

ARTICULO CIENTÍFICO

El sistema tritrófico de la agalla ambrosía de *Neolasioptera tridentifera* (Diptera: Cecidomyiidae) en *Heliotropium curassavicum* (Boraginales: Heliotropiaceae): aspectos fúngicos, del inductor y de la agalla

Corró Molas, Bárbara Mariana^{1,2} , Cornejo, Laura Gabriela¹ , Martínez, Juan José^{1,2} , Mc Cargo, Patricia Débora^{3,4}  y Ceriani-Nakamurakare, Esteban³ 

1 Universidad Nacional de La Pampa, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. La Pampa, Argentina.

2 Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Argentina.

3 Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Instituto de Micología y Botánica. Buenos Aires, Argentina.

4 Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Laboratorio de Micología. Buenos Aires, Argentina.

bncorromolas@gmail.com

Recibido: 12/03/2025

Aceptado: 24/07/2025

Resumen. El díptero cecidómido *Neolasioptera tridentifera* Kieffer & Jörgensen, (Cecidomyiinae: Alycaulinii) desarrolla agallas en los tallos de heliotropo *Heliotropium curassavicum* L. (Boraginales: Heliotropiaceae). En inspecciones a campo, se encontró micelio fúngico junto con el inductor en el interior de la cámara larval de las agallas. En este trabajo se examinan los aspectos morfológicos de la agalla madura, la estrategia de vida del inductor y se realiza un primer acercamiento a la identificación del micelio. El estudio se llevó a cabo sobre agallas colectadas en la Laguna Don Tomás, Santa Rosa, La Pampa. Mediante preparados microscópicos se examinó la anatomía de la agalla. En cada estación anual, se realizaron inspecciones a campo de las plantas y se realizó la disección de agallas para investigar la estrategia de vida. El estudio del micelio fúngico fue realizado sobre muestras extraídas del interior de la agalla. La agalla caulinar es tipo fusiforme y globoide, en general, unilateral, la cámara larval a modo de túnel se desarrolla en la médula parenquimática, y la pared de la cámara está tapizada por micelio fúngico. El hongo más abundante obtenido es una especie del género *Botryosphaeria* (Dothideomycetes: Ascomycota). En el área de estudio, las partes aéreas de las plantas de heliotropo mueren con las heladas y las agallas permanecen sujetas a la planta, sobre la superficie del suelo y semienterradas, con la larva III en su interior. Acorde a esto, la estrategia de vida del inductor es tipo IB. En este trabajo, se constata por primera vez que *Neolasioptera tridentifera* induce agallas ambrosía en *Heliotropium curassavicum* y se registra la presencia de una comunidad fúngica asociada, siendo una especie del género *Botryosphaeria* la de mayor frecuencia.

Palabras clave: heliotropo; agalla entomógena; estrategia de vida; hongos; *Botryosphaeria*.

Abstract. The tritrophic system of the ambrosia gall of *Neolasioptera tridentifera* (Diptera: Cecidomyiidae) on *Heliotropium curassavicum* (Boraginales: Heliotropiaceae): fungal, inducer and gall aspects. The cecidomyiid dipteran *Neolasioptera tridentifera* Kieffer & Jörgensen (Cecidomyiinae: Alycaulinii) develops galls on the stems of heliotrope *Heliotropium curassavicum* L. (Boraginales: Heliotropiaceae). In field inspections, fungal mycelium was found together with the inducer inside the larval chamber of the galls. In this work, the morphological aspects of mature gall, the inducer's life strategy, and a first approach to the identification of mycelium are examined. The study was conducted on galls collected in Laguna Don Tomás, Santa Rosa, La Pampa. The anatomy of the gall was examined using microscopic preparations. In each season of the year, field inspections of the plants were carried out and gall dissections were carried out to investigate the life strategy. The study of the fungal mycelium was performed on samples extracted from the interior of the gall. The stem gall is fusiform and globoid, generally unilateral; the tunnel-like larval chamber develops in the parenchymal medulla, and the wall of the chamber is lined with fungal mycelium. The most abundant fungus obtained is a species of the genus *Botryosphaeria* (Dothideomycetes: Ascomycota). In the study area, the aerial parts of heliotrope plants die with frost and the galls remain attached to the plant, above the soil surface and half-buried, with third-instar larva inside. According to this, the inducer's life strategy is type IB. In this work, it is reported for the first time that *Neolasioptera tridentifera* induces an ambrosia gall on *Heliotropium curassavicum*, and the presence of an associated fungal community is recorded, with a species of the genus *Botryosphaeria* being the most frequent.

Key words: heliotropo; insect gall; life strategy; fungi; *Botryosphaeria*.

Cómo citar este trabajo:

Corró Molas, B. M., Cornejo, L. G., Martínez, J. J., Mc Cargo, P. D. y Ceriani-Nakamurakare, E. (2026). El sistema tritrófico de la agalla ambrosía de *Neolasioptera tridentifera* (Diptera: Cecidomyiidae) en *Heliotropium curassavicum* (Boraginales: Heliotropiaceae): aspectos fúngicos, del inductor y de la agalla. *Semiárida*, 36(1), 5-17.

INTRODUCCIÓN

En 1910, Kieffer & Jörgensen examinaron agallas en los tallos de plantas de heliotropo de la Argentina, *Heliotropium curassavicum* L. (Boraginales: Heliotropiaceae). Los autores describieron la larva, pupa y adulto hembra de la

especie inductora, *Lasioptera tridentifera* Kieffer & Jorgensen, actualmente *Neolasioptera tridentifera* Kieffer & Jorgensen, perteneciente a subfamilia Cecidomyiinae (Diptera: Cecidomyiidae) (Gagné & Jaschhof, 2021).

Cecidomyiinae es la subfamilia con mayor número de especies y mayor diversidad en los modos de alimentación. Aproximadamente el 75 % de las especies son herbívoras, el resto son zoófagas predadoras y fungívoras (Dorchin et al., 2019; Gagné & Jaschhof, 2021; Roskam, 1992). Entre las especies galígenas, la mayoría son herbívoras y algunas son fito-micetófagas alimentándose de células de la planta y del micelio fúngico que mantienen vivo en el interior de la agalla (Careddu et al., 2022; Gagné & Jaschhof, 2021; Pyszko et al., 2024; Roskam, 1992). Esta asociación simbiótica con tres componentes, la planta hospedadora, el insecto galígeno y la comunidad fúngica asociada, se denomina “agalla ambrosía”. En particular, la interacción entre el insecto y los organismos fúngicos es considerada como una simbiosis obligatoria (Dorchin et al., 2019). Tres tribus de Cecidomyiinae contienen especies que inducen agallas ambrosía, Asphondyliini con especies cosmopolitas, Lasiopterini con especies del Viejo Mundo y de América del Norte, y Alycaulini restringida al continente americano (Dorchin et al., 2019; Gagné & Jaschhof, 2021; Yukawa & Rohfritsch, 2005). En Alycaulini, *Neolasioptera* Felt es el género con mayor número de especies, 136, reportándose siete de ellas en la Argentina (Gagné & Jaschhof, 2021). En la bibliografía, los primeros trabajos con descripciones de las especies de *Neolasioptera* presentes en la Argentina y sus agallas corresponden a Kieffer & Jörgensen (1910), Jörgensen (1916, 1917) y Brèthes (1922). Los trabajos más recientes son de Mc Kay et al. (2014) y Kuzmanich et al. (2015, 2018) sobre *N. aeschynomensis* Brèthes, *N. argentata* Brèthes y *N. aculeata* Gagné, todas especies inductoras de agallas en tallos. En referencia a *N. tridentifera*, los únicos registros son los mencionados anteriormente, los de Kieffer & Jörgensen (1910) y Jörgensen (1917) para las provincias de Mendoza (La Paz) y San Juan (Caucete). Dichos autores no indicaron la presencia de micelio en la agalla, señalando únicamente la presencia de varias agallas por planta, por tallo y describieron a las agallas como fusiformes, de 5 a 8 mm de largo y de 2 a 3 mm de ancho, con una cámara en el interior y un orificio de emergencia del adulto.

El desarrollo de cecidómidos involucra el huevo, tres estadios larvales (I, II y III), la pupa y el adulto, identificándose cuatro tipos principales de estrategias de vida en base a cómo y dónde el inductor sobrevive el invierno (Yukawa & Rohfritsch, 2005; Yukawa & Uechi, 2021). Asimismo, la estrategia de vida está relacionada con la fenología del hospedador, el órgano agallado y el número de generaciones del inductor por año (Yukawa & Rohfritsch, 2005). La información sobre estos aspectos biológicos de las especies argentinas de *Neolasioptera* es limitada. Para *N. tridentifera* se observó la emergencia masiva de los adultos en el verano, a fines de diciembre y enero (Jörgensen, 1917; Kieffer & Jörgensen, 1910) y para *N. aculeata*, la emergencia ocurrió en varios momentos del año (Mc Kay et al., 2014).

Los morfotipos y la estructura de las agallas entomógenas exhiben una amplia diversidad, sin embargo, las agallas de cecidómidos tienen en común el desarrollo de un tejido especializado y característico, el tejido nutritivo, que cumple el rol de proveer alimento para el desarrollo larval del insecto inductor (Bronner, 1992; Dreger-Jaufret & Shorthouse, 1992; Isaías et al., 2013; Isaías et al., 2024; Rohfritsch, 1992). En las agallas ambrosía, el micelio fúngico simbionte se desarrolla sobre la pared interna de la cámara larval y está en contacto con la larva (Bronner, 1992; Heath & Stireman III, 2010; Yukawa & Rohfritsch, 2005). Existen trabajos anatómicos detallados sobre las agallas ambrosía inducidas principalmente por especies de las tribus Asphondyliini y Lasiopterini (Arduin & Kraus, 2001; Chao & Liao, 2013; Popescu & Gostin, 2024; Rohfritsch, 2008; Sá et al., 2009; Skuhrová & Skuhrový, 1992). Sin embargo, son casi inexistentes los estudios anatómicos de agallas de especies de *Neolasioptera*. Recientemente, Jorge et al. (2022) investigaron los caracteres anatómicos de la agalla inducida por una especie no identificada de *Neolasioptera* sobre los tallos de *Eremanthus erythropappus* N. F. F. Mac Leish (DC.) (Asteraceae), una agalla globoide, leñosa y sin asociación con hongos simbiontes.

La identificación del hongo simbionte en las agallas ambrosía en general se realiza a partir de hifas obtenidas del interior de la agalla, antes de la emergencia de adultos y, de la inspección de los micangios de las hembras adultas, de la superficie de los huevos después de la oviposición y de la superficie de las larvas. Los hongos obtenidos de los micangios y del interior de las agallas ambrosía de Cecidomyiinae corresponden a Ascomycota, registrándose una o varias especies fúngicas en la cámara larval (Bernardo et al., 2021; Borkent & Bisset, 1985; Heath & Stireman III, 2010; Pyszko et al., 2024; Rohfritsch, 2008; Yukawa & Rohfritsch, 2005).

Recientes hallazgos resaltan la importancia de *Heliotropium curassavicum* L. como una fuente natural de metabolitos secundarios y compuestos químicos bioactivos con propiedades antimicrobianas y antidiabéticas (Akbar et al., 2023). Los usos tradicionales de esta especie incluyen tratamientos para heridas de corte, úlceras, gonorrea y cáncer entre otras afecciones (Katalinic et al., 2006). El heliotropo es una hierba perenne, suculenta, postrada decumbente o procumbente, halófila, común en suelos salitrosos. Es nativa de América y tiene una amplia distribución en la Argentina (Di Fulvio y Espinar, 2016). En particular sobre *H. curassavicum*, hay estudios anatómicos con el objetivo de caracterizar los rasgos adaptativos al ambiente del salitral (Pérez Cuadra y Cambi, 2014). En la bibliografía, encontramos estudios sobre otras especies de *Heliotropium* L. focalizados en los caracteres anatómicos con valor taxonómico y ecológico (Kandemir et al., 2020; Kasem, 2015) y con valor diagnóstico en el caso de especies utilizadas en medicina popular (Al-Hadeethi et al., 2018; Monti et al., 2003).

En la Laguna Don Tomás, ciudad de Santa Rosa, provincia de La Pampa, en inspecciones a campo se colectaron agallas caulinares maduras de *N. tridentifera* de plantas de heliotropo y se observó la presencia de micelio fúngico en la cámara larval. A partir de esas observaciones, en este trabajo se propone describir los rasgos morfológicos y anatómicos de la agalla madura en heliotropo, caracterizar la disposición del micelio fúngico en la cámara larval, llevar a cabo una primera aproximación a su identificación, y aportar información sobre la estrategia de vida de *N. tridentifera*.

METODOLOGÍA

El trabajo fue realizado en la Laguna Don Tomás, Santa Rosa La Pampa ($36^{\circ}37'0,7''$ S, $64^{\circ}19'18''$ O), en un área perlagunar con vegetación halófila. En esta zona las estaciones del año son bien marcadas, la amplitud térmica es alta, ocurren heladas, la temperatura media anual varía entre 14°C y 16°C , la máxima y mínima anual media son $23,6^{\circ}\text{C}$ y 7°C respectivamente, las temperaturas máximas absolutas pueden alcanzar $44,0^{\circ}\text{C}$ y las mínimas absolutas pueden ser hasta -13°C (Cano, 2004; Casagrande et al., 2006; Méndez et al. 2021). El clima es subhúmedo seco y las lluvias están concentradas en los meses estivales, siendo la precipitación media anual para el período 1980-2018 de 705,4 mm (Méndez et al., 2021).

En el área de estudio se inspeccionaron mensualmente plantas de *H. curassavicum* y agallas durante el año 2023. Para identificar la estrategia de vida del inductor y conocer el estado de desarrollo del inductor al inicio y final de la temporada invernal se colectaron y abrieron 41 agallas en otoño (25 a mediados y 16 a fin del otoño, una vez ocurridas las primeras heladas) y 37 agallas en primavera (16 a mediados y 21 a fines de la primavera). La disección de las agallas se realizó bajo un microscopio estereoscópico y se registró el contenido de la agalla y la coloración del micelio.

Anatómicamente se estudiaron agallas maduras con la larva III considerando que en esta etapa la agalla posee los tejidos agallados diferenciados y el micelio desarrollado. Se procesaron 20 agallas maduras (16 de otoño y 4 de primavera) sobre los tallos vegetativos. Las agallas colectadas en invierno (N=16) no fueron analizadas anatómicamente porque los tejidos estaban necróticos a causa de las heladas. Se realizaron preparados temporales a partir de cortes a mano alzada transversales y longitudinales de los tallos con agalla madura y sin agalla. La epidermis se obtuvo mediante la técnica *peeling* (D'Ambrogio de Argüeso, 1986). Se utilizaron los colorantes safranina

y azul de toluidina, y los reactivos lugol para detectar almidón y floroglucina ácida para detectar lignina. En el laboratorio de Sistemática y Biología Reproductiva de Plantas Vasculares (Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental) se realizaron preparados permanentes de cortes longitudinales obtenidos con micrótomo de una agalla con larva III colectada en primavera. La agalla fue fijada en FAA (alcohol 96° - agua destilada - formol - ácido acético glacial en proporción 10:7:2:1), incluida en parafina según la técnica convencional de pasajes de alcoholes etílicos ascendentes, cortada con micrótomo tipo rotativo Leica RM 2125 RTS, las secciones fueron desparafinadas con xileno y teñidas con safranina-*fast green* (D'Ambrogio de Argüeso, 1986).

Los instrumentos ópticos utilizados fueron un microscopio estereoscópico Motic SMZ 168 TL y un microscopio óptico LabKlass XSZ-146 AT con filtro azul. Las fotografías microscópicas fueron obtenidas con cámara digital Sony 20,4 MP adosada a los instrumentos ópticos.

Para el estudio preliminar de la comunidad fúngica se adaptó el protocolo empleado por Ceriani-Nakamurakare et al. (2016). Brevemente, se tomaron dieciséis fragmentos con muestras del micelio que recubría el interior de cuatro agallas colectadas en primavera, trabajando en condiciones de esterilidad. Se esterilizaron superficialmente dos veces con aspersiones con alcohol 70 %. Las muestras fueron divididas a la mitad, del interior se obtuvo inóculo suficiente que fue sembrado en dos medios de cultivo diferentes, Agar Extracto de Malta (AEM) y Agar Papa Glucosado (APG). Los cultivos fueron incubados a 24 °C en oscuridad y revisados periódicamente realizando los repiques necesarios para obtener cultivos axénicos, los cuales son mantenidos en tubos pico de flauta con AEM a 4 °C en el cepario del Centro de Recursos Genéticos perteneciente a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Los aislamientos obtenidos fueron agrupados en tres morfotipos de acuerdo con sus parámetros macro y micro morfológicos. Posteriormente, se seleccionó al azar, una cepa del morfotipo más abundante, al cual se le extrajo ADN genómico con el kit DNeasy UltraClean Microbial MoBio (Qiagen) para su análisis molecular. Para tal fin, se amplificó por PCR (reacción en cadena de la Taq polimerasa) la región nuclear ITS (Internal Transcribed Spacer) catalogado como el “barcode” fúngico universal, utilizando los cebadores ITS1 e ITS4 4 (White et al., 1990) y las condiciones de ciclado según Ceriani-Nakamurakare et al. (2016). El servicio de secuenciación del producto de PCR fue realizado por Macrogen, Inc. Las secuencias obtenidas fueron comparadas mediante BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) con secuencias de especies tipo en la base de datos NCBI y se registraron aquellas con la mayor similitud.

RESULTADOS

En el área de estudio, las plantas de heliotropo eran bajas, muy ramificadas, postradas, con los tallos decumbentes y las inflorescencias escorpioides en los extremos terminales de las ramificaciones (Figura 1 A-D). Las agallas color verde de *N. tridentifera* fueron visibles en los tallos de las plantas durante los meses cálidos, desde la primavera hasta fin del otoño (Figura 1 A, C, D). En otoño las plantas de heliotropo estuvieron en floración y fructificación. Las agallas se desarrollaron en las ramificaciones principales y secundarias, y en los ejes de las inflorescencias las cuales llegan a fructificar. Aunque fue muy frecuente la presencia de varias agallas en una ramificación y en una planta, la mayoría de las agallas fueron solitarias, y algunas coalescentes. Las agallas solitarias fueron engrosamientos prominentes, alargados con un promedio igual a 7,13 mm de ancho máximo y 9,76 mm de longitud (N=9) y, globosos con 8,45 mm de ancho máximo y 8,47 de longitud en promedio (N=7). Las agallas solitarias fueron engrosamientos prominentes, 9 agallas fueron más largas que anchas adoptando una forma alargada (ancho máximo promedio=7,13 mm, longitud promedio=9,76 mm) y 7 agallas fueron tan anchas como largas mostrando una forma globosa (ancho máximo promedio=8,45 mm, longitud promedio= 8,47).

La disección de las agallas permitió observar la presencia y aspecto del micelio y del inductor. A mediados del otoño, en el interior de las agallas de los tallos vegetativos (N=25) predominaron

las larvas III, se encontraron las larvas I, II y III en una, tres y diecisésis agallas respectivamente y dos larvas de distintos estadios juntas (II y III) se encontraron en dos agallas. En tres agallas no se encontró al inductor, una de ellas contenía otro ocupante. A finales del otoño y comienzo del invierno la ocurrencia de heladas produjo la muerte de la parte aérea de las plantas. Los tallos vivos y perennes persistieron subterráneos y las agallas permanecieron sujetas a los restos aéreos muertos de las plantas, algunas sobre la superficie del suelo y otras semienterradas (Figura 1 B). De las 16 agallas invernantes examinadas, se encontró a la larva III en ocho y las ocho restantes estaban vacías. La coloración de estas agallas fue grisácea, estaban contraídas, secas y relativamente blandas (Figura 1 G, H). Las agallas mantuvieron esta apariencia durante el invierno. Al inicio de la primavera (los primeros días de octubre), las plantas brotaron y los tallos subterráneos desarrollaron ramificaciones plagiótropas creciendo por encima de las partes vegetales heladas y de las agallas invernantes (Figura 1 C). Las primeras agallas inducidas en esa primavera, con color verde y consistencia carnosa, se desarrollaron en los tallos vegetativos de estas ramificaciones (Figura 1 E). A mediados de la primavera (fines de octubre), las plantas florecieron y nuevas agallas fueron inducidas en los ejes de las inflorescencias. En estos momentos, en el interior de las agallas examinadas de los tallos vegetativos ($N=16$) predominaron las larvas II, se encontraron las larvas I, II y III en dos, seis y cuatro agallas respectivamente, pupa y exuvias en una y dos agallas respectivamente y una agalla estaba vacía. A fines de la primavera se examinaron 21 agallas, predominaron las agallas de las que habían emergido los adultos, las larvas II y III se encontraron en dos y una agalla respectivamente, pupa en una agalla y 14 agallas estaban vacías y con orificios de salida. El orificio de salida fue visible externamente sólo después de la emergencia del adulto (Figura 1 F). El desarrollo de las larvas y pupa del inductor ocurrió en el interior de la agalla cerrada, sin aberturas.

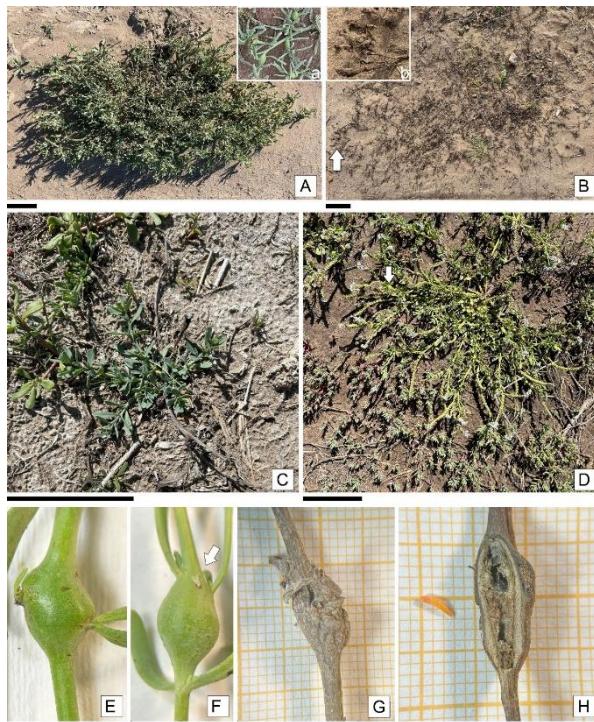


Figura 1. Aspecto general de la planta de *H. curassavicum* (A-D) y de la agalla (E-H) en otoño y primavera. A, B. Plantas en otoño, en A la planta está florécida y fructificada, a, detalle de las agallas, en B a finales del otoño, las agallas se observan sobre la superficie del suelo (flecha) y semienterradas, b, detalle de las agallas; C, D. Plantas en primavera, C principios de la primavera, las nuevas ramificaciones crecen por encima de los restos de las ramificaciones secas y de las agallas invernantes, en D la planta florecida y con agallas (flecha); E-F. Aspecto de las agallas verdes y carnosas, en E la agalla colectada en otoño está cerrada, no ha emergido el inductor, en F la agalla colectada en primavera tiene el orificio de salida por donde emergió el inductor, quedando la exuvia de la pupa (flecha); G-H. Agalla a fines del otoño, con consistencia seca, H en sección longitudinal, la larva III color naranja del inductor fue retirada de la agalla y se observa la cámara larval. Escalas: A-D = 10 cm, E-H = 1 cm.

Figure 1. General appearance of *H. curassavicum* (A-D) plant and gall (E-H) in autumn and spring. A, B. Plants in autumn, in A the plant is flowering and fruiting, a: detail of the galls, in B late autumn, the galls are observed on the surface of the soil (arrow) and half-buried, b: detail of the galls; C, D. Plants in spring, C early spring, new branches grow above the remains of dry branches and wintering galls, in D the flowering plant and with galls (arrow); E-F. Appearance of the green and fleshy galls, in E the gall collected in autumn is closed and the inducer has not yet emerged, in F the gall collected in spring has the exit hole through which the inducer emerged leaving the pupal exuvium (arrow); G-H. Gall in late autumn, with dry consistency, H in longitudinal section, the orange larva III of the inducer was removed from the gall and the larval chamber is observed. Scales: A-D = 10 cm, E-H = 1 cm.

En el interior de la agalla el micelio se encontró en contacto con la larva y tapizando la pared de la cámara larval (Figura 2 A-C). Su color varió entre blanco y negro. En las agallas que contenían larvas I, II y III, el color del micelio fue blanco y en otras agallas, con la larva III el micelio fue color negro (Figura 2 A y B). En este caso, se observó a la larva III alimentándose del micelio negro. En el corte longitudinal de la agalla con la larva III, se observaron hifas en el interior del tubo digestivo (Figura 2 C y D). Las larvas II y III fueron alargadas, delgadas, color naranja y muy móviles. De las 78 agallas examinadas, en cuatro agallas que no tenían al inductor, se encontró en el interior otros ocupantes. En cuanto a la micobiota, las agallas analizadas mostraron una comunidad fúngica con pocos taxones y con una frecuencia dominante de una especie del género *Botryosphaeria* Ces. & De Not. Estos resultados preliminares (datos no mostrados) constituyen la base para futuros estudios.

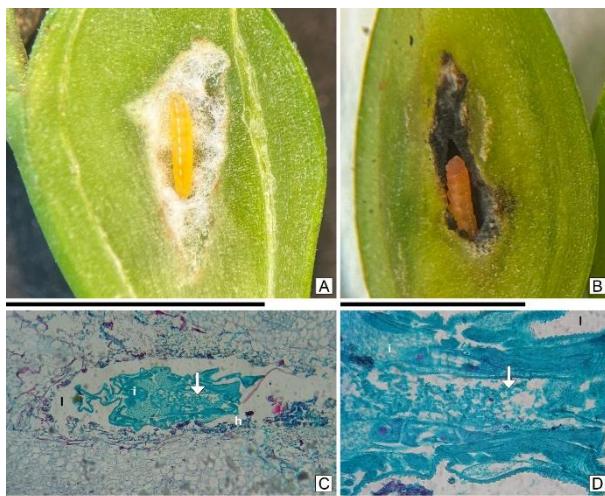


Figura 2. Larva de *Neolasioptera tridentifera* y micelio en agallas en corte longitudinal. A. Agalla con la larva II y el micelio blanco; B. Agalla con la larva III y el micelio negro; C-D. Cortes microscópicos, tinción: safranina-fast green; C. Larva en la cámara larval; D. Detalle del tubo digestivo de la larva. Referencias: h: micelio en la cámara larval, i: larva, l: cámara larval, flechas: hifas en el interior del tubo digestivo de la larva. Escalas: A, B = 5 mm, C, D = 100 µm.

Figure 2. *Neolasioptera tridentifera* larva and mycelium in galls in longitudinal section. A. Gall with larva II and white mycelium; B. Gall with larva III and black mycelium; C-D. Microscopic sections, staining: safranin-fast green, C. Larva in the larval chamber. D. Detail of the larva's digestive tract. References: h: mycelium in the larval chamber, i: larva, l: larval chamber, arrows: hyphae inside the larva's digestive tract. Scales: A, B = 5 mm, C, D = 100 µm.

El tallo sin agalla fue verde, con consistencia carnosa, sección circular en transcorte y con una hoja por nudo (Figura 3 A). La epidermis con cutícula fue uniestrata, presentó grandes litocistos proyectados en el clorénquima subepidérmico, cistolitos redondeados y estomas anomocíticos (Figura 3 B-D, Figura 4 A). En vista superficial, las células epidérmicas fueron rectangulares y poligonales, con contornos rectilíneos, en transcorte fueron cuadradas (Figura 3 C, D, Figura 4 A). En el transcorte, la corteza angosta y la médula amplia estaban claramente definidas por la disposición en anillo de los tejidos vasculares secundarios, que formaban un cilindro vascular continuo (Figura 3 A, B). La corteza presentó clorénquima subepidérmico (1-2 capas), colénquima lagunar (3-4 capas) y parénquima incoloro (3-4 capas) cuya capa más interna estaba formada por células con grandes amiloplastos a modo de una vaina amilífera (Figura 3 B-D, F). Los espacios intercelulares o meatos fueron observados en todos los tejidos corticales. Se observaron fibras perifloemáticas levemente positivas a la reacción con floroglucina ácida. En el xilema, la reacción con floroglucina ácida coloreó las tráqueas, fibras y parénquima (Figura 3 E). La safranina coloreó con rojo el xilema, y en particular con un rojo más oscuro al xilema primario. La médula parenquimática con meatos y amplia, estuvo formada con células grandes de contorno circular que poseían escasos cloroplastos.

En la porción del tallo agallado persistieron el color verde, la consistencia carnosa y la presencia de hojas. La larva se observó en el interior de una cavidad a modo de galería o túnel, la cámara larval, desarrollada en la médula del tallo agallado (Figura 5 A, B). La epidermis de la agalla mostró similitudes con la epidermis del tallo sin agalla, fue uniestrata, presentó cutícula delgada, estomas

anomocíticos y litocistos con cistolitos (Figura 5 C). Las células epidérmicas en vista superficial presentaron forma poligonal y contornos rectilíneos a levemente curvos (Figura 4 B). Se observó la corteza claramente definida, formada por clorénquima subepidérmico, parénquima colenquimatoso, un extenso parénquima incoloro y la vaina amilífera (Figura 5 A-D). Estos tejidos corticales presentaron meatos. Se observaron esclereidas y fibras perifloemáticas sin formar una capa y negativas o con leve reacción a la floroglucina ácida. Los tejidos vasculares formaron un anillo vascular con parénquima xilemático no lignificado (Figura 5 E).

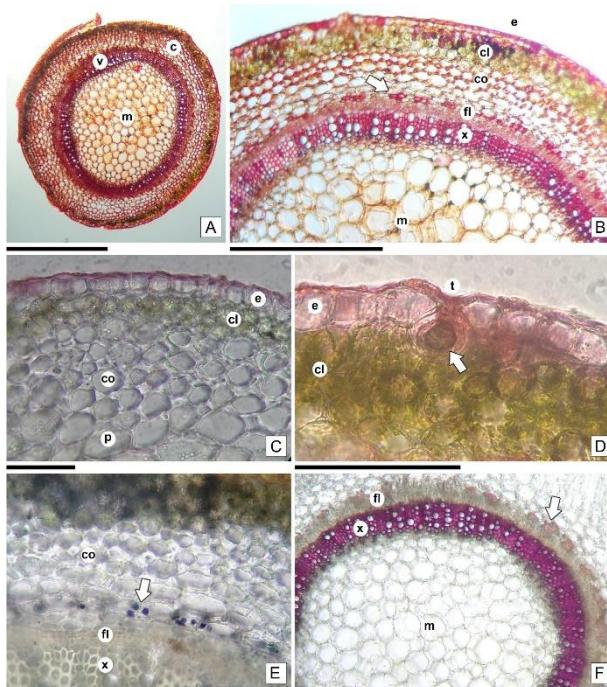


Figura 3. Anatomía del tallo sin agalla. A-F. Cortes transversales a mano alzada, tinción: safranina. A, B. Aspecto general, flecha: fibras perifloemáticas; C. Epidermis y tejidos subepidérmicos; D. Litocisto; E. Reacción con Lugol, flecha: vaina amilífera con amiloplastos; F. Reacción con floroglucina ácida, flecha: fibras perifloemáticas; Referencias: flecha: cistolito, c: corteza, cl: clorénquima, co: colenquima, e: epidermis, fl: floema, m: parénquima medular, p: parénquima incoloro, t: litocisto, v: tejidos vasculares, x: xilema. Barras: A = 1000 µm, B, F = 500 µm, C-E = 100 µm.

Figure 3. Anatomy of the stem without gall. A-F. Freehand cross-sections, staining: safranin. A, B. General appearance, arrow: perifloematic fibers; C. Epidermis and subepidermal tissues; D. Lithocyst; E. Reaction with Lugol, arrow: starch sheath with amyloplasts; F. Reaction with acid phloroglucinol, arrow: perifloematic fibers. References: arrow: cystolith, c: cortex, cl: chlorenchyma, co: collenchyma, e: epidermis, fl: phloem, m: medullary parenchyma, p: colorless parenchyma, s: stoma, t: lithocyst, v: vascular tissues, x: xylem. Scales: A = 1000 µm, B, F = 500 µm, C-E = 100 µm.

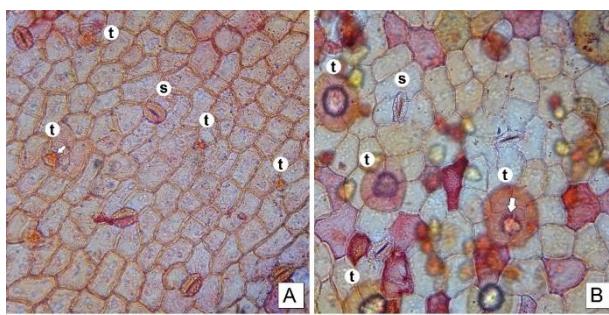


Figura 4. Epidermis en vista superficial. Tinción: safranina; A. Epidermis del tallo sin agalla, B. Epidermis de la agalla. Referencias: flecha: cistolito, s: estoma, t: litocisto. Barras = 100 µm.

Figure 4. Epidermis in superficial view. Staining: safranin. A. Epidermis of the stem without gall, B. Epidermis of the gall. References: arrow: cystolith, s: stoma, t: lithocyst. Scales = 100 µm.

A nivel del xilema primario se destacó el desarrollo de amplio parénquima separando las hileras de tráqueas (Figura 5 G). La médula parenquimática, muy amplia y con células de contorno poligonal, contenía la cámara larval (Figura 5 A, B). La pared de la cámara larval estuvo formada por células parenquimáticas, algunas colapsadas. El micelio formó un estrato laxo y tapizó la pared

parenquimática de la cámara larval, las hifas se extendieron hacia la cavidad de la cámara sin obliterarla (Figura 5 G, H).

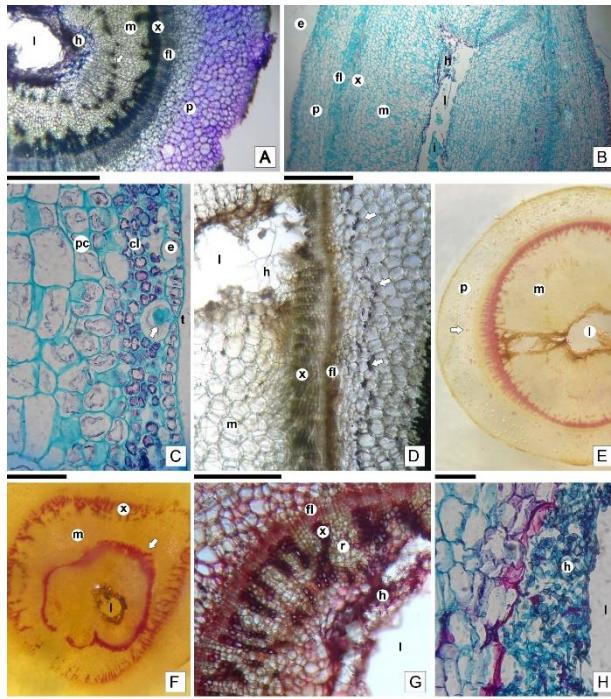


Figura 5. Anatomía de la agalla. A, D-F. Cortes transversales a mano alzada, tinción: azul de toluidina en (A) y safranina en (G). B, C, H. Cortes longitudinales con microtomo, tinción safranina-“fast green”. A, B. Aspecto general de la agalla; C. Epidermis y tejidos subepidérmicos, flecha: cistolito; D. Reacción con Lugol, flecha: vaina amilífera; E, F. Reacción con floroglucina ácida, flecha en E: esclerénquima perifloemático, flecha en F: tejidos vasculares adicionales neoformados en la médula; G. Detalle del anillo vascular; H. Detalle del micelio. Referencias: cl: clorénquima, e: epidermis, fl: floema, h: micelio, i: larva del inductor, l: cámara larval, m: parénquima medular, p: parénquima cortical, po: parénquima colenquimatoso, r: parénquima entre las hileras de tráqueas, s: estoma, t: litocisto, v: tejidos vasculares, x: xilema. Escalas: A, D, G = 500 μ m, B, E, F = 1000 μ m, C, H = 100 μ m.

Figure 5. Anatomy of the gall. A, D-F. Freehand cross-sections, staining: toluidine blue in (A) and safranin in (G). B, C, H. Longitudinal sections with microtome, safranin-fast green stain. A, B. General appearance of the gall; C. Epidermis and subepidermal tissues, arrow: cystolith; D. Reaction with Lugol, arrow starch sheath; E, F. Reaction with acid phloroglucinol, E-arrow: perifloematic sclerenchyma, F-arrow: additional vascular tissues neoformed in the pith; G. Detail of the vascular ring; H. Detail of the mycelium. References: cl: chlorenchyma, e: epidermis, fl: phloem; h: mycelium, i: inducer larva, l: larval chamber, m: medullary parenchyma, p: cortical parenchyma, po: collenchymatous parenchyma, r: parenchyma between tracheal rows, s: stoma, t: lithocyst, v: vascular tissues, x: xylem. Scales: A, D, G = 500 μ m, B, E, F = 1000 μ m, C, H = 100 μ m.

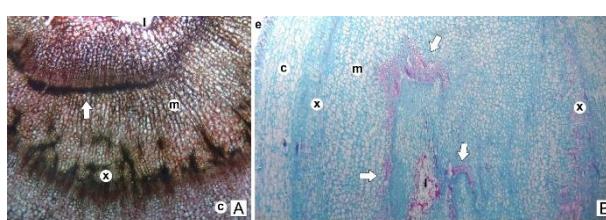


Figura 6. Tejidos vasculares en la agalla. A. Corte transversal, tinción: safranina. B. Corte longitudinal, tinción: safranina-“fast green”. Referencias: c: tejidos corticales, e: epidermis, l: cámara larval, m: médula, x: xilema del anillo vascular, flechas: tejidos vasculares adicionales neoformados en la médula y alrededor de la cámara larval. Escala = 1000 μ m.

Figure 6. Vascular tissues in the gall. A. Cross-section, staining: safranin. B. Longitudinal section, staining: safranin-fast green. References: c: cortical tissues, e: epidermis, l: larval chamber, m: medulla, x: xylem of the vascular ring, arrows: additional vascular tissues in the pith and around the larval chamber. Scale = 1000 μ m.

En la médula y alrededor de la cámara larval, se observaron tejidos vasculares adicionales, con desarrollo de elementos xilemáticos hacia la periferia y floema hacia la cámara larval (Figura 6 A, B). La reacción con floroglucina ácida coloreó el xilema del anillo vascular, particularmente los elementos traqueales, y el xilema neoformado en la médula (Figura 5 E, F).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

En este estudio, se constata por primera vez que *N. tridentifera* induce agallas ambrosía en *H. curassavicum* conforme ha sido propuesto para otras especies de Alycaulini (Dorchin et al., 2019). Actualmente, existe un creciente interés en comprender el rol del componente fúngico en estas interacciones tritroficas (insecto-hongo-planta). Nuestros resultados sugieren el predominio, en

términos de frecuencia absoluta, de una especie del género *Botryosphaeria* Ces. & De Not., la cual será identificada mediante un enfoque multigénico en un futuro trabajo micológico. Este género ya ha sido reportado como un importante componente de la micobiotota en agallas de insectos (Pyszko et al., 2025; Zimowska et al., 2020). La elevada frecuencia de este hongo sugiere una relación consistente en el sistema en estudio, aunque su rol ecológico requerirá estudios experimentales adicionales que permitirán contestar interrogantes sobre su posible rol en la formación, mantenimiento y/o la ecología interna de las agallas.

Las agallas se desarrollan en los tallos vegetativos como fue registrado por Kieffer & Jörgensen (1910) y Jörgensen (1917) y también en los ejes de las inflorescencias, donde la presencia de agallas no detiene la fructificación. Dos morfotipos son identificados, el fusiforme (agallas alargadas) y el globoide (agallas globosas), ambos frecuentes en agallas caulinares (Isaias et al., 2013). La agalla madura estudiada es cerrada, en general unilarval y posee una cámara larval en galería o túnel desarrollada en la médula parenquimática. La forma particular de la cámara larval a modo de galería es consistente con el cuerpo cilíndrico y alargado de la larva y su gran movilidad en el interior de la agalla. Estas características son comunes de las larvas de *Alycaulini* que viven en agallas caulinares y forman túneles (Gagné & Jaschhof, 2021).

En general, las agallas caulinares de cecidómidos no caen al suelo durante la época invernal, sino que persisten sujetas al cuerpo de la planta con el inductor en su interior y con los tejidos agallados vivos (Jorge et al., 2022; Yukawa & Rohfritsch, 2005). Esto sucede con las agallas inducidas por algunas especies de *Neolasioptera* sobre plantas perennes leñosas (Mc Kay et al., 2014) y con las agallas inducidas por *Lasioptera rubi* (Schrank) sobre arbustos (Popescu & Gostin, 2024). Esta estrategia de vida es clasificada como tipo IIA por Yukawa & Rohfritsch (2005). El heliotropo es una especie perenne no leñosa y en el área de estudio, las ramificaciones aéreas son afectadas por las heladas invernales. Así, las agallas caulinares de *N. tridentifera* durante los meses invernales, persisten sujetas a los restos helados de la planta con la larva III en su interior, pero sobre el suelo o semienterradas, y con los tejidos agallados muertos, secos y contraídos. Por esta particular forma de invernar la estrategia de vida de *N. tridentifera* es tipo IB (Yukawa & Rohfritsch, 2005; Yukawa & Uechi, 2021). Estos rasgos de la estrategia de vida de *N. tridentifera* estarían estrechamente relacionadas a la forma de vida del heliotropo y a su fenología, lo cual señalaría a *N. tridentifera* como una especie con alta especificidad por el hospedador y por el órgano vegetal como es referido para las especies de *Alycaulini* (Gagné & Jaschhof, 2021, Kuzmanich et al., 2015, 2018; Mc Kay et al., 2014).

En el área de estudio, las emergencias de adultos ocurrieron a mediado y a fin de la primavera. Esto es distinto a la emergencia registrada en verano en otras provincias, San Juan y Mendoza (Kieffer & Jörgensen (1910) y Jörgensen (1917), donde las diferencias de las condiciones climáticas podrían influir en la fenología del heliotropo y en la historia de vida de su cecidógeno asociado (Yukawa & Rohfritsch, 2005; Yukawa & Uechi, 2021). Por otra parte, posiblemente en nuestra área de estudio ocurría una emergencia a fines del verano dado que se encontraron larvas I y II a mediados de otoño. Esto indicaría que *N. tridentifera* no es una especie univoltina. Sin embargo, es necesario obtener más información para conocer cuántas generaciones por año ocurren y para comprender la sucesión de agallas en un mismo eje caulinar puesto que los ejes de las inflorescencias son los últimos en desarrollar y deberían albergar las agallas más recientes.

En el tallo sin agalla estudiado, la organización general de los tejidos es acorde a la descripta en la bibliografía para *H. curassavicum* (Pérez Cuadra y Cambi, 2014) y para otras especies de *Heliotropium* (Al-Hadeethi et al., 2018; Kandemir et al., 2020; Kasem, 2015; Monti et al., 2003). Esto es epidermis, clorénquima subepidérmico, colénquima, parénquima cortical, fibras perivasculares, tejidos vasculares dispuestos en un anillo continuo y médula parenquimática. En particular, en este trabajo señalamos la presencia en el tallo de *H. curassavicum* de una vaina amilífera como la capa más interna de la corteza formada por células que acumulan almidón. Este tipo de vaina puede desarrollarse en tallos jóvenes y, en algunos casos es referida como una endodermis caulinar con almidón (Esau, 1982; Fahn, 1972; Mauseth, 1988).

En el tallo agallado, la organización y distribución general de los tejidos es básicamente la misma que en el tallo sin agalla, presenta epidermis, corteza y médula. La estructura de la agalla estudiada es sencilla acorde a lo señalado para las agallas ambrosía de cecidómidos (Bronner, 1992; Rohfritsch, 1992, Yukawa & Rohfritsch, 2005). Aun así, la agalla ambrosía de *N. tridentifera* presenta modificaciones importantes como el mayor espesor de los parénquimas cortical y medular, el amplio parénquima entre hileras de tráqueas, la neoformación de tejidos vasculares en el parénquima medular y la persistencia de meatos o espacios intercelulares en los parénquimas cortical y medular. Las modificaciones como crecimiento de los tejidos y la neoformación de tejidos vasculares que redireccione los suministros hacia la agalla, son acordes a los cambios generales y básicos propuestos para agallas (Isaias et al., 2024; Rohfritsch, 1992). En la agalla leñosa inducida por *Neolasioptera* sp., el aumento del parénquima xilemático y el incremento del tamaño celular fueron asociados a un mayor almacenamiento de agua (Jorge et al., 2022). En el caso de la agalla estudiada, que es carnosa, los amplios parénquimas cortical y medular cumplen esa función. En las agallas ambrosía caulinares inducidas por *Lasioptera rubi* en arbustos, el xilema secundario experimenta hipertrofia de las tráqueas, aumento de parénquima y fibras xilemáticas y menor lignificación (Popescu & Gostin, 2024). En la agalla de *N. tridentifera*, se incrementó el parénquima xilemático no lignificado y el parénquima entre las hileras de tráqueas. Estas alteraciones podrían contribuir al movimiento de sustancias a corta distancia y transversal, facilitando el transporte localizado en la zona de la agalla. Por otro lado, el desarrollo de parénquima contribuiría a compensar el aumento en diámetro del tallo agallado. En particular, los amplios parénquimas a nivel del xilema primario cumplirían esta función, siendo análogos al tejido de dilatación del floema en la estructura secundaria de tallos (Esau, 1985; Mauseth, 1988).

Los meatos posibilitan la circulación de aire en los tejidos vegetales (Mauseth, 1988) y su persistencia en agallas es reportada en parénquimas homogeneizados y fotosintéticos (Arduin & Kraus, 2001; Isaias et al., 2024; Rohfritsch, 1992). En la agalla ambrosía estudiada, que es cerrada, verde, posee estomas y clorénquima subepidérmico, los espacios intercelulares podrían facilitar la circulación de gases, y en el amplio espesor de los parénquimas cortical y medular, facilitarían la circulación del oxígeno requerido para la respiración celular, la respiración de la larva y del micelio. En el caso de las agallas abiertas por un ostiolo, la entrada de aire ocurre por esa abertura (Rohfritsch, 1992).

La presencia de un estrato de esclerénquima alrededor de la cámara larval es frecuente en las agallas de himenópteros, lepidópteros y cecidómidos, este estrato contribuye al soporte estructural de la agalla y a la protección frente a parasitoides (Isaias et al., 2024; Rohfritsch, 1992). En las agallas ambrosía foliares de cecidómidos estudiadas por Chao & Liao (2013) además de esas funciones, la capa de esclerénquima fue asociada a restringir el crecimiento de las hifas fúngicas hacia otros tejidos del órgano agallado y a limitar la capacidad de la larva para invadir más tejidos vegetales. En adición, los autores relacionaron estas funciones con las estrategias de vida de los inductores. La agalla ambrosía inducida por *Schizomyia macropillata* Maia en hojas, carece de una capa de esclerénquima alrededor de la cámara larval y son los tricomas epidérmicos los que proveen protección (Sá et al., 2009). La agalla estudiada, si bien tiene esclereidas y fibras pericíclicas, están poco lignificadas y no forman una capa de esclerénquima. Por lo tanto, sería el propio tallo el que provee soporte a la agalla en la planta. Asimismo, el anillo de tejidos vasculares que contribuye al soporte podría estar limitando el crecimiento del micelio hacia el parénquima cortical dado que se observó que el micelio permaneció restringido a la zona medular, específicamente a la pared parenquimática de la cámara larval.

En otro aspecto, la superficie de la agalla estudiada es lisa, no posee rasgos peculiares que provean protección ante posibles parasitoides e inquilinos. Posiblemente el amplio espesor de la pared de la agalla, formada por los parénquimas y tejidos vasculares, dificulte el acceso de inquilinos y parasitoides considerando que fueron muy pocas las agallas con otros ocupantes (5,13%). Por otra parte, durante la época invernal, cuando la agalla está sobre el suelo, el parénquima cortical y medular podría amortiguar el efecto de los factores abióticos, y el anillo de

tejidos vasculares podría contribuir a evitar el colapso de la cámara larval. El conjunto de estos rasgos estructurales de la agalla inducida por *N. tridentifera* podrían estar asociados a la estrategia de vida y al modo de alimentación micetófaga de la larva inductora (Chao & Liao, 2013).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo revelan una estrecha asociación entre la larva III y el micelio presente en la agalla, identificando dentro de la comunidad fúngica al más abundante como perteneciente al género *Botryosphaeria*. Dicho género ha sido reportado anteriormente en agallas ambrosía, siendo *Botryosphaeria dothidea* (Moug.) Ces. / De Not. (Dothideomycetes) la especie fúngica más comúnmente encontrada en el interior de la mayoría de las agallas inducidas por especies de *Asphondylini* y *Lasiopterini*. En algunas agallas es la única especie presente, en otras es el hongo dominante durante todo el proceso de desarrollo de la agalla o en una fase del desarrollo (Adair et al., 2009; Bernardo et al., 2021; Kobune et al., 2012; Pan et al., 2015; Pyszko et al., 2024). En agallas de *Lasioptera donaci* Coutin & Faivre-Amiot fue encontrado otra especie fúngica, *Arthrinium arundinis* Corda (Sordariomycetes) (Careddu et al., 2022). En relación con *Neolasioptera*, Borkent & Bissett (1985) encontraron conidios de especies de *Macrophoma* (Sacc.) Berl. & Voglino (Dothideomycetes) en los micangios.

Especies del género *Botryosphaeria* son conocidas por su capacidad para colonizar una amplia variedad de tejidos vegetales (Slippers & Wingfield, 2007). La identificación de este hongo en el sistema estudiado plantea interrogantes sobre su papel en la inducción y desarrollo de la agalla, así como sobre su interacción con la larva y el tejido vegetal circundante. Estudios previos han documentado sistemas similares en los que las larvas se alimentan tanto de micelio como de tejido nutritivo especializado (Bronner, 1992; Heath & Stireman III, 2010). Sin embargo, en este estudio, no se observó un tejido nutritivo típico [e.g. agalla de *Neolasioptera* sp. sobre tallos de *E. erythropappus* (Jorge et al., 2022)], lo que sugiere que el hongo podría desempeñar un rol exclusivo en la provisión de nutrientes. La observación de larvas alimentándose del micelio, junto con la presencia de hifas en su tracto digestivo, constituye una evidencia directa del micelio como fuente primaria de nutrientes. El micelio, que varía en color de blanco a negro según el estadio larval, tapiza la pared de la cámara larval sin obliterarla, formando un estrato laxo de hifas en contacto directo con la larva. Esta disposición sugiere una relación simbiótica especializada, en la que el micelio no solo actúa como fuente de alimento, sino que también podría influir en la estructura y mantenimiento de la agalla como propone Rohfritsch (2008). Futuros estudios en el componente fúngico profundizarán su enfoque en la identificación multigénica y en la exploración de roles funcionales sobre los organismos fúngicos asociados.

En coincidencia con Isaias et al. (2024), los trabajos descriptivos de las agallas entomógenas son el primer paso hacia trabajos interdisciplinarios y multifactoriales más amplios y complejos, que contemplen aspectos fisiológicos, químicos, ecológicos y ambientales del desarrollo de las agallas. Considerando que es muy escasa la bibliografía sobre la anatomía de agallas ambrosía de especies de cecidómidos y en particular de *Alycaulini* presentes en la Argentina, el componente descriptivo de este trabajo constituye una contribución significativa y plantea la necesidad de examinar de forma integrada y multidisciplinaria este sistema biológico tritrófico: planta-hongos-insecto denominado agalla ambrosía.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Proyecto de Investigación N° 30 del Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de La Pampa.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adair, R. J., Burgess, T., Serdani, M., & Barber, P. (2009). Fungal associations in Asphondylia (Diptera: Cecidomyiidae) galls from Australia and South Africa: implications for biological control of invasive acacias. *Fungal Ecology*, 2, 122-134.
- Akbar, W. A. S., Arokiarajan, M. S., Christopher, J. J., Ahmed, N. Z., & Meena, R. (2023). Evaluation of bioactive compounds as antimicrobial and antidiabetic agent from the crude extract of *Heliotropium curassavicum* L. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 50, 102745. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102745>

- Al-Hadeethi, M. A., Al-Anbari, A. K., & Mohammed, A. T. (2018). Anatomical and palynological features of *Heliotropium supinum* L. In 9th International Conference on Advances in Engineering and Technology (RTET-2018), Londres, UK, <https://doi.org/10.17758/EIRAI1.F0318103>
- Arduin, M., & Kraus, J. E. (2001). Anatomia de galhas de ambrosia em folhas de *Baccharis concina* e *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). *Revista Brasileira de Botânica*, 24 (1), 63-72.
- Bernardo, U., Nugnes, F., Gargiulo, S., Nicoletti, R., Becchimanzini, A., Stinca, A., & Viggiani, G. (2021). An integrative study on *Asphondylia* spp. (Diptera: Cecidomyiidae), causing flower galls on Lamiaceae, with description, phenology, and associated fungi of two new species. *Insects*, 12, 958, <https://doi.org/10.3390/insects12110958>
- Borkent, A., & Bissett, J. (1985). Gall midges (Diptera: Cecidomyiidae) are vectors for their fungal symbionts. *Symbiosis*, 1, 185-194.
- Brèthes, J. (1922). Himenópteros y dípteros de varias procedencias. *Anales Sociedad Científica Argentina*, 93, 119-146.
- Bronner, R. (1992). The role of nutritive cells in the nutrition of Cynipids and Cecidomyiids. In J. D. Shorthouse y O. Rohfritsch (Eds.), *Biology of Insect-Induced Galls* (pp. 118-140). Oxford University Press.
- Cano, E. (2004). Inventario integrado de los recursos naturales de la Provincia de La Pampa. Clima, Geomorfología, Suelo y Vegetación. 2ª Edición. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria Provincia de La Pampa, Universidad Nacional de La Pampa.
- Careddu, G., Botti, M., Cristofaro, M., Sporta Caputi, S., Calizza, E., Rossi, L., & Costantini, M. L. (2022). The Feeding behavior of gall midge larvae and its implications for biocontrol of the giant reed: Insights from stable isotope analysis. *Biology*, 11, 1805, <https://doi.org/10.3390/biology11121805>
- Casagrande, G. A., Vergara, G. T. y Bellini, Y. (2006). Cartas agroclimáticas actuales de temperaturas, heladas y lluvia de la provincia de La Pampa (Argentina). *Revista de la Facultad de Agronomía de la UNLPam*, 17(1/2), 15- 22. <https://cerac.unlpam.edu.ar/index.php/semitienda/article/view/4605/4755>
- Ceriani-Nakamurakare, E., Slodowicz, M., Gonzalez-Audino, P., Dolinko, A., & Carmaran, C. (2016). Mycobiota associated with the ambrosia beetle *Megaplatypus mutatus*: threat to poplar plantations. *Forestry*, 89 (2), 191-200, <https://doi.org/10.1093/forestry/cpw001>
- Chao, J. F., & Liao, G. I. (2013). Histocytological aspects of four types of ambrosia galls on *Machilus zuihoensis* Hayata (Lauraceae). *Flora*, 208, 157-164.
- D'Ambrogio de Argüeso, A. (1986). *Manual de Técnicas en Histología Vegetal*. Ed. Hemisferio Sur S. A.
- Di Fulvio, T. E., y Espinar, L. A. (2016). Las especies argentinas de *Heliotropium* (Boraginaceae). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 51 (4), 745-787.
- Dorchin, N., Harris, K. M., & Stireman III, J. O. (2019). Phylogeny of the gall midges (Diptera, Cecidomyiidae, Cecidomyiinae): Systematics, evolution of feeding modes and diversification rates. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 140, 1-15.
- Dreger-Jaufret, F., & Shorthouse, J. D. (1992). Diversity of gall-inducing insects and their galls. In J. D. Shorthouse & O. Rohfritsch (Eds.), *Biology of Insect-Induced Galls* (pp. 8-33). Oxford University Press.
- Esau, K. (1982). *Anatomía de las plantas con semilla*. Ed. Hemisferio Sur S. A.
- Fahn, A. (1972). *Plant anatomy*. Pergamon Press Ltd., Headington Hill Hall, Oxford.
- Gagné, R. J., & Jaschhof, M. (2021). *A Catalog of the Cecidomyiidae (Diptera) of the world*. Fifth Ed. Digital.
- Heath, J. H., & Stireman III, J. O. (2010). Dissecting the association between a gall midge, *Asteromyia carbonifera*, and its symbiotic fungus, *Botryosphaeria dothidea*. *Entomología Experimentalis et Applicata*, 137, 36-49, <http://dx.doi.org/10.1111/i.1570-7458.2010.01040.x>
- Isaias, R. M. S., Carneiro, R. G. S., Oliveira D. C., & Santos, J. C. (2013). Illustrated and annotated checklist of brazilian gall morphotypes. *Entomología Neotropical*, 42, 230-239. <http://dx.doi.org/10.1007/s13744-013-0115-z>
- Isaias, R. M. S., Kraus, J. E., Costa E. C., & Carneiro, R. G. S. (2024). The anatomy of neotropical galls and the untold lessons about the morphogenetical potentialities of plants. *Rodriguésia*, 75, e01542023. <http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860202475007>
- Jorge, N. C., Freitas, M.S.C., Caffaro, R. M., Vale, F. H. A., Lemos-Filho, J. P., & Isaias, R. M. S. (2022). Vascular traits of stem galls: Cell increment versus morphogenetic constraints in wood anatomy. *Plant Biology*, 24, 450-457, <http://doi.org/10.1111/plb.13392>
- Jörgensen, P. (1916). Zoocecidos argentinos. *Physis*, 12(2), 360-365.
- Jörgensen, P. (1917). Zoocecidos argentinos. *Physis*, 13(3), 1-29.
- Kandemir, N., Çelik, A., Shah, S. N., & Razzaq, A. (2020). Comparative micro-anatomical investigation of genus *Heliotropium* (Boraginaceae) found in Turkey. *Flora*, 262, 151-1495.
- Kasem, W. T. (2015). Anatomical and micromorphological studies on seven species of *Heliotropium* L. (Boraginaceae Juss.) in South West of Saudi Arabia. *American Journal of Plant Sciences*, 6, 1370-1377.
- Katalinic, V., Milos, M., Kulusic, T., & Jukic, M. (2006). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*, 94 (4), 550-557. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.12.004>
- Kieffer, J. J., & Jörgensen, P. (1910). Gallen und Gallentiere aus Argentinien. *Nachdruck verboten*, 362-444.

- Kobune, S., Kajimura, H., Masuya, H., & Kubono, T. (2012). Symbiotic fungal flora in leaf galls induced by *Illiciomyia yukawai* (Diptera: Cecidomyiidae) and in its mycangia. *Microbial Ecology*, 63, 619-627. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9962-0>
- Kuzmanich, N., Altamirano, A., & Salvo, A. (2015). Agallas de insectos de la región Rioplatense, Buenos Aires, Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 74 (1-2), 47-56.
- Kuzmanich, N., Giorgis, M. A., & Salvo, A. (2018). Insect galls from Córdoba, Argentina: a case where stem galls predominate. *Revista de Biología Tropical*, 66 (3), 1135-1148, <https://doi.org/10.15517/rbt.v66i3.31947>
- Mauseth, D. J. (1988). *Plant Anatomy*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.
- Mc Kay, F., Sosa, A. J., & Heard, T. A. (2014). Bionomics of *Neolasioptera aculeata* (Diptera: Cecidomyiidae), a promising biological control candidate against *Parkinsonia aculeata* (Fabaceae). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 73 (1-2), 19-25.
- Méndez, M., Vergara, G., Casagrande, G., y Bongianino, S. (2021). Clasificación climática de la región agrícola de la provincia de La Pampa, Argentina. *Semiarida*, 31(2), 9-20. [http://dx.doi.org/10.19137/semiarida.2021\(02\).09-20](http://dx.doi.org/10.19137/semiarida.2021(02).09-20)
- Monti, C., Novoa, M. C. y Vizcaíno, C. E. (2003). Anatomía y etnobotánica de dos especies de Boraginaceae de la Provincia pampeana (Argentina) usadas en medicina popular. *Latin American Journal of Pharmacy*, 22, 197-201.
- Pan, L. Y., Chiang, T. Ch., Wen, Y. Ch., Chen, W. N., Hsiao, S. Ch., Tokuda, M., Tsai, Ch. L., & Yang M. M. (2015). Taxonomy and biology of a new ambrosia gall midge *Daphnephila urnicola* sp. nov. (Diptera: Cecidomyiidae) inducing urn-shaped leaf galls on two species of *Machilus* (Lauraceae) in Taiwan. *Zootaxa*, 3955 (3), 371-388. <http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.3955.3.5>
- Pérez Cuadra, V. y Cambi, V. N. (2014). Ourrencia de caracteres anatómicos funcionales foliares y caulinares en 35 especies xero-halófilas. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 49(3), 347-359.
- Popescu, I. E., & Gostin, I. N. (2024). *Lasioptera rubi*, a pest of *Rubus idaeus*: Galls morphology, anatomy and histochemistry. *Agriculture*, 14, 1761. <https://doi.org/10.3390/agriculture14101761>
- Pyszko, P., Šigutová, H., Kolařík, M., Kostovčík, M., Ševčík, J., Šigut, M., Višňovská, D., & Drozd, P. (2024). Mycobionomes of two distinct clades of ambrosia gall midges (Diptera: Cecidomyiidae) are species-specific in larvae but similar in nutritive mycelia. *Microbiology Spectrum*, 12, e02830-23. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02830-23>
- Pyszko, P., Šigutová, H., Ševčík, J., Drgová, M., Hařovská, D., & Drozd, P. (2025). Ambrosia gall midges (Diptera: Cecidomyiidae) and their microbial symbionts as a neglected model of fungus-farming evolution. *FEMS Microbiology Reviews*, 49, 1-17. <https://doi.org/10.1093/femsre/fua010>
- Rohfritsch, O. (1992). Patterns in gall development. In J. D. Shorthouse & O. Rohfritsch (Eds.), *Biology of Insect-Induced Galls* (pp. 60-86), Oxford University Press.
- Rohfritsch, O. (2008). Plants, gall midges, and fungi: a three-component system. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 128, 208-216 <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2008.00726.x>
- Roskam, J. C. (1992). Evolution of the gall-inducing guild. In J. D. Shorthouse & O. Rohfritsch (Eds.), *Biology of Insect-Induced Galls* (pp. 34-49), Oxford University Press.
- Sá, C. E. M., Silveira, F. A. O., Santos, J. C., Isaías, R. M. D. S., & Fernandes, G. W. (2009). Anatomical and development aspects of leaf galls induced by *Schizomyia macropillata* Maia (Diptera: Cecidomyiidae) on *Bauhinia brevipes* Vogel (Fabaceae). *Revista Brasileira de Botánica*, 32(2), 319-327.
- Slippers, B., & Wingfield, M. J. (2007). *Botryosphaeriaceae* as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews*, 21(2-3), 90-106, <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.06.002>
- Skuhravá, M., & Skuhravý, V. (1992). Biology of gall midges on common reed in Czechoslovakia. In J. D. Shorthouse & O. Rohfritsch (Eds.), *Biology of Insect-Induced Galls* (pp. 196-207), Oxford University Press.
- White, T., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (pp. 315-322), Academic Press, New York.
- Yukawa, J., & Rohfritsch, O. (2005). Biology and Ecology of gall-inducing Cecidomyiidae (Diptera). In A. Raman, C. W. Schaefer & T. M. Withers (Eds.), *Biology, Ecology, and Evolution of Gall-inducing Arthropods* Vol. 1 (pp. 273-304), Science Publishers, Inc.
- Yukawa, J., & Uechi, N. (2021). Chapter 6: Life history traits. In J. Yukawa, M. Tokuda (Eds.), *Biology of Gall Midges, Entomology Monographs* (pp. 119-149), Springer Nature Singapore Pte Ltd., https://doi.org/10.1007/978-981-33-6534-6_6
- Zimowska, B., Okoń, S., Bechimanzi, A., Krol, E. D., & Nicoletti, R. (2020). Phylogenetic characterization of *Botryosphaeria* strains associated with Asphondylia galls on species of Lamiaceae. *Diversity*, 12(2), 41.