Transcriptional regulation of secondary metabolism. *Funct Plant Biol* 30:913–925. doi: 10.1071/fp03062
- De Vos M, Denekamp M, Dicke M, et al (2006) The *Arabidopsis thaliana* transcription factor AtMYB102 functions in defense against the insect herbivore *Pieris rapae*. *Plant Signal Behav* 1:305–311. doi: 10.4161/psb.1.6.3512
- Dicke M, Van Poecke RMP (2002) Signalling in plant-insect interactions: signal transduction in direct and indirect plant defence. In: Sheel C, Wasternack C (eds) *Plant Signal Transduction*. Oxford University Press, pp 289–316
- Dodds PN, Rathjen JP (2010) Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nat Rev Genet* 11:539–548. doi: 10.1038/nrg2812
- Drapek C, Sparks EE, Benfey PN (2017) Uncovering gene regulatory networks controlling plant cell differentiation. *Trends in Genomics* 33:529–539
- Eulgem T (2005) Regulation of the *Arabidopsis* defense transcriptome. *Trends Plant Sci* 10:71–78. doi: 10.1016/j.tplants.2004.12.006

- Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, Somssich IE (2000) The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci* 5:199–206
- Feder ME, Hofmann GE (1999) Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol* 61:243–282
- Gomez-Gomez L, Bauer Z, Boller T (2001) Both the Extracellular Leucine-Rich Repeat Domain and the Kinase Activity of FLS2 Are Required for Flagellin Binding and Signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* 13:1155–1163. doi: 10.1105/tpc.13.5.1155
- Götz S, García-Gómez JM, Terol J, et al (2008) High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Res* 36:3420–3435. doi: 10.1093/nar/gkn176
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, et al (2011) Function search in a large transcription factor gene family in Arabidopsis: assessing the potential of reverse genetics to identify insertional mutations in R2R3 MYB genes. *Nat Biotechnol* 29:644
- Hartley SE (1998) The chemical composition of plant galls: Are levels of nutrients and secondary compounds controlled by the gall-former? *Oecologia* 113:492–501. doi: 10.1007/s004420050401
- Heil M, Greiner S, Meimberg H, et al (2004) Evolutionary change from induced to constitutive expression of an indirect plant resistance. *Nature* 430:205–208. doi: 10.1038/nature02703
- Hernández-Soto P, Lara-Flores M, Agredano-Moreno L, et al (2015) Developmental morphology of bud galls induced on the vegetative meristems of *Quercus castanea* by *Amphibolips michoacaensis* (Hymenoptera: Cynipidae). *Bot Sci* 93:685–693. doi: 10.17129/botsci.607
- Howe GA (2004) Jasmonates as signals in the wound response. *J Plant Growth Regul* 23:223–237. doi: 10.1007/s00344-004-0030-6
- Iannuzzi R, Labandeira CC (2008) The Oldest Record of External Foliage Feeding and the Expansion of Insect Folivory on Land. *Ann Entomol Soc Am* 101:79–94. doi: 10.1603/00138746(2008)101[79:TOROEF]2.0.CO;2
- Kariñho-Betancourt E (2018) Plant-herbivore interactions and secondary metabolites of plants: Ecological and evolutionary perspectives. *Bot Sci* 96:35–51. doi: 10.17129/botsci.1860
- Kariñho-Betancourt E, Agrawal AA, Halitschke R, Núñez-Farfán J (2015) Phylogenetic correlations among chemical and physical plant defenses change with ontogeny. *New Phytol* 206:796–806. doi: 10.1111/nph.13300
- Kranz HD, Denekamp M, Greco R, et al (1998) Towards functional characterisation of the members of the R2R3-MYB gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16:263–276. doi: 10.1046/j.1365313x.1998.00278.x
- Labandeira CC (1998) Early history of arthropod and vascular plant associations. *Annu Rev Earth Planet Sci* 26:329–377. doi: 10.1146/annurev.earth.26.1.329
- May GD (2002) An integrated approach to *Medicago* functional genomics. In: Romeo JT, Dixon RA (eds) *Phytochemistry in the genomics and post-genomics eras*. Elsevier Science Ltd, Oxford, pp 179–195
- Mayer AM, Staples RC (2002) Laccase : new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* 60:551–565
- Meissner RC, Jin HL, Cominelli E, et al (1999) Function Search in a Large Transcription Factor Gene Family in Arabidopsis: Assessing the Potential of Reverse Genetics to Identify Insertional Mutations in R2R3 MYB Genes. *Plant Cell* 11:1827–1840. doi: 10.1105/tpc.11.10.1827
- Meyer J (1987) *Plant galls and gall inducers*. Gebrüder Borntraeger, Stuttgart, Germany

- Moyano E, Jouhikainen K, Tammela P, et al (2003) Effect of pmt gene overexpression on tropane alkaloid production in transformed root cultures of *Datura metel* and *Hyoscyamus muticus*. *J Exp Bot* 54:203–211. doi: 10.1093/jxb/54.381.203
- Nieves-Aldrey JL, Pascual E, Maldonado-Lopez Y, et al (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
- Nyman T, Julkunen-Tiitto R (2000) Manipulation of the phenolic chemistry of willows by gall-inducing sawflies. *Proc Natl Acad Sci* 97:13184–13187
- Patra B, Schluttenhofer C, Wu Y, et al (2013) Transcriptional regulation of secondary metabolite biosynthesis in plants. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech* 1829:1236–1247. doi: 10.1016/j.bbagr.2013.09.006
- Price PW (2002) Species interactions and the evolution of biodiversity. In: Herrera CM, Pellmyr O (eds) *Plant-Animal Interactions: An Evolutionary Approach*. Blackwell Scientific, Oxford, pp 3–25
- Price PW, Fernandes GW, Waring GL (1987) Adaptive nature of insect galls. *Environ Entomol* 16:15–24
- Raman A (2011) Morphogenesis of insect-induced plant galls: Facts and questions. *Flora Morphol Distrib Funct Ecol Plants* 206:517–533. doi: 10.1016/j.flora.2010.08.004
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK (2010) edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26:139–140. doi: 10.1093/bioinformatics/btp616
- Roelofs D, Aarts MGM, Schat H, Van Straalen NM (2008) Functional ecological genomics to demonstrate general and specific responses to abiotic stress. *Funct Ecol* 22:8–18. doi: 10.1111/j.13652435.2007.01312.x
- Ronquist F, Liljeblad J (2001) Evolution of the gall wasp–host plant association. *Evolution (N Y)* 55:2503–2522
- Schowalter TD (2016) *Insect ecology: An Ecosystem Approach*, Fourth Edi. Academic Press, London, United Kingdom
- Scott AC, Stephenson J, Chaloner WG (1992) Interaction and coevolution of plants and arthropods during the Palaeozoic and Mesozoic. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 129–165. doi: 10.1098/rstb.1992.0016
- Shorthouse JD, Rohfritsch O (1992) *Biology of Insect-Induced Galls*. Oxford University Press
- Smith CM, Boyko E V. (2007) The molecular bases of plant resistance and defense responses to aphid feeding: Current status. *Entomol Exp Appl* 122:1–16. doi: 10.1111/j.1570-7458.2006.00503.x
- Somssich IE, Hahlbrock K (1998) Pathogen defence in plants - A paradigm of biological complexity. *Trends Plant Sci* 3:86–90. doi: 10.1016/S1360-1385(98)01199-6
- Song BH, Mitchell-Olds T (2011) Evolutionary and ecological genomics of non-model plants. *J Syst Evol* 49:17–24. doi: 10.1111/j.1759-6831.2010.00111.x
- Staskawicz BJ, Ausubel FM, Baker BJ, et al (1995) Molecular genetics of plant disease resistance. *Science (80- )* 268:661–667
- Stone GN, Schönrogge K, Atkinson RJ, et al (2002) The population biology of oak gall wasps. *Annu Rev Entomol* 47:633–668
- Stone GN, Schönrogge K (2003) The adaptive significance of insect gall morphology. *Trends Ecol Evol* 18:512–522

- Tooker JF, Rohr JR, Abrahamson WG, De Moraes CM (2008) Gall insects can avoid and alter indirect plant defenses. *New Phytol* 178:657–671. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02392.x
- Traw B, Bergelson J (2003) Interactive Effects of Jasmonic Acid, Salicylic Acid, and Gibberellin on Induction of Trichomes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 133:1367–1375. doi: 10.1104/pp.103.027086
- Ungerer MC, Johnson LC, Herman MA (2008) Ecological genomics: Understanding gene and genome function in the natural environment. *Heredity (Edinb)* 100:178–183. doi: 10.1038/sj.hdy.6800992
- Valencia S (2004) Diversidad del género *Quercus* (Fagaceae) en México. *Boletín la Soc Botánica México* 75:33–53
- Veronese P, Ruiz MT, Coca M a, et al (2003) In Defense against Pathogens . Both Plant Sentinels and Foot Soldiers Need to Know the Enemy. *Plant Physiol* 131:1580–1590. doi: 10.1104/pp.102.013417.1580
- Vieler A, Wu G, Tsai CH, et al (2012) Genome, Functional Gene Annotation, and Nuclear Transformation of the Heterokont Oleaginous Alga *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779. *PLoS Genet* 8:. doi: 10.1371/journal.pgen.1003064
- War AR, Paulraj MG, Tariq A, et al (2012) Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signal Behav* 7:1306–1320
- Weng J-K, Chapple C (2010) Tansley review The origin and evolution of lignin biosynthesis. *New Phytol* 187:273–285
- Wheat CW, Vogel H, Wittstock U, et al (2007) The genetic basis of a plant-insect coevolutionary key innovation. *Proc Natl Acad Sci* 104:20427–20431. doi: 10.1073/pnas.0706229104
- Wink M (2003) Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* 64:3–19. doi: 10.1016/S0031-9422(03)00300-5
- Wise RR (2007) The diversity of plastid form and function. In: Wise RR, Hooper JK (eds) *The structure and function of plastids*. Springer, pp 3–26
- Yan Y, Zheng X, Apaliya MT, et al (2018) Transcriptome characterization and expression profile of defenserelevant genes in pear induced by *Meyerozyma guilliermondii*. *Postharvest Biol Technol* 141:63–70. doi: 10.1016/j.postharvbio.2018.03.011
- Zheng S-J, Dicke M (2008) Ecological Genomics of Plant-Insect Interactions: From Gene to Community. *Plant Physiol* 146:812–817. doi: 10.1104/pp.107.111542
- Zipfel C (2008) Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Curr Opin Immunol* 20:10–16. doi: 10.1016/j.coi.2007.11.003

