

Biology of the sexual generation of *Loxaulus hyalinus* (Hymenoptera: Cynipidae) in *Quercus laeta* Liebm. oakgroves in Mexico City

Biología de la generación sexual de *Loxaulus hyalinus* (Hymenoptera: Cynipidae) en encinares de *Quercus laeta* Liebm. de la Ciudad de México

Uriel M. Barrera-Ruiz¹; David Cibrián-Tovar²; Celina Llanderal-Cázares^{1*}; Héctor González-Hernández¹; Esteban Rodríguez-Leyva¹; Juli Pujade-Villar³

¹Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Postgrado en Fitosanidad-Entomología y Acarología. Carretera México-Texcoco km 36.5. C. P. 56230. Texcoco, Estado de México, México.

²Universidad Autónoma Chapingo, División de Ciencias Forestales. Carretera México-Texcoco km 38.5. C. P. 56230. Texcoco, Estado de México, México.

³Universitat de Barcelona, Facultat de Biologia, Departament de Biologia Animal. Av. Diagonal 643. C. P. 08028. Barcelona, Cataluña, España.

*Corresponding author: llcelina@colpos.mx; tel.: +52 595 952 0200 ext. 1608.

Abstract

Introduction: *Loxaulus hyalinus* is a cynipid (Hymenoptera) that attacks oak groves (*Quercus laeta* Liebm.) in Mexico City. The insect's biology and damage potential are unknown.

Objectives: Describe the biology of the sexual phase of *L. hyalinus* and its effects on *Q. laeta*, and list the associated inquiline and parasitoids.

Materials and methods: To determine the period of each stage of *L. hyalinus*, galls were collected from infested twigs and periodically dissected to describe their development and the presence of inquilines and parasitoids in the period 2019- 2022.

Results and discussion: Sexual generation began in October when the first symptoms of galls development were observed on twigs, and concluded in May of the following year, when adults emerged. The presence of many galls alters the growth pattern of the tree crown. Two *Synergus* species were found as inquilines and nine genera of chalcidoid parasitoids were associated with *L. hyalinus*.

Conclusions: Sexual generation of *L. hyalinus* develops in twig galls and its only host confirmed is *Q. laeta*. This pest causes no death of its host but severely affects the shape of the crown.

Keywords: gall wasp; life cycle; cynipids; parasitoids; forest pest.

Resumen

Introducción: *Loxaulus hyalinus* es un cinípido (Hymenoptera) que ataca encinares (*Quercus laeta* Liebm.) de la Ciudad de México. La biología y el potencial de daño del insecto se desconoce.

Objetivos: Describir la biología de la fase sexual de *L. hyalinus* y sus efectos en *Q. laeta*, así como enlistar los inquilinos y parasitoides asociados.

Materiales y métodos: Para determinar el periodo de cada estado de *L. hyalinus* se recolectaron agallas de ramillas infestadas que se disecaron periódicamente, para describir su desarrollo y la presencia de inquilinos y parasitoides en el periodo 2019- 2022.

Resultados y discusión: La generación sexual inició a partir de octubre cuando se observaron los primeros síntomas del desarrollo de las agallas en ramillas, y concluyó en mayo del siguiente año, cuando los adultos emergieron. La presencia de una gran cantidad de agallas altera el patrón de crecimiento de la copa de los árboles. Se encontraron dos especies de *Synergus* como inquilinos y nueve géneros de parasitoides calcidoideos asociados a *L. hyalinus*.

Conclusiones: La generación sexual de *L. hyalinus* se desarrolla en las agallas de ramilla y su único hospedante confirmado es *Q. laeta*. Dicha plaga no ocasiona la muerte de su hospedante, pero sí afecta severamente la forma de la copa.

Palabras clave: avispa agalladora; ciclo biológico; cinípidos; parasitoides; plaga forestal.

Introduction

Loxaulus is a Nearctic genus of gall wasps that grows on *Quercus* (Melika & Abrahamson, 2000); 15 species have been reported from the USA (Melika et al., 2021), two from Panama (Medianero et al., 2011) and two from Mexico (Pujade-Villar et al., 2014).

Biology studies are indispensable to understand the relationships between phytophagous, hosts and associated species. In 13 species of *Loxaulus* only asexual generation is reported, of which 10 induce their galls on twigs (*Loxaulus atrior* [Kinsey] Dailey 1977, *Loxaulus boharti* Dailey and Sprenger 1983, *Loxaulus brunneus* [Ashmead 1896], *Loxaulus championi* Medianero y Nieves-Aldrey 2011, *Loxaulus maculipennis* [Ashmead 1896], *Loxaulus tenuis* [Weld 1952], *Loxaulus vaccini* [Ashmead] Weld 1951, *Loxaulus panamensis* Medianero & Nieves-Aldrey 2011, *L. laeta* Pujade-Villar 2014, *Loxaulus virginiana* Melika & Buss 2021), one on leaves (*Loxaulus beutenmuelleri* Weld 1957), one on roots (*Loxaulus pattersoni* [Kinsey 1922]) and one on belowground stems (*Loxaulus illinoisensis* [Weld 1921]) (Medianero et al., 2011; Melika & Abrahamson, 2000; Melika et al., 2021; Pujade-Villar et al., 2014). Sexual generation has been reported only in *Loxaulus quercusmammula* (Bassett 1881) and *Loxaulus hyalinus* Pujade-Villar and Melika 2014 (in this study) in galls induced in twigs. The females of *Loxaulus ferrugineus* (Gillette 1891), *Loxaulus huberi* Melika and Abrahamson 2000, and *Loxaulus masneri* Melika and Abrahamson 2000 are known, but the galls and to which generation they correspond are unknown (Melika & Abrahamson, 2000). Both asexual and sexual generation are known only from *Loxaulus trizonalis* Weld 1926, the first inducing galls on acorns and the latter on twigs of *Quercus chrysolepis* Liebm. 1854 (Melika & Abrahamson, 2000).

In 2014 *Loxaulus laeta* Pujade-Villar 2014 was reported on *Quercus laeta* Liebm. 1854 (section *Quercus*) in Santa Fe, Cuajimalpa, Mexico City and *L. hyalinus* on *Quercus dysophylla* Benth. 1840 (section *Lobatae*) in Huasca de Ocampo, Hidalgo (Pujade-Villar et al., 2014). Recently, the identification of the host for *L. hyalinus* was corrected to *Q. laeta* by Cuesta-Porta et al. (2022), meaning that the two species known from Mexico attack *Q. laeta*. It has been found that the *L. hyalinus* galls cause alterations in the growth of infested branches, as well as in the structure and appearance of the host crown, so this species is considered a pest in green areas of residential neighborhoods in Mexico City.

The galls of oak trees produced by phytophagous wasps are exploited by various organisms, including inquilines and parasitoids that compete for the host or attack it (Todorov et al., 2019). In galls produced by cynipids, chalcidoid parasitoids are, in general, the most important natural enemies, while species of

Introducción

Loxaulus es un género neártico de avispa agalladoras que se desarrollan en *Quercus* (Melika & Abrahamson, 2000); 15 especies han sido reportadas en EUA (Melika et al., 2021), dos en Panamá (Medianero et al., 2011) y dos en México (Pujade-Villar et al., 2014).

Los estudios de biología son indispensables para entender las relaciones entre fitófagos, sus hospedantes y especies asociadas. De 13 especies de *Loxaulus* solo se reporta la generación asexual, 10 de las cuales inducen sus agallas en ramillas (*Loxaulus atrior* [Kinsey] Dailey 1977, *Loxaulus boharti* Dailey y Sprenger 1983, *Loxaulus brunneus* [Ashmead 1896], *Loxaulus championi* Medianero y Nieves-Aldrey 2011, *Loxaulus maculipennis* [Ashmead 1896], *Loxaulus tenuis* [Weld 1952], *Loxaulus vaccini* [Ashmead] Weld 1951, *Loxaulus panamensis* Medianero & Nieves-Aldrey 2011, *L. laeta* Pujade-Villar 2014, *Loxaulus virginiana* Melika & Buss 2021), una en hojas (*Loxaulus beutenmuelleri* Weld 1957), una en raíces (*Loxaulus pattersoni* [Kinsey 1922]) y una en tallos subterráneos (*Loxaulus illinoisensis* [Weld 1921]) (Medianero et al., 2011; Melika & Abrahamson, 2000; Melika et al., 2021; Pujade-Villar et al., 2014). De *Loxaulus quercusmammula* (Bassett 1881) se reporta solo la generación sexual induciendo agallas en ramillas, al igual que de *Loxaulus hyalinus* Pujade-Villar y Melika 2014 (en este estudio) y tres especies (*Loxaulus ferrugineus* [Gillette 1891], *Loxaulus huberi* Melika y Abrahamson 2000, y *Loxaulus masneri* Melika y Abrahamson 2000) se conocen las hembras, pero se desconocen las agallas y a qué generación corresponden (Melika & Abrahamson, 2000). Solo de *Loxaulus trizonalis* Weld 1926 se conocen las generaciones asexual y sexual, la primera induciendo agallas en bellotas y la segunda en ramillas de *Quercus chrysolepis* Liebm. 1854 (Melika & Abrahamson, 2000).

En 2014 se reportó a *Loxaulus laeta* Pujade-Villar 2014 en *Quercus laeta* Liebm. 1854 (sección *Quercus*) en Santa Fe, Cuajimalpa, Ciudad de México y a *L. hyalinus* en *Quercus dysophylla* Benth. 1840 (sección *Lobatae*) en Huasca de Ocampo, Hidalgo (Pujade-Villar et al., 2014). Recientemente, para *L. hyalinus*, Cuesta-Porta et al. (2022) corrigieron la identificación del huésped como *Q. laeta*, por lo que las dos especies conocidas de México atacan a *Q. laeta*. Se ha observado que las agallas de *L. hyalinus* causan alteraciones en el crecimiento de las ramas infestadas, así como en la estructura y apariencia de la copa del hospedante, por lo que esta especie se considera plaga en áreas verdes de fraccionamientos de la Ciudad de México.

Las agallas de encinos producidas por fitófagos son explotadas por diversos organismos, entre ellos, inquilinos y parasitoides que compiten por el hospedante o lo atacan (Todorov et al., 2019). En las agallas producidas por cinípidos, los parasitoides calcidoideos son, en general,

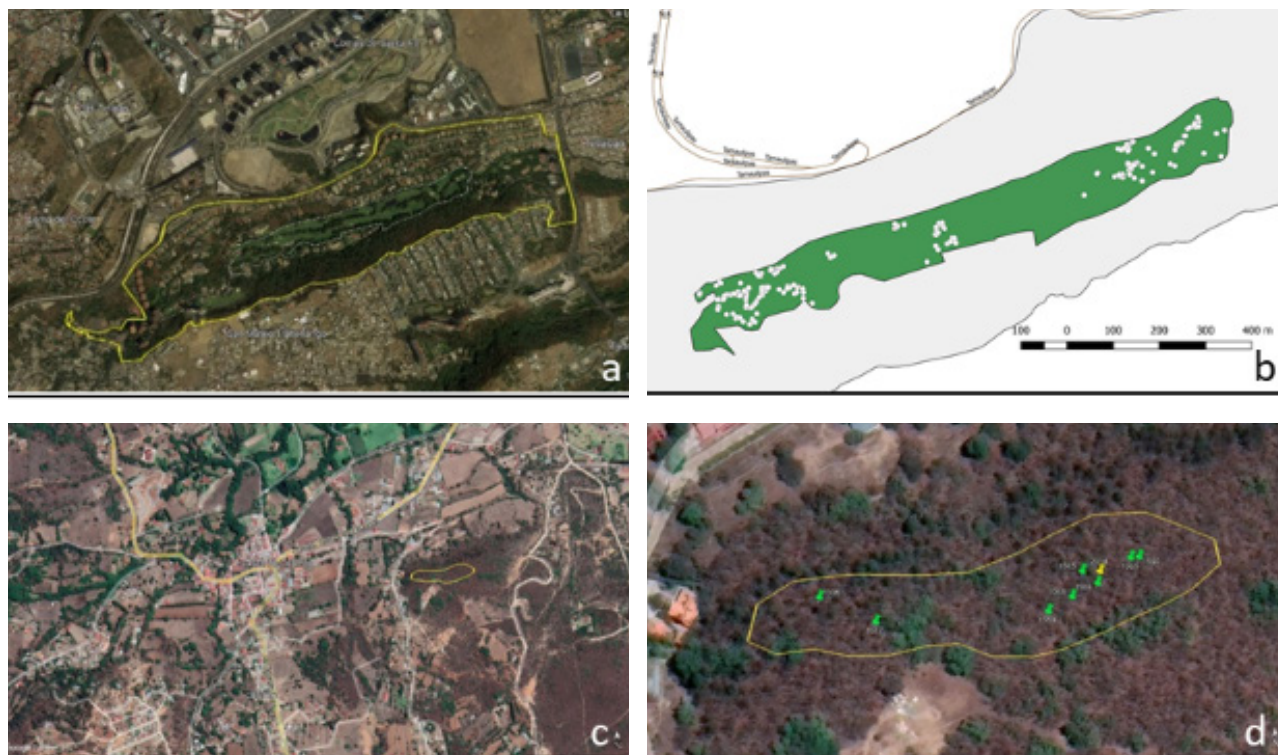


Figure 1. Study sites for collecting *Loxaulus hyalinus* in *Quercus laeta* oak groves: a) Santa Fe, Cuajimalpa, Ciudad de México; b) trees under observation marked with white dots within the green polygon; c) Huasca de Ocampo, Hidalgo; d) polygon examined, hosts studied (green mark) and site reference point (yellow mark).

Figura 1. Sitios de estudio para la recolecta de *Loxaulus hyalinus* en encinares de *Quercus laeta*: a) Santa Fe, Cuajimalpa, Ciudad de México; b) árboles bajo observación señalados con puntos blancos dentro del polígono verde; c) Huasca de Ocampo, Hidalgo; d) polígono examinado, hospedantes estudiados (marca verde) y punto de referenciación del sitio (marca amarilla).

the tribe Synergini (Cynipidae), lethal or non-lethal (facultative), are the main group of inquiline (Sanver & Hawkins, 2000).

The aim of the present study was to describe the development stages of the sexual generation of *L. hyalinus*, its galls, type of host damage and to identify the associated inquiline species and parasitoid genera.

Materials and Methods

The study area was located in the Barranca 'Los Helechos' (Figure 1a), Santa Fe, San Mateo Tlaltenango, Cuajimalpa, Mexico City (between 19° 21' 16.7" - 19° 20' 52.1" N and 99° 16' 38.7" - 99° 15' 40.1" W), at 2 547-2 623 m elevation. *Quercus laeta* is found in a natural forest area, at the edge of roads, around buildings and several common areas (Figure 1b).

Another study site was the municipality of Huasca de Ocampo, Hidalgo (20° 12' 12.34" - 20° 12' 14.51" N and 98° 34' 14.64" - 98° 34' 06.76" W (Figure 1c). On 8 and 29 May 2021, *L. hyalinus* twig galls and host samples (green marks, Figure 1d) were collected in the vicinity of the site reported by Pujade-Villar et al. (2014) (yellow

los enemigos naturales más importantes, mientras que las especies de la tribu Synergini (Cynipidae), letales o no letales (facultativos), son el principal grupo de inquilinos (Sanver & Hawkins, 2000).

El objetivo de este trabajo fue describir los estados de desarrollo de la generación sexual de *L. hyalinus*, sus agallas, el tipo del daño en el hospedante e identificar las especies de inquilinos y géneros de parasitoides asociados.

Materiales y métodos

El área de estudio se ubicó en la Barranca 'Los Helechos' (Figura 1a), localidad de Santa Fe, San Mateo Tlaltenango, Alcaldía de Cuajimalpa, Ciudad de México (entre 19° 21' 16.7" - 19° 20' 52.1" N y 99° 16' 38.7" - 99° 15' 40.1" O), a 2 547-2 623 m de elevación. *Quercus laeta* se distribuye en una franja de bosque natural, a la orilla de vialidades, alrededor de edificios y diversas áreas comunes (Figura 1b).

Otro sitio de estudio fue el municipio de Huasca de Ocampo, Hidalgo (20° 12' 12.34" - 20° 12' 14.51" N y 98° 34' 14.64" - 98° 34' 06.76" O (Figura 1c). El 8 y 29 de mayo

mark, Figure 1d). Galls were placed in individual containers and host samples were placed in a plant press, dried and identified. The adults that emerged from galls were placed in 2 mL Axygen® microtubes with 96 % ethyl alcohol.

The development of immatures and the timing of adult emergence were studied on galls collected from October 2019 to June 2021 in Santa Fe. Field surveys were conducted at least once a month and twigs were collected to look for eggs or young galls. Collections were carried out at least once a week when pupae began to be observed in March of each year and until adult emergence was completed in the laboratory.

Loxaulus hyalinus and its galls were observed in the laboratory of Insect Physiology of Fitosanidad-Entomología y Acarología, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. For each date collection, three galls were selected from each of five trees. Bark and parenchyma were removed with a razor until larval chambers were found; content of each larval chamber was extracted and the type of organism and its stage of development were recorded. Larvae and pupae were stored in ethyl alcohol (96 %). A group of larvae of all sizes was associated with the dates of collection and their morphological characteristics were described, just as in the pupal stage, where changes during their development, body length and their presence in relation to the dates of collection were also recorded. Eggs, larvae, pupae and larval chambers were measured using Adobe Photoshop® CS3.

The beginning of the adult emergence period was recorded from the detection of the first pupae in the dissected galls until the first week of June 2019 to 2021. From each collection date, at least 20 galls were individually placed in 1.0 L clear plastic containers, which were considered emergence chambers, and an identification number was assigned to them. They were kept under room temperature and natural light conditions. As soon as the first adults of *L. hyalinus* were found in the dissected galls, the chambers were checked daily to collect and transfer them with an aspirator to a 1.0 L transparent container with ventilation cover, per day, to observe their behavior. Detected parasitoid and inquiline adults were captured and preserved in microtubes with ethyl alcohol (96 %), one microtube/chamber/day. In 2020 and 2021, a plastic bottle cap with water and honey drops as food, and *Q. laeta* leaves for shelter were placed inside the containers, which were inspected until no adult emergence was recorded.

Adult longevity was determined on 49 individuals emerged between 9 and 15 May 2020 under laboratory conditions. The containers were checked daily at 10:00 and 15:00 h, to record feeding and sexual

del 2021 se recolectaron agallas de ramilla similares a las de *L. hyalinus* y muestras de los hospedantes (marcas verdes, Figura 1d), en las cercanías del lugar reportado por Pujade-Villar et al. (2014) (marca amarilla, Figura 1d). Las agallas se colocaron en recipientes individuales y las muestras de los hospedantes se prensaron, secaron e identificaron. Los adultos emergidos de las agallas se colocaron en microtubos Axygen® de 2 mL con alcohol etílico 96 %.

En las agallas recolectadas de octubre de 2019 a junio de 2021 en Santa Fe, se estudió el desarrollo de los inmaduros y el momento de emergencia de los adultos. Los recorridos en campo se efectuaron al menos una vez al mes y se recolectaron ramillas para buscar oviposturas o agallas jóvenes. Las recolectas se realizaron al menos una vez por semana cuando se empezaron a observar las pupas en marzo de cada año y hasta que concluyó la emergencia de adultos en laboratorio.

Loxaulus hyalinus y sus agallas se observaron en el laboratorio de Fisiología de Insectos del Posgrado en Fitosanidad, Entomología y Acarología del Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados. En cada fecha de recolecta se seleccionaron tres agallas en cada uno de cinco árboles. Con una navaja se retiró la corteza y el parénquima hasta encontrar las cámaras larvales; el contenido de cada cámara larval se extrajo y se registró el tipo de organismo y su estado de desarrollo. Las larvas y pupas se almacenaron en alcohol etílico (96 %). Un grupo de larvas de todos los tamaños se asoció con las fechas de recolecta y se describieron sus características morfológicas, de igual forma que en el estado de pupa, en el que se registraron también los cambios durante su desarrollo, la longitud del cuerpo y su presencia en relación con las fechas de recolecta. La medición de los huevos, larvas, pupas y cámaras larvales se hizo en Adobe Photoshop® CS3.

El inicio del periodo de emergencia de los adultos se registró a partir de la detección de las primeras pupas en las agallas diseccionadas y hasta la primera semana de junio de 2019 a 2021. De cada fecha de recolecta se colocaron, individualmente, al menos 20 agallas en recipientes de plástico transparente de 1.0 L, que se consideraron cámaras de emergencia, y se les asignó un número de identificación. Estos se conservaron bajo condiciones de temperatura ambiente y luz natural. A partir de que se encontraron los primeros adultos de *L. hyalinus* en las agallas diseccionadas, se hicieron revisiones diarias de las cámaras para recolectar uno por día con un aspirador y transferirlos a un frasco transparente de 1.0 L con tapa con ventilación, para observar su comportamiento. Los adultos de parasitoides e inquilinos detectados se capturaron y conservaron en microtubos con alcohol etílico (96 %), un microtubo/cámara/día. En el 2020 y 2021, se colocó una tapa con agua y gotas de miel como alimento en

behavior. The containers remained closed until all the adults were dead, and then they were placed in 96 % ethyl alcohol. The number of *L. hyalinus*, females and males, parasitoids, and adult inquiline cynipids captured per chamber/collection date of 2019, 2020, and 2021 was recorded. Females of *L. hyalinus* were identified based on the description of Pujade-Villar et al. (2014) and males based on data from Cuesta-Porta et al. (2022).

The number of developed eggs was counted in 14 females with dilated abdomen following the procedure of Hood and Ott (2011). The abdomen was detached from the body, the integument of the second and third segments was removed and the abdomen was placed on a reaction plate with a 1:1:13 solution of acetic acid, glycerol and water, respectively, for a period of at least 2 h to loosen the follicular tissue of the ovary. Eggs were separated from the ovarioles and counted using UV light (395 nm) under a microscope. From each female, 10 eggs were taken at random and placed on a slide with a 70 % glycerol solution and photographed. Their body length, body width and peduncle length were measured according to Vårdal et al. (2003).

The length of the gall, its minimum and maximum diameter, diameters of the twig before and at the end of the gall, and distance from the gall to the terminal bud of the twig were measured with an iGaging® OriginCal® caliper (resolution = 0.01 mm) on 70 galls collected in February 2022 and the number of larval chambers was counted. The correlation matrix ($P = 0.05$) of the measured variables and the multiple linear regression ($\alpha = 0.05$) of gall length - number of larval chambers were calculated with STATISTICA® software version 8.0 (StatSoft Inc., 2007).

The structure of two twigs collected in February 2022, with and without typical galls of *L. hyalinus*, was described from 25 μm to 30 μm thick longitudinal and transverse micrometric sections fixed in formaldehyde-alcohol-acetic acid and sectioned with a Leica® SM2000R slide microtome. The sections were stained with Bismarck Brown, which stains cellulose from plant cell walls (Garrido-Fariña et al., 2021) from different tissues, such as phloem (Blaydes, 1939).

The effects of *L. hyalinus* infestation on twigs of *Q. laeta* were recorded on trees located in highly disturbed sites with evident infestation between 2018 and 2021. Observations on twig survival, presence of foliage and apical dominance were included. Parasitoids were identified to genus level with the keys of Gibson et al. (1997), and the species of the inquiline cynipids were identified based on information from Lobato-Vila and Pujade-Villar (2017, 2018) and Lobato-Vila et al. (2019, 2020).

los frascos, así como hojas de *Q. laeta* para refugio. Los recipientes se inspeccionaron hasta que ya no se registró emergencia de adultos.

La longevidad de los adultos se determinó en 49 individuos emergidos entre el 9 y el 15 de mayo del 2020 en condiciones de laboratorio. Los frascos se revisaron diariamente a las 10:00 y 15:00 h, para registrar el comportamiento alimenticio y sexual. Los recipientes permanecieron cerrados hasta la muerte de todos ellos, momento en el que se colocaron en alcohol etílico al 96 %. Se registró el número de hembras y machos de *L. hyalinus*, parasitoides y cinípidos inquilinos adultos capturados por cámara/fecha de recolecta de 2019, 2020 y 2021. Las hembras de *L. hyalinus* se identificaron con base en la descripción de Pujade-Villar et al. (2014) y los machos con los datos de Cuesta-Porta et al. (2022).

Con base en la metodología modificada de Hood y Ott (2011), el número de huevos desarrollados se contabilizó en 14 hembras con el abdomen dilatado. El abdomen se desprendió del cuerpo, se retiró el integumento del segundo y tercer segmento y se colocó en una placa de reacción con una solución 1:1:13 de ácido acético, glicerol y agua, respectivamente, por un periodo de al menos 2 h para aflojar el tejido folicular del ovario. Los huevos se separaron de las ovariolas y se contaron usando luz UV (395 nm) bajo un microscopio. De cada hembra se tomaron 10 huevos al azar que se colocaron en un portaobjetos con una solución de glicerol al 70 %, se fotografiaron y se midió la longitud y ancho del cuerpo y la longitud del pedúnculo, de acuerdo con Vårdal et al. (2003).

La longitud, diámetro mínimo y máximo, los diámetros de la ramilla antes y al final de la agalla, así como la distancia de esta última a la yema terminal de la ramilla se midieron con un calibrador iGaging® OriginCal® (resolución = 0.01 mm) en 70 agallas recolectadas en febrero del 2022 y se contó el número de cámaras larvales. La matriz de correlación ($P = 0.05$) de las variables medidas y la regresión lineal múltiple ($\alpha = 0.05$) de la longitud de las agallas - número de cámaras larvales se calcularon en el programa STATISTICA® versión 8.0 (StatSoft Inc., 2007).

La estructura de dos ramillas con y sin agallas típicas de *L. hyalinus*, recolectadas en febrero del 2022, se describió a partir de cortes micrométricos longitudinales y transversales de 25 μm a 30 μm de espesor fijados en formaldehído-alcohol-ácido acético y obtenidos con un microtomo de deslizamiento Leica® SM2000R. Los cortes se tiñeron con Pardo de Bismarck, el cual denota la celulosa de la pared de las células vegetales (Garrido-Fariña et al., 2021) de diversos tejidos, como el del floema (Blaydes, 1939).

Los efectos de la infestación por *L. hyalinus* en ramillas de *Q. laeta* se registraron en árboles situados en lugares

Field photographs were taken with a Sony® A7R3 digital camera and a Vario-Tessar® T* FE 24-70 mm F4 ZA OSS lens, as well as in the laboratory with the same camera and 4x, 10x and 20x planar lenses in the Remote (Sony®) program. A scale with divisions at 0.01 mm from a micrometer calibration slide was used as a reference for the measurement. The photographs were processed with Helicon Focus 7 (Heliconsoft®), Capture One® 20 and 22 and Adobe Photoshop® CS3. Statistical tests, correlation matrices, multiple linear regression and calculation of descriptive statistics were performed with STATISTICA® 8 (StatSoft®).

Results and Discussion

In 2019, females and males of *L. hyalinus* emerged from twig galls of *Q. laeta* collected in Santa Fe. Previously, Pujade-Villar et al. (2014) reported *L. hyalinus* from twig galls of *Q. dysophylla*, collected in Huasca de Ocampo, Hidalgo, but they only described the females and indicated that they belonged to the asexual generation; however, in 2021 they made another collection in Huasca and found branch galls of *Q. laeta* that produced females and males of *L. hyalinus*, but not in *Q. dysophylla*. It is important to mention that the two *Quercus* species belong to different sections and that *Q. dysophylla* showed no twig galls in that locality, which suggests that there was an error in the identification of this species as a host. In 2014, the same authors mentioned that, in Santa Fe, *L. laeta* generated twig galls and that it was the main branch galls species of *Q. laeta*; in contrast, for all collections carried out in this study, between 2019 and the first quarter of 2022, only females and males of *L. hyalinus* were collected. According to the authors mentioned above, the morphological difference between the wings of *L. hyalinus* (completely hyaline) and *L. laeta* (with a characteristic spot) is easily distinguishable.

Developmental stages of *Loxaulus hyalinus*

The asexual form occurs between two consecutive sexual generations. In the sampling periods from June to October, twigs were examined for the ovipositions of the asexual form that give rise to the galls of the sexual generation, but they were not found. Therefore, it is still unknown in which host organ the galls of the asexual generation are found, their appearance and when the agamic females oviposit, so that, in this study, only the developmental stages of the sexual form are described.

Larvae

From October to December, longitudinal sections of developing galls showed, in zenith view, that the chambers were filled with nutritive tissue. In this

con alta perturbación y con infestación evidente entre 2018 y 2021. Se incluyeron observaciones sobre la supervivencia de las ramas, presencia de follaje y dominancia apical. Los parasitoides se identificaron a nivel de género con las claves de Gibson et al. (1997) y la especie de los cinípidos inquilinos se identificó con base en la información de Lobato-Vila y Pujade-Villar (2017, 2018) y Lobato-Vila et al. (2019, 2020).

Las fotografías en campo se tomaron con una cámara digital Sony® A7R3 y un lente Vario-Tessar® T* FE 24-70 mm F4 ZA OSS, así como en el laboratorio con la misma cámara y objetivos planares 4x, 10x y 20x en el programa Remote (Sony®). Para la medición se usó como referencia una escala con divisiones a 0.01 mm de un portaobjetos de calibración de micrómetro. Las fotografías se procesaron con los programas Helicon Focus 7 (Heliconsoft®), Capture One® 20 y 22 y Adobe Photoshop® CS3. Las pruebas estadísticas, matrices de correlación, regresión lineal múltiple y el cálculo de estadísticos descriptivos se hicieron en STATISTICA® 8 (StatSoft®).

Resultados y discusión

En el 2019 emergieron hembras y machos de *L. hyalinus* de las agallas de ramillas de *Q. laeta* recolectadas en Santa Fe. Previamente, Pujade-Villar et al. (2014) reportaron *L. hyalinus* de agallas de ramilla de *Q. dysophylla*, recolectadas en Huasca de Ocampo, Hidalgo, pero solo describieron a las hembras y señalaron que pertenecían a la generación asexual; sin embargo, en 2021 realizaron otra recolecta en Huasca y encontraron agallas en ramillas de *Q. laeta* de las que emergieron hembras y machos de *L. hyalinus*, pero no en *Q. dysophylla*. Es importante mencionar que las dos especies de *Quercus* pertenecen a secciones distintas y que *Q. dysophylla* no presentó agallas de ramilla en dicha localidad, lo que permite suponer que hubo un error en la identificación de esta especie como hospedante. En el 2014, los mismos autores mencionaron que, en Santa Fe, *L. laeta* generaba agallas en ramillas y que era la principal especie de agallador de ramas de *Q. laeta*; en cambio, en todas las recolectas realizadas en este trabajo, entre 2019 y el primer trimestre de 2022, solo se obtuvieron hembras y machos de *L. hyalinus*. De acuerdo con los autores mencionados, la morfología de las alas diferencia muy fácilmente a *L. hyalinus* (alas completamente hialinas) de *L. laeta* (con una mancha alar característica).

Estados de desarrollo de *Loxaulus hyalinus*

La forma asexual se presenta entre dos generaciones sexuales consecutivas. En los periodos de muestreo de junio a octubre, se examinaron ramillas en busca de las oviposturas de la forma asexual que dan lugar a las agallas de la generación sexual, pero no se encontraron. Por tanto, aún se desconoce en qué órgano del hospedante

period, the L1 instar is a translucent sphere without external segmentation located in the center.

In the January observations, 57.1 % of the gall-inducer larvae corresponded to L1 with reduced activity and could be found in different places inside the chamber, while the nutrient tissue no longer covered the entire interior and 42.9 % corresponded to L2.

The larvae of *L. hyalinus* from instar L2 are hymenopteriform with a fusiform body, curved ventrally, with the anterior part slightly wider than the rest, without projections, whitish, smooth and shiny, with little evident segmentation in the first instars and 12 visible segments of similar size in the more developed instars (Figure 2a), similar to other species of Cynipoidea, as described by Nieves-Aldrey et al. (2005). The head is small especially in the first instars, with tiny, single-toothed mandibles with a sharp tip (Figure 2b); Nieves-Aldrey et al. (2005) indicate that the number of teeth in Cynipoidea varies from one to five between the left and right mandible.

Pupa

In April, last instar larvae and pupae of *L. hyalinus* with different levels of development were found in the galls (Figure 3a). The pupa is exarate and as development progressed it was possible to differentiate the body tagma, legs and antennae (Figure 3b). By mid-April, development was complete. Pigmentation begins in the eyes and continues on the rest of the body (Figure 3c); the wings were the last to form.

se encuentran las agallas de la generación asexual, su apariencia y cuándo ovipositan las hembras agámicas, de tal modo que, en este estudio, solo se describen los estadios de desarrollo de la forma sexual.

Larva

De octubre a diciembre, los cortes longitudinales de agallas en desarrollo mostraron, en vista cenital, que las cámaras estaban rellenas de tejido nutricio. En este periodo, el instar L1 es una esfera translúcida sin segmentación externa situada en el centro.

En las observaciones de enero, 57.1 % de las larvas del inductor de agallas correspondió a L1 con actividad reducida y se les podía encontrar en sitios diferentes dentro de la cámara, mientras que el tejido nutricio ya no cubría todo el interior y 42.9 % correspondía a L2.

Las larvas de *L. hyalinus* a partir del instar L2 son himenopteriformes con el cuerpo fusiforme, curvado ventralmente, con la parte anterior ligeramente más ancha que el resto, sin proyecciones, blanquecino, liso y brillante, con la segmentación poco evidente en los primeros instares y 12 segmentos visibles de tamaño similar en los estadios más desarrollados (Figura 2a), semejante a otras especies de Cynipoidea, de acuerdo con lo descrito por Nieves-Aldrey et al. (2005). La cabeza es pequeña sobre todo en los primeros instares, con mandíbulas diminutas de un solo diente con punta aguda (Figura 2b); Nieves-Aldrey et al. (2005) indican que el número de dientes en Cynipoidea varía de uno a cinco entre la mandíbula izquierda y derecha.

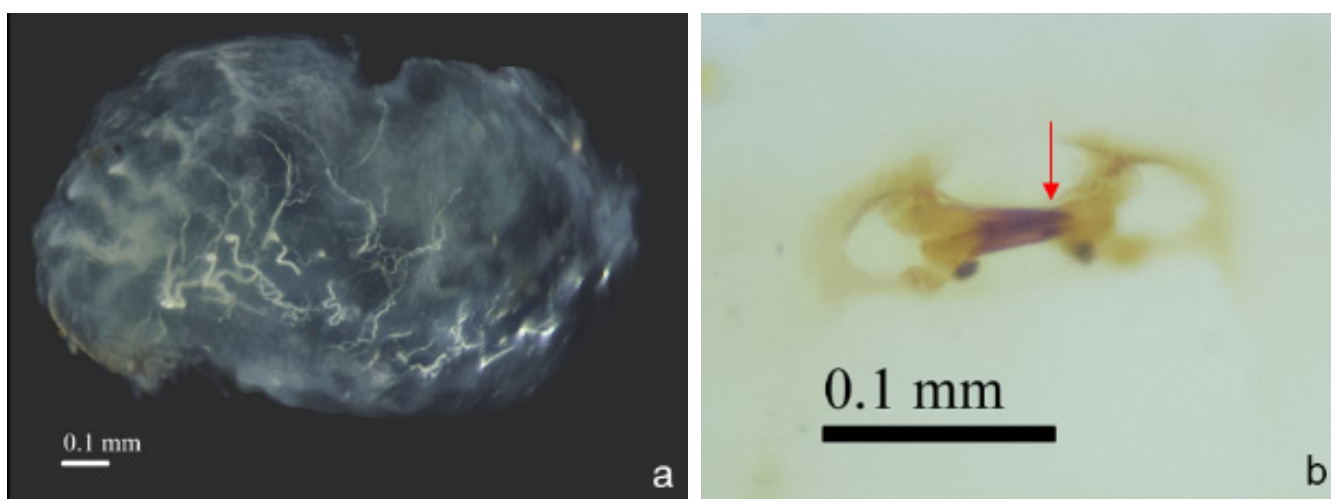


Figure 2. *Loxaulus hyalinus*: a) last instar larvae and b) mandibles with a single tooth (arrow).

Figura 2. *Loxaulus hyalinus*: a) larva de último instar y b) mandíbulas con un solo diente (flecha).

Preimagos, adult and egg

Preimagos with developing wing packets could walk steadily when extracted from the chambers. Non-emerged adults when extracted from the chambers or when they emerged naturally began to spread their wings as their first activity.

Loxaulus hyalinus is black with a massive head (1.9 times wider than long in dorsal view in females and 1.7 to 1.8 in males) with malar space 0.2 times the height of the compound eye. Females (Figure 3d) have 13 antennal flagellomeres with placoid sensilla visible from segment F3; while males (Figure 3e) have 15 flagellomeres; F1 0.8 times F2 and slightly curved; posterior lateral ocellus with a transverse impression; mesosoma is 1.4 to 1.5 times longer than wide in lateral view; notauli incomplete, scutellar pits longitudinally carinate, forewings translucent with setae on margin, radial cell 3.0 times longer than wide, and ventral spine of hypopygium short and as long as wide (Cuesta-Porta et al., 2022; Pujade-Villar et al., 2014).

Adult survival was one to two days when they lacked shelter, water and carbohydrates, while those with these resources lived four to six days.

In the field, mating was observed on May 18, 2021, around noon, under clear weather conditions. Adults remained on the foliage and stem of nearby *Q. laeta* individuals and at ground level; active adults were found mainly on the underside of leaves, but oviposition or attempts at oviposition by females were not recorded. There was no mating in the laboratory, due to low light intensity conditions.

For the 14 females of the sexual generation, the abdomen was almost entirely occupied by the ovarian egg mass (Figure 3f) and contained on average 57.78 ± 5.50 eggs per female. These were observed translucent to whitish under white light (Figure 3g) and fluorescent green under UV light (Figure 3h); the body and peduncle are distinguishable. The body is longer than wide at a ratio of 3.7:1.0, with the rounded distal end gradually tapering toward the peduncle, which is approximately 1.6 times longer than the body (Table 1) and shows a gradual widening toward the distal end (Figures 3g and 3h). The general characteristics of the ovarian egg agree with the description of eggs of other cynipid galler species, according to Vårdal et al. (2003).

Characteristics and development of twig galls

Because no oviposits were found before September, the timing of when females of the asexual form of *L. hyalinus* (still unknown) oviposit on twigs to initiate the sexual phase of the cycle and the characteristics of galls in early

Pupa

En abril, en las agallas se encontraron larvas de último instar y pupas de *L. hyalinus* con diversos niveles de desarrollo (Figura 3a). La pupa es exarada y a medida que avanzaba su desarrollo fue posible diferenciar los tagmas del cuerpo, las patas y antenas (Figura 3b). Para mediados de abril completaron su desarrollo. La pigmentación inicia por los ojos y continúa en el resto del cuerpo (Figura 3c); las alas fueron las últimas en formarse.

Preimago, adulto y huevo

Los preimagos con paquetes alares en formación podían caminar de manera constante cuando se extraían de las cámaras. Los adultos no emergidos cuando se les extraía de las cámaras o cuando emergieron de manera natural comenzaron a desplegar las alas como primera actividad.

Loxaulus hyalinus es de color negro con la cabeza masiva (1.9 veces más ancha que larga en vista dorsal en las hembras y 1.7 a 1.8 en los machos) con espacio malar 0.2 veces la altura del ojo compuesto. Las hembras (Figura 3d) tienen 13 flagelómeros antenales con sensilas placoideas visibles desde el segmento F3; mientras que los machos (Figura 3e) tienen 15 flagelómeros; F1 0.8 veces F2 y ligeramente curvado; el ocelo lateral posterior con una impresión transversal; el mesosoma es 1.4 a 1.5 veces más largo que ancho en vista lateral; notauli incompleto, fosetas escutelares longitudinalmente carinadas, alas anteriores translúcidas con setas en el margen, celda radial 3.0 veces más larga que ancha y espina ventral del hipopigio corta y tan larga como ancha (Cuesta-Porta et al., 2022; Pujade-Villar et al., 2014).

La supervivencia de los adultos fue de uno a dos días cuando carecieron de refugio, agua y carbohidratos, mientras que los que sí contaban con dichos recursos vivieron cuatro a seis días.

En campo, el apareamiento se observó el 18 de mayo del 2021, alrededor del mediodía, en condiciones climáticas de cielo despejado. Los adultos permanecían en el follaje y fuste de los individuos de *Q. laeta* cercanos y a nivel de suelo; se encontraron adultos activos principalmente en el envés de las hojas, pero no se registró la oviposición o intentos de esta por parte de las hembras. En laboratorio no ocurrió el apareamiento, debido a las condiciones de baja intensidad de luz.

En las 14 hembras de la generación sexual, el abdomen se encontraba ocupado casi en su totalidad por la masa de huevos ováricos (Figura 3f) y contenían en promedio 57.78 ± 5.50 huevos por hembra. Estos se observaron translúcidos a blanquecinos bajo luz blanca (Figura 3g) y verde fluorescente bajo luz UV (Figura 3h); en ellos se distinguen el cuerpo y el pedúnculo. El

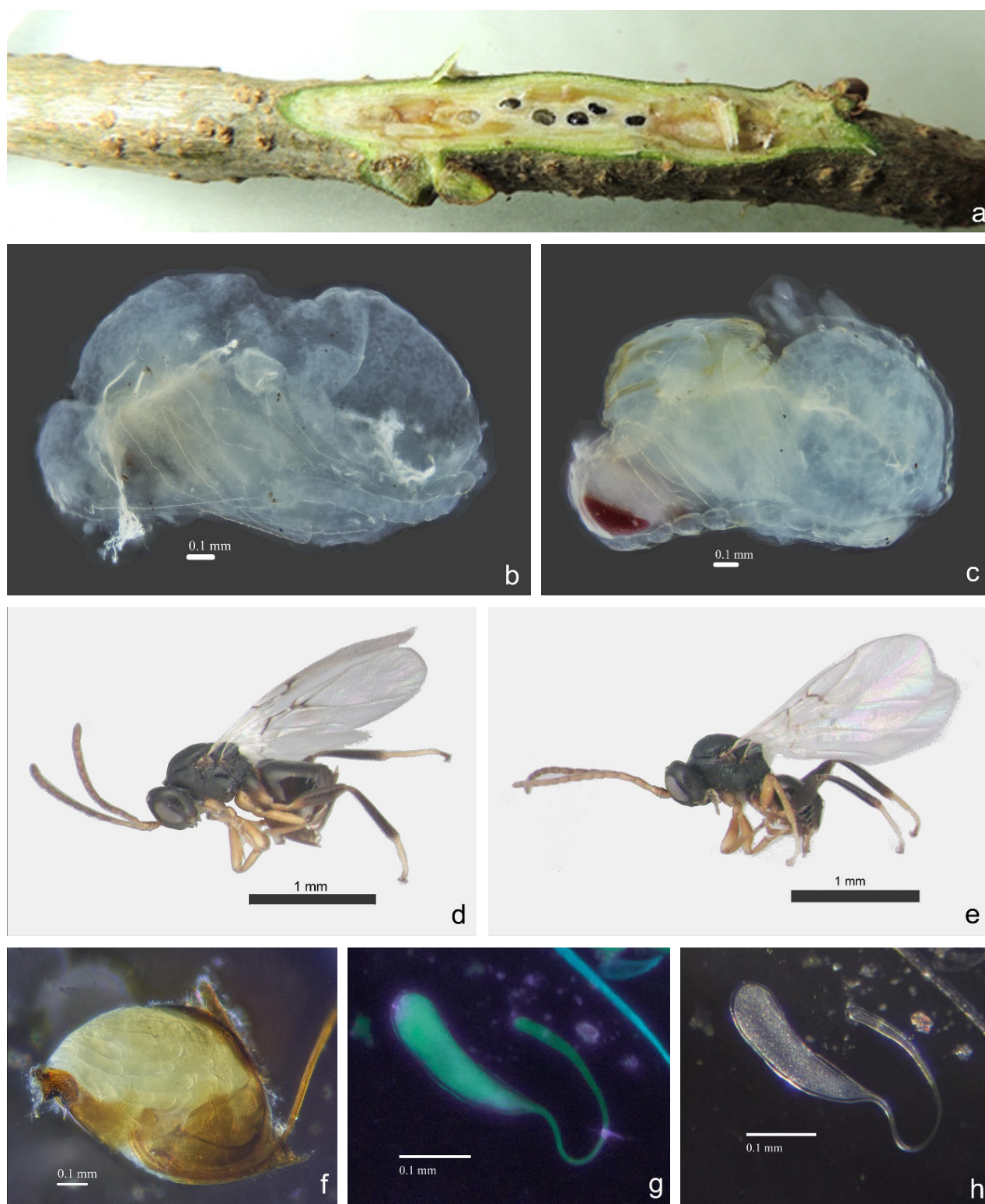


Figure 3. Characteristics of the development stages of *Loxaulus hyalinus*: a) gall with larvae and pupae; b and c) pupae with different degree of development; d and e) female and male, respectively; f) female ovipositor metasome; g and h) ovarian eggs under white light and UV light (395 nm), respectively.

Figura 3. Características de los estados de desarrollo de *Loxaulus hyalinus*: a) agalla con larvas y pupas; b y c) pupas con grado diferente de desarrollo; d y e) hembra y macho, respectivamente; f) metasoma ovipositor de hembra; g y h) huevos ováricos bajo luz blanca y luz UV (395 nm), respectivamente.

Table 1. Dimensions of ovarian eggs of *Loxaulus hyalinus* (n = 14).**Cuadro 1. Dimensiones de los huevos ováricos de *Loxaulus hyalinus* (n = 14).**

Variable (mm)	Average/ Promedio	Minimum/ Mínimo	Maximum/ Máximo	DE	IC-Lower limit/ IC-Límite inferior	IC-Upper limit/ IC-Límite superior
Body length/ Longitud del cuerpo	0.2355	0.1313	0.2849	0.0203	0.0181	0.0230
Body width/ Ancho del cuerpo	0.0630	0.0318	0.0822	0.0082	0.0074	0.0093
Peduncle length/ Longitud del pedúnculo	0.3746	0.1770	0.6377	0.0714	0.0639	0.0809
Total egg length/ Longitud total del huevo	0.6101	0.4010	0.8721	0.0736	0.0659	0.0834

SD: standard deviation; CI: confidence interval.

DE: desviación estándar; IC: intervalo de confianza.

stages of growth were not determined. In October, galls were observed as elongated, inconspicuous swellings. By January of the following year, the galls developed an elongated shape with slightly rough to rough bark, and a coloration that ranged from brown to greenish-gray, similar to the basal and distal portion of the not infested twig (Figure 4f). In June, after adult emergence, the mature galls turn grayish brown (Figure 4g). According to Stone and Schönrogge (2003) and Hernández-Soto et al. (2015), two regions can be distinguished in the galls; the internal one, composed of the larval chambers, and the external one, by cortical tissue. *Loxaulus hyalinus* galls show contiguous chambers only interrupted by less developed areas in which there are no chambers, or these are individual and isolated with external, poorly developed gall tissue giving an appearance of adjacent swellings (Figure 4f).

An average gall length of 40.91 mm (minimum = 9.75 mm, maximum = 108 mm) was observed in 70 galls measured in January 2022. The average gall diameter was 4.94 mm (minimum = 4.42, maximum = 5.46 mm) and that of the twig before initiating the gall was 3.42 mm and after ending distally was 2.82 mm. Galls ended on average 16.3 mm from the terminal bud of the twig. Forty galls had green leaves and the rest had brown leaves (10) or no leaves (20). The average number of chambers per gall was 36.4 with an interval from 7 to 104 and significant positive correlation of 0.80 ($P < 0.05$, $n = 70$) between length and number of chambers, although there were long galls with a low number of chambers and *vice versa*. Multiple linear regression provided $R^2 = 0.6408$ which corroborated the relationship.

In *L. hyalinus*, the internal gall is the larval chamber, whose structure is composed from the inside out by a layer of nutritive tissue and a layer of parenchyma that totally or partially cover the interior, and a layer of sclerenchyma that delimits them and to which vascular bundles join in the basal region. The external gall has a

cuerpo es más largo que ancho en una relación de 3.7:1.0, con el extremo distal redondeado que se estrecha gradualmente hacia el pedúnculo, el cual es aproximadamente 1.6 veces más largo que el cuerpo (Cuadro 1) y presenta un ensanchamiento gradual hacia el extremo distal (Figuras 3g y 3h). Las características generales del huevo ovárico coinciden con la descripción de los huevos de otras especies de cinípidos agalladores, de acuerdo con Vårdal et al. (2003).

Características y desarrollo de la agalla de ramilla

Debido a que no se encontraron oviposturas antes de septiembre, no se determinó el momento en que las hembras de la forma asexual de *L. hyalinus* (aún desconocidas) ovipositan en las ramillas para iniciar la fase sexual del ciclo ni las características de las agallas en etapas tempranas del crecimiento. En octubre, las agallas se observaron como hinchazones alargadas y poco evidentes. Para enero del año siguiente, las agallas adquirieron una forma alargada con corteza ligeramente rugosa a rugosa, café a gris verdosa, similar a la porción basal y distal de la ramilla no infestada (Figura 4f). En junio, después de la emergencia de los adultos, la agalla madura adquiere un color café grisáceo (Figura 4g). De acuerdo con Stone y Schönrogge (2003) y Hernández-Soto et al. (2015), en las agallas se pueden distinguir dos regiones, la interna compuesta por las cámaras larvales y la externa por tejido cortical. Las agallas de *L. hyalinus* presentan cámaras contiguas solo interrumpidas por áreas menos desarrolladas en las que no hay cámaras o estas son individuales y aisladas con el tejido de la agalla externa, poco desarrollado, que da una apariencia de abultamientos adyacentes (Figura 4f).

En 70 agallas medidas en enero del 2022 se observó una longitud promedio de 40.91 mm (mínimo = 9.75 mm, máximo = 108 mm). El diámetro promedio de la agalla fue 4.94 mm (mínimo = 4.42, máximo = 5.46 mm) y el de la ramilla antes de iniciar la agalla fue 3.42 mm y

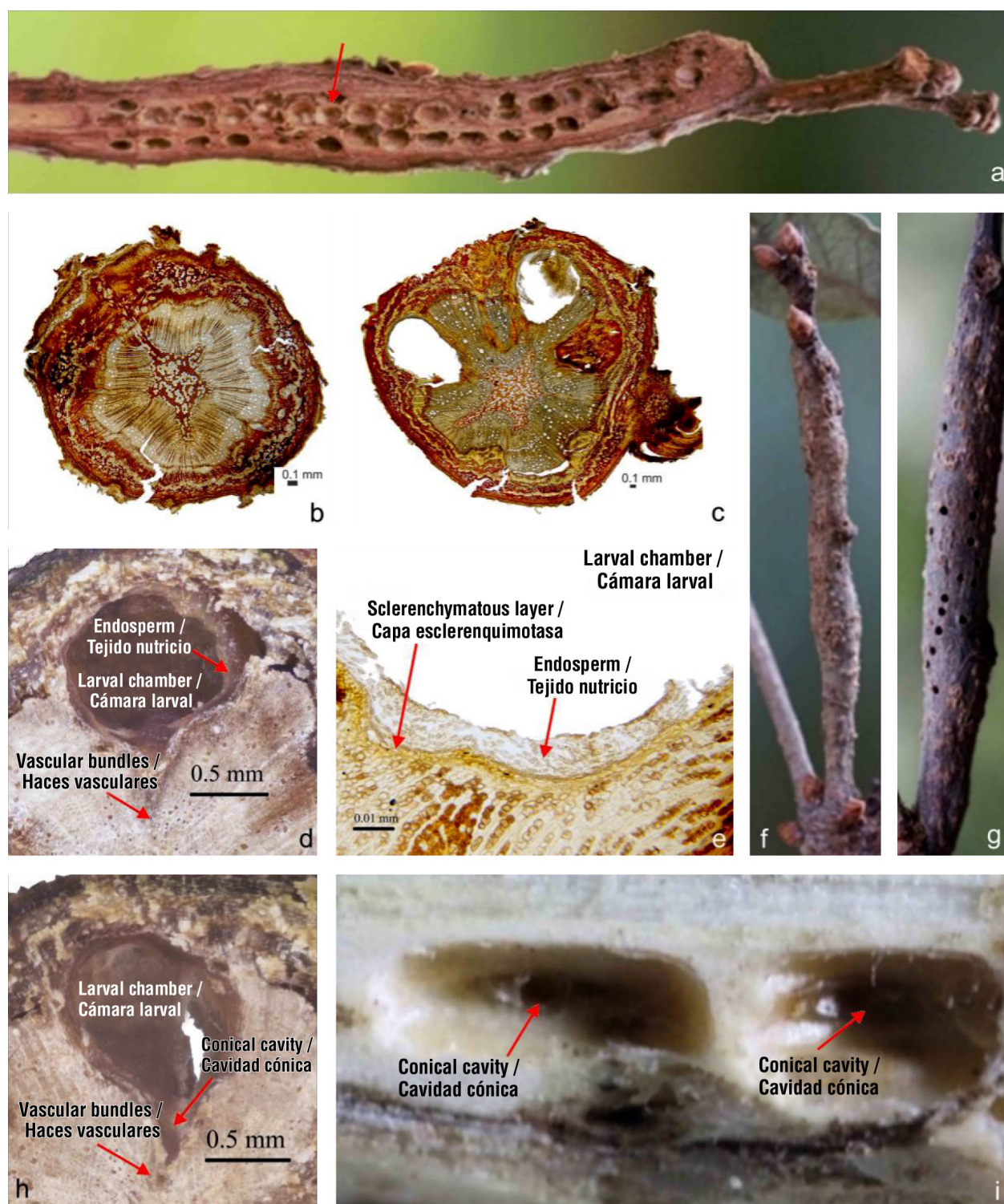


Figure 4. Galls of *Loxaulus hyalinus*: a) barkless gall with exposed chambers (arrow); b) transversal section of branch without galls; c, d and e) transversal section of a branch with galls and mature larval chambers; f) developing gall; g) mature gall with emergence holes; h) larval chamber in transversal view; i) larval chambers in zenith view. Arrows indicate the conical cavity penetrating the xylem.

Figura 4. Agallas de *Loxaulus hyalinus*: a) agalla sin corteza con las cámaras expuestas (flecha); b) sección transversal de ramilla sin agallas; c, d y e) sección transversal de una ramilla con agallas y cámaras larvales maduras; f) agalla en desarrollo; g) agalla madura con orificios de emergencia; h) cámara larval en vista transversal; i) cámaras larvales en vista cenital. Las flechas indican la cavidad cónica que penetra en el xilema.

similar structure to the branch without gall (Figure 4b), but its parenchyma is thicker, especially around the larval chambers (Figures 4c, 4d and 4e). The chambers are aligned longitudinally to the axis of the branch, in contiguous groups of two to six, in four to five semi-straight and sometimes helical rows, although there are variations attributable to the number of eggs initially deposited (Figure 4a).

A typical chamber has an oval shape in zenith view, with average values of 2.8 mm long and 1.4 mm wide ($n = 30$), with the most elongated part parallel to the direction of twig growth (Figure 4f and 4g). Other less frequent forms are semicircular, smaller than oval (length: 1.25 ± 0.17 mm; width: 1.49 ± 0.16 mm; $n = 8$), and the irregular, in which deformation is observed on some of the sides, but the tissue structure is preserved (Figure 4a). In the basal part of the center of the chamber there is a conical cavity that connects with the heartwood of the twig. The periphery of the chamber is formed by a coriaceous layer of sclerenchyma that inwardly connects with the parenchyma, which, by effect of larval feeding, becomes nutritive tissue, as suggested by Melika (2006). In transverse position, the gall shows drop-shaped chambers (length: 1.91 ± 0.05 mm; width: 1.23 ± 0.19 mm; $n = 42$), with the narrow part inserted deeply into the xylem (Figure 4c and 4d), which, when there is no nutritive tissue, in zenith view is perceived as a conical cavity prolonged towards the center of the twig (Figure 4h and 4i). The inducer is actively involved in gall development and differentiation (Stone & Schönrogge, 2003). Like other cynipids, galls of *L. hyalinus* are formed by host tissue whose function and structure are modified (Harris & Pitzschke, 2020), as observed in perpendicular sections of branches with and without galls (Figure 4b and 4c).

Life cycle of sexual generation

Because a biological cycle with only sexual generation is very rare in Cynipini, it is hypothesized that the known generation of *L. hyalinus* comes from ovipositions of females of asexual origin, which were not found in this study.

In October and November, when small galls were detected, the development stage was L1, which, in longitudinal sections and in zenith view, is observed as a translucent sphere. In the first half of January, the chambers completed their development and the larvae began to develop. The larval stage lasted until mid-April. Pupae were most frequently detected in the first two weeks of April, while preimagos were observed until the last week of April.

In the years where adult emergence was recorded, variations of a few days for its beginning and weeks for

después de finalizar en la parte distal fue 2.82 mm. Las agallas terminan en promedio a 16.3 mm de la yema terminal de la ramilla. Cuarenta agallas tenían hojas verdes y el resto hojas color café (10) o sin ellas (20). El promedio de cámaras por agalla fue 36.4 con un intervalo de 7 a 104 y correlación positiva significativa de 0.80 ($P < 0.05$, $n = 70$) entre longitud y número de cámaras, aunque existieron agallas largas con un número bajo de cámaras y viceversa. La regresión lineal múltiple proporcionó $R^2 = 0.6408$ que corroboró la relación.

En *L. hyalinus*, la agalla interna es la cámara larval, cuya estructura está integrada de adentro hacia afuera por una capa de tejido nutricio y una de parénquima que cubren total o parcialmente el interior, y una capa de esclerénquima que las delimita y a la que se unen haces vasculares en la región basal. La agalla externa presenta una estructura similar a la rama sin agalla (Figura 4b), pero cuyo parénquima es de mayor grosor, en particular alrededor de las cámaras larvales (Figuras 4c, 4d y 4e). Las cámaras están alineadas longitudinalmente al eje de la ramilla, en grupos contiguos de dos a seis, en cuatro a cinco hileras semirrectas y en ocasiones helicoidales, aunque existen variaciones atribuibles a la cantidad de huevos depositados inicialmente (Figura 4a).

Una cámara típica tiene forma ovalada en vista cenital, con valores promedio de 2.8 mm de largo y 1.4 mm de ancho ($n = 30$), con la parte más alargada paralela a la dirección de crecimiento de la ramilla (Figura 4f y 4g). Otras formas menos frecuentes son la semicircular, más pequeña que la ovalada (largo: 1.25 ± 0.17 mm; ancho: 1.49 ± 0.16 mm; $n = 8$), y la irregular, en la que se observa una deformación en alguno de los lados, pero se conserva la estructura de los tejidos (Figura 4a). En la parte basal del centro de la cámara se aprecia una cavidad cónica que conecta con el duramen de la ramilla. La periferia de la cámara está formada por una capa coriácea de esclerénquima que hacia adentro conecta con el parénquima, el cual, por efecto de la alimentación de la larva, se convierte en tejido nutricio, como sugiere Melika (2006). En posición transversal, la agalla presenta las cámaras con forma de gota (largo: 1.91 ± 0.05 mm; ancho: 1.23 ± 0.19 mm; $n = 42$), con la parte angosta insertada profundamente en el xilema (Figura 4c y 4d), la cual, cuando no hay tejido nutricio, en vista cenital se percibe como una cavidad cónica prolongada hacia el centro de la ramilla (Figura 4h y 4i). El inductor está involucrado activamente en el desarrollo y diferenciación de la agalla (Stone & Schönrogge, 2003). Al igual que otros cinípidos, las agallas de *L. hyalinus* están formadas por tejido del hospedante cuya función y estructura es modificada (Harris & Pitzschke, 2020), tal como se observó en los cortes perpendiculares de las ramas con y sin agallas (Figura 4b y 4c).

its end were found. Emergence of adult females and males began during the last week of April and lasted until the last week of May 2019, 2020 and 2021 and, exceptionally, until the second week of June 2020. The highest male emergence occurred between 1 and 7 May, while that of females was between 26 April and 3 May.

Mating was observed only in the field on 18 May 2021 around noon and under clear sky conditions. At the study site, active adults were found mainly on the underside of leaves, although oviposition was not observed.

Sexual generation of *L. hyalinus* requires at least eight months and occurs from October to May of the following year. Since we do not know where the asexual phase develops, the total duration of the biological cycle in its two phases remains uncertain.

Consequences of the impact of *Loxaulus hyalinus*

In the study site, the distribution of *Q. laeta* is fragmented with the greatest number of individuals located in a residual forest, on roads, in parks and on a golf course. Distribution and damage of *L. hyalinus* is higher in disturbed sites where oak trees suffer stress of various types, either by construction impacts or by being in soils exposed to erosion and nutrient washing, as well as lack of water. Affected trees have different sizes and compact, deformed crowns and 'zigzagging' branches, a consequence of chronic infestations over several years.

The presence of galls in *Q. laeta* can cause, in addition to foliage loss (Figure 5a), smaller branch size (Figure 5b) and impairment of water and nutrient conduction, so that only a few twigs can continue with normal development. Twig death during gall development or after adult emergence, and loss of apical dominance with subsequent sprouting of lateral buds at the base of the infested branch, result in a wavy growth pattern and a tortuous crown appearance (Figure 5c and 5d). Tooker et al. (2008) indicate that gall inducers consume resources that hosts could use for growth and reproduction, suppress or manipulate their defenses, alter their physical characteristics, impact their phenotype by changing patterns of photosynthetic rate and biomass accumulation, and stimulate special tissues for protection of the inducer, which can cause profound effects on their hosts. A high presence of *L. hyalinus* has an important visual effect on sites where oaks are important elements of the landscape, because the archetypal pattern of unattacked *Q. laeta* is lost.

Ciclo biológico de la generación sexual

Debido a que en los Cynipini es muy raro un ciclo biológico con solo la generación sexual, se hipotetiza que la generación conocida de *L. hyalinus* proviene de oviposturas de hembras de origen asexual, las cuales no fueron encontradas en el presente estudio.

En octubre y noviembre, cuando se detectaron agallas pequeñas, el estado de desarrollo presente fue de L1 que, en los cortes longitudinales y en vista cenital, se observa como una esfera translúcida. En la primera mitad de enero, las cámaras completaron su desarrollo y las larvas empezaron a desarrollarse. El estadio larval se prolongó hasta mediados de abril. Las pupas se detectaron con mayor frecuencia en las primeras dos semanas de abril, mientras que los preimagos se observaron hasta la última semana del mismo mes.

En los años donde se registró la emergencia de adultos se encontraron variaciones de pocos días para su inicio y de semanas para su final. La emergencia de hembras y machos adultos inició durante la última semana de abril y se prolongó hasta la última semana de mayo de 2019, 2020 y 2021 y, excepcionalmente, hasta la segunda semana de junio de 2020. La mayor emergencia de machos ocurrió entre el 1 y el 7 de mayo, mientras que la de las hembras fue entre el 26 de abril y el 3 de mayo.

El apareamiento se observó solo en campo, el 18 de mayo de 2021 alrededor del mediodía y en condiciones de cielo despejado. En el sitio de estudio se encontraron adultos activos principalmente en el envés de las hojas, aunque no se observó la oviposición.

La generación sexual de *L. hyalinus* requiere de al menos ocho meses y se presenta de octubre a mayo del siguiente año. Al no conocer donde se desarrolla la fase asexual, se mantiene la incertidumbre sobre la duración total del ciclo biológico en sus dos fases.

Consecuencias del impacto de *Loxaulus hyalinus*

En el sitio de estudio, la distribución de *Q. laeta* es fragmentada con mayor número de individuos en un bosque residual, en vialidades, parques y en un campo de golf. La distribución y daños de *L. hyalinus* es mayor en sitios perturbados donde el encino sufre estrés de varios tipos, ya sea por impactos de construcción o por estar en suelos expuestos a erosión y lavado de nutrientes, así como falta de agua. Los árboles afectados son de varios tamaños y tienen copa compacta, deformada y con ramas 'zigzagueantes', consecuencia de infestaciones crónicas de varios años.



Figure 5. Galls of *Loxaulus hyalinus* and effect on the canopy of *Quercus laeta*: a and b) galls with leaves about to detach, c) branches with galls, d) portion of the canopy with deformed branches.

Figura 5. Agallas de *Loxaulus hyalinus* y efecto en la copa de *Quercus laeta*: a y b) agallas con hojas a punto de desprenderse, c) ramas con agallas, d) porción de la copa con ramas deformadas.

Inquilines and parasitoids of *Loxaulus hyalinus*

The inquiline cynipids in the galls of *L. hyalinus* have at least two emergence periods: one from late January to March and another coinciding with the emergence of the gall inducer. In February 2022, during the larval stage of *L. hyalinus*, the emergence of *Synergus pseudofilicornis* Lobato-Vila and Pujade-Villar 2018 (previously named *Synergus filicornis* Cameron, 1883) was observed, and from April to May (*L. hyalinus* emergence period) of 2020 and 2021, of *Synergus grahami* Lobato-Vila and Pujade-Villar, 2019. *Synergus macrackenae* Lobato-Vila & Pujade-Villar, 2021 (Lobato-Vila & Pujade-Villar, 2021) and *S. filicornis* in branch galls of *Loxaulus* (Lobato-Vila et al., 2020) have also been reported. Because only the emergence period of *L. hyalinus* was evaluated in detail, the effect on mortality may be expected to be greater than observed, as these are lethal inquilines.

In a collection on 26 April 2019, 279 adults of different species were obtained from two galls. Emergence was recorded from April 28 to May 12. The individuals corresponded to *Eurytoma* (135 adults, 48.49 %), *L. hyalinus* (117 adults, 41.93 %), *Synergus* (12 adults, 4.30 %), *Sycophila* (nine adults, 3.22 %), *Ormyrus* (one adult, 0.36 %), Pteromalidae (three adults, 1.07 %) and Eulophidae (two adults, 0.72 %).

La presencia de las agallas en *Q. laeta* puede provocar, además de la pérdida de follaje (Figura 5a), un menor tamaño de la rama (Figura 5b) y afectación a la conducción de agua y nutrientes, por lo que solo pocas ramillas pueden continuar con un desarrollo normal. La muerte de la ramilla durante el desarrollo de la agalla o después de la emergencia de los adultos, y la pérdida de dominancia apical con la brotación subsecuente de yemas laterales en la base de la rama infestada, generan un patrón ondulado del crecimiento y una apariencia tortuosa de la copa (Figura 5c y 5d). Los agalladores, como indican Tooker et al. (2008), consumen recursos que los hospedantes podrían emplear en su crecimiento y reproducción, suprimen o manipulan sus defensas, alteran sus características físicas, impactan su fenotipo al cambiar los patrones de la tasa fotosintética y acumulación de biomasa, y estimulan tejidos especiales para la protección del inductor, lo que puede causar efectos profundos en sus hospedantes. Una alta presencia de *L. hyalinus* tiene un efecto visual importante en los sitios donde los encinos son elementos importantes del paisaje, ya que se pierde el patrón arquetípico que los *Q. laeta* no atacados presentan.

Inquilinos y parasitoides de *Loxaulus hyalinus*

Los cinípidos inquilinos en las agallas de *L. hyalinus* tienen al menos dos periodos de emergencia: uno de

From April 8 to June 18, 2020, 652 adults of different species emerged in 30 galls; the largest number of these emerged between May 10 and 27. The most numerous group was Eurytomidae (337 adults, 51.69 %), followed by Pteromalidae and Eulophidae (147 adults together, 22.55 %), *L. hyalinus* (90 adults, 13.80 %), Synergini (66 adults, 10.12 %), Ormyridae (10 adults, 1.53 %) and Eupelmidae (two adults, 0.31 %).

Between April 20 and May 17, 2021, 488 adults emerged from 27 galls; of these, the most numerous insect group was Eurytomidae (224 adults, 45.90 %), followed by *L. hyalinus* (190 adults, 38.93 %), Synergini (15 adults, 3.07 %), Eulophidae (33 adults, 6.76 %), Pteromalidae (12 adults, 2.46 %), Ormyridae (nine adults, 1.84 %), Torymidae (four adults, 0.82 %) and Eupelmidae (one adult, 0.20 %).

The genera of chalcidoid parasitoids in the branch galls of *L. hyalinus* were: *Eurytoma* and *Sycophila* (Eurytomidae), *Ormyrus* (Ormyridae), *Torymus* (Torymidae), *Eupelmus* (Eupelmidae), *Pteromalus* (Pteromalidae) and Eulophidae. The emergence of Encyrtidae and Platygasteridae, which may not be associated with *L. hyalinus* and its natural enemies, was also recorded. The most diverse parasitoids are *Eurytoma* and the families Pteromalidae and Eulophidae, which have multiple morphospecies. The remaining genera are less diverse, with at least one morphospecies.

In the years studied, a great diversity of natural enemies could be recognized, whose natural control effect on *L. hyalinus* could be significant, as suggested by the decrease in the number of galls, although there is no conclusive information on the cause of this reduction.

In 2019 and 2020, high presence of *L. hyalinus* galls was recorded on the young branches of some individuals of *Q. laeta*. In 2021, a reduction of branch galls was observed, probably because of natural enemies or other environmental impacts in previous years, although the higher presence of *L. hyalinus* in that year could indicate that the populations of the inducer, inquiline and parasitoids interact irregularly.

In the dissection of galls collected from January through the second week of April 2020 and 2021, immature stages of the inducer, inquilines, and parasitoids were found. In January 2022, in addition to L1 larvae of *L. hyalinus* in chambers with characteristics similar to those of the inducer, last instar cynipid larvae were found with mandibles with three teeth (the largest apical), similar to the larvae of *S. filicornis* described by Tormos et al. (2014).

finales de enero a marzo y otro que coincide con la emergencia del inductor de la agalla. En febrero del 2022, durante el estado larval de *L. hyalinus*, se observó la emergencia de *Synergus pseudofilicornis* Lobato-Vila y Pujade-Villar 2018 (previamente denominada *Synergus filicornis* Cameron, 1883), y de abril a mayo (periodo de emergencia de *L. hyalinus*) del 2020 y 2021, de *Synergus grahami* Lobato-Vila y Pujade-Villar, 2019. También se ha reportado a *Synergus macrackenae* Lobato-Vila & Pujade-Villar, 2021 (Lobato-Vila & Pujade-Villar, 2021) y a *S. filicornis* en agallas de rama de *Loxaulus* (Lobato-Vila et al., 2020). Debido a que solo se evaluó de manera detallada el periodo de emergencia de *L. hyalinus*, se puede esperar que el efecto en la mortalidad sea mayor al observado, ya que se trata de inquilinos letales.

En una recolecta del 26 de abril del 2019, en dos agallas se obtuvieron 279 adultos de especies distintas. La emergencia se registró del 28 de abril al 12 de mayo. Los individuos correspondieron a *Eurytoma* (135 adultos, 48.49 %), *L. hyalinus* (117 adultos, 41.93 %), *Synergus* (12 adultos, 4.30 %), *Sycophila* (nueve adultos, 3.22 %), *Ormyrus* (uno adulto, 0.36 %), Pteromalidae (tres adultos, 1.07 %) y Eulophidae (dos adultos, 0.72 %).

Del 8 de abril al 18 de junio del 2020, en 30 agallas emergieron 652 adultos de especies diferentes, el mayor número de estos entre el 10 y 27 de mayo. El grupo más numeroso fue Eurytomidae (337 adultos, 51.69 %), seguido de Pteromalidae y Eulophidae (147 adultos en conjunto, 22.55 %), *L. hyalinus* (90 adultos, 13.80 %), Synergini (66 adultos, 10.12 %), Ormyridae (10 adultos, 1.53 %) y Eupelmidae (dos adultos, 0.31 %).

Entre el 20 de abril y el 17 de mayo del 2021, de 27 agallas emergieron 488 adultos; de estos, el grupo de insectos más numeroso fue Eurytomidae (224 adultos, 45.90 %), seguido de *L. hyalinus* (190 adultos, 38.93 %), Synergini (15 adultos, 3.07 %), Eulophidae (33 adultos, 6.76 %), Pteromalidae (12 adultos, 2.46 %), Ormyridae (9 adultos, 1.84 %), Torymidae (cuatro adultos, 0.82 %) y Eupelmidae (un adulto, 0.20 %).

Los géneros de parasitoides calcidoideos presentes en las agallas de rama de *L. hyalinus* fueron: *Eurytoma* y *Sycophila* (Eurytomidae), *Ormyrus* (Ormyridae), *Torymus* (Torymidae), *Eupelmus* (Eupelmidae), *Pteromalus* (Pteromalidae) y Eulophidae. También se registró la emergencia de Encyrtidae y Platygasteridae, los cuales pueden no estar asociados a *L. hyalinus* y a sus enemigos naturales. Los parasitoides más diversos son *Eurytoma* y las familias Pteromalidae y Eulophidae, los cuales cuentan con múltiples morfoespecies. Los géneros restantes tienen menor diversidad, contando con al menos una morfoespecie.

Conclusions

This research allowed us to know the characteristics of the galls of *Loxaulus hyalinus* and its role as an inducer of twig galls that affect growth, structure and appearance of *Quercus laeta*, but without causing its death. There is a great diversity and number of chalcidoid parasitoids and cynipid inquiline associated to *L. hyalinus*, the most numerous are *Eurytoma* and *Synergus*, although the magnitude of the effect of these organisms on the population of the galler is unknown. Even though asexual generation of *L. hyalinus* was not found, it is possible that it is present.

Acknowledgments

We would like to thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for the scholarship granted to Uriel M. Barrera Ruiz; the Colegio de Postgraduados for providing funding for the doctoral thesis from which this research is derived; and the employees of the Departamento de Áreas Verdes y Forestales of the Asociación de Colonos del Fraccionamiento Habitacional Bosques de Santa Fe, for their support and facilities for the field research.

End of English version

References / Referencias

- Blaydes, G. W. (1939). The use of Bismarck Brown Y in some new stain schedules. *Stain Technology*, 14(3), 105–110. <https://doi.org/10.3109/10520293909110309>
- Cuesta-Porta, V., Barrera-Ruiz, U. M., Cibrián-Tovar, D., & Pujade-Villar, J. (2022). Discovery of the male of *Loxaulus hyalinus*, and implications for the sympatric species *Loxaulus laeta* (Hymenoptera: Cynipidae: Cynipini): an integrative taxonomical case of species delimitation. *Journal of Natural History*, 56(5-8), 397–413. <https://doi.org/10.1080/00222933.2022.2077150>
- Garrido-Fariña, G. I., Cornejo-Cortés, M. Á., & López-Pérez, V. M. (2021). *Colorantes para laboratorios de ciencias básicas*. Ediciones Cuautitlán.
- Gibson, G. A. P., Huber, J. T., & Woolley, J. B. (1997). *Annotated key to the genera of Nearctic Chalcidoidea (Hymenoptera)*. NRC-CNRC.
- Harris, M. O., & Pitzschke, A. (2020). Plants make galls to accommodate foreigners: some are friends, most are foes. *New Phytologist*, 225(5), 1852–1872. <https://doi.org/10.1111/nph.16340>
- Hernández-Soto, P., Lara-Flores, M., Agredano-Moreno, L., Jiménez-García, L. F., Cuevas-Reyes, P., & Oyama, K. (2015). Developmental morphology of bud galls induced on the vegetative meristems of *Quercus castanea* by *Amphibolips michoacaensis* (Hymenoptera: Cynipidae). *Botanical Sciences*, 93(4), 685–693. <https://doi.org/10.17129/botsoci.607>

En los años estudiados se pudo reconocer gran diversidad de enemigos naturales, cuyo efecto de control natural sobre *L. hyalinus* podría ser significativo, como lo sugiere la disminución en la cantidad de agallas, aunque no se cuenta con información concluyente sobre la causa de dicha reducción.

En 2019 y 2020, en las ramas jóvenes de algunos individuos de *Q. laeta* se registró presencia alta de agallas de *L. hyalinus*. En 2021 se observó reducción de agallas de rama, presumiblemente por el efecto de los enemigos naturales u otros impactos del ambiente en años anteriores, aunque la mayor presencia de *L. hyalinus* en ese año podría indicar que las poblaciones del inductor, de inquilinos y de parasitoides interactúan irregularmente.

En la disección de las agallas colectadas desde enero hasta la segunda semana de abril de 2020 y 2021 se encontraron estados inmaduros del inductor, inquilinos y parasitoides. En enero del 2022, además de las larvas L1 de *L. hyalinus* en cámaras con características similares a las del inductor, se encontraron larvas de cinípido de último instar con mandíbulas con tres dientes (el apical de mayor tamaño), similares a la larva de *S. filicornis* descrita por Tormos et al. (2014).

Conclusiones

Este trabajo permitió conocer las características de las agallas de *Loxaulus hyalinus* y su papel como inductor de agallas de ramilla que afectan el crecimiento, estructura y apariencia de *Quercus laeta*, aunque sin causar su muerte. Hay gran diversidad y cantidad de parasitoides calcidoideos y cinípidos inquilinos asociados a *L. hyalinus*, siendo *Eurytoma* y *Sinergus* los más numerosos, aunque se desconoce la magnitud de su efecto en la población de este agallador. Aun cuando no se encontró la generación asexual de *L. hyalinus* es posible que sí esté presente.

Agradecimientos

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de manutención otorgada a Uriel M. Barrera Ruiz; al Colegio de Postgraduados por el financiamiento a la tesis de doctorado de la cual se deriva el presente trabajo; y al personal del Departamento de Áreas Verdes y Forestales de la Asociación de Colonos del Fraccionamiento Habitacional Bosques de Santa Fe por el apoyo y las facilidades para la realización de los trabajos en campo.

Fin de la versión en español

- Hood, G. R., & Ott, J. R. (2011). Generational shape shifting: changes in egg shape and size between sexual and asexual generations of a cyclically parthenogenic gall former. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 141(1), 88 – 96. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2011.01169.x>
- Lobato-Vila, I., Cibrián-Tovar, D., Barrera-Ruiz, U. M., Equihua-Martínez, A., Estrada-Venegas, E. G., Buffington, M. L., & Pujade-Villar, J. (2019). Review of the *Synergus* Hartig species (Hymenoptera: Cynipidae: Synergini) associated with tuberous and other tumor-like galls on oaks from the New World with the description of three new species from Mexico. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 121(2), 193 – 255. <https://doi.org/10.4289/0013-8797.121.2.193>
- Lobato-Vila, I., Cibrián-Tovar, D., Barrera-Ruiz, U. M., Equihua-Martínez, A., Estrada-Venegas, E. G., Tovar-Sánchez, E., Castillo-Mendoza, E., Buffington, M. L., & Pujade-Villar, J. (2020). Review of the *Synergus* Hartig species (Hymenoptera: Cynipidae: Synergini) associated with woolly galls on oaks from the New World, with the description of a new species from Mexico. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 122(3), 678 – 715. <https://doi.org/10.4289/0013-8797.122.3.678>
- Lobato-Vila, I., & Pujade-Villar, J. (2017). Description of five new species of inquiline oak gall wasps of the genus *Synergus* Hartig (Hymenoptera, Cynipidae: Synergini) with partially smooth mesopleurae from Mexico. *Zoological Studies*, 56, e36. <https://doi.org/10.6620/ZS.2017.56-36>
- Lobato-Vila, I., & Pujade-Villar, J. (2018). Estado actual del conocimiento de la diversidad de inquilinos de agallas de cinípidos en encinos de México (Hymenoptera: Cynipidae). *Entomología Forestal*, 5, 435 – 443. https://www.researchgate.net/profile/Irene-Lobato-Vila/publication/325903717_Current_knowledge_on_inquiline_oak_gall_wasp_diversity_from_Mexico_Hymenoptera_Cynipidae/links/5b2babe90f7e9b0df5b47453/Current-knowledge-on-inquiline-oak-gall-wasp-diversity-from-Mexico-Hymenoptera-Cynipidae.pdf
- Lobato-Vila, I., & Pujade-Villar, J. (2021). The genus *Synergus* Hartig (Hymenoptera: Cynipidae: Synergini) in the New World: a complete taxonomic revision with a key to species. *Zootaxa*, 4906(1), 1 – 121. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4906.1.1>
- Medianero, E., Nieves-Aldrey, J.-L., & Melika, G. (2011). Two new Neotropical species of oak gall wasps of the genus *Loxaulus* Mayr (Hymenoptera: Cynipidae: Cynipini) from Panama. *Zootaxa*, 2811(1), 37 – 46. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.2811.1.3>
- Melika, G., & Abrahamson, W. G. (2000). Review of the cynipid gall wasps of the genus *Loxaulus* Mayr (Hymenoptera: Cynipidae) with descriptions of new species. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 102(1), 198 – 211. <https://doi.org/10.5281/zenodo.27206>
- Melika, G. (2006). Gall wasp of Ukraine: Cynipidae. *Vestnik Zoologički*, 1(21), 492. <http://mail.izan.kiev.ua/vz-pdf/suppl/Supplement%202006-21-1.pdf>
- Melika, G., Nicholls, J. A., Abrahamson, W. G., Buss, E. A., & Stone, G. N. (2021). New species of Nearctic oak gall wasps (Hymenoptera: Cynipidae, Cynipini). *Zootaxa*, 5084(1), 23. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.5084.1.1>
- Nieves-Aldrey, J.-L., Vårdal, H., & Ronquist, F. (2005). Comparative morphology of terminal-instar larvae of Cynipoidea: phylogenetic implications. *Zoologica Scripta*, 34(1), 15 – 36. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6409.2005.00175.x>
- Pujade-Villar, J., Cibrián-Tovar, D., Equihua-Martínez, A., Estrada-Venegas, E. G., Barrera-Ruiz, U. M., & Melika, G. (2014). First record of *Loxaulus* Mayr from Mexico, with descriptions of two new species (Hymenoptera: Cynipidae, Cynipini). *Southwestern Entomologist*, 39(2), 343 – 354. <http://doi.org/10.3958/059.039.0212>
- Sanver, D., & Hawkins, B. A. (2000). Galls as habitats: the inquiline communities of insect galls. *Basic and Applied Ecology*, 1(1), 3 – 11. <https://doi.org/10.1078/1439-1791-00001>
- StatSoft, Inc. (2007). STATISTICA (data analysis software system) (version 8.0). <https://www.tibco.com/data-science-and-streaming>
- Stone, G. N., & Schönrogge, K. (2003). The adaptive significance of insect gall morphology. *Trends in Ecology and Evolution*, 18(10), 512 – 522. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00247-7](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00247-7)
- Todorov, I., Stojanova, A., Zlatkov, B., Hristov, G., & Melika, G. (2019). New data on the parasitoid-inquiline community of *Andricus quercustozae* (Bosc, 1792) (Hymenoptera: Cynipidae) in Bulgaria. *Acta Zoologica Bulgarica*, 71(2), 301 – 303. https://www.researchgate.net/publication/335828247_New_Data_on_the_Parasitoid-Inquiline_Community_of_Andricus_quercustozae_Bosc_1792_Hymenoptera_Cynipidae_in_Bulgaria
- Tooker, J. F., Rohr, J. R., Abrahamson, W. G., & De Moraes, C. M. (2008). Gall insects can avoid and alter indirect plant defenses. *New Phytologist*, 178(3), 657 – 671. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02392.x>
- Tormos, J., Asís, J. D., Cibrián-Tovar, D., Cibrián-Llenderal, V. D., Barrera-Ruiz, U. M., Melika, G., & Pujade-Villar, J. (2014). Description of the immature larva of *Synergus filicornis* (Hymenoptera: Cynipidae: Synergini), with notes on the immature larvae. *Florida Entomologist*, 97(2), 540 – 548. <https://doi.org/10.1653/024.097.0227>
- Vårdal, H., Sahlén, G., & Ronquist, F. (2003). Morphology and evolution of the cynipoid egg (Hymenoptera). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 139(2), 247 – 260. <https://doi.org/10.1046/j.1096-3642.2003.00071.x>

