

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**AGALLAS DE PLANTAS INDUCIDAS POR INSECTOS: UN
SISTEMA NATURAL DE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA EN
CÉLULAS EUCARIÓTICAS**

Tesis sometida a la consideración de la comisión del Programa de
Estudios de Posgrado en Biología, para optar al grado de Magíster
Scientiae en Biología

Omar Gätjens Boniche

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2007

Dedico este trabajo a todos los investigadores e investigadoras, que a pesar de las limitaciones y poco reconocimiento a su labor, han luchado por el desarrollo de la ciencia en nuestro país. Para ustedes, mi mayor respeto y admiración.

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia agradezco a Dios, por la absoluta certeza de su presencia a lo largo de mi camino, por darme la fortaleza, la perseverancia y la humildad de reconocer mis limitaciones, sin que ello me impida el soñar hasta los confines de la imaginación. Y a todas aquellas personas y amigos del Instituto Tecnológico de Costa Rica y de la Universidad de Costa Rica, que de una u otra forma apoyaron y permitieron la realización de esta investigación. Gracias a todos por su apoyo sincero y amistad.

Quiero agradecer profundamente al Doctor Pedro León por su apoyo y confianza. Por inculcarme que la mejor forma de enseñar es por medio del ejemplo y la humildad. Por reavivar mi pasión y entusiasmo por la ciencia, y por arriesgarse a explorar nuevos caminos, porque a fin de cuentas, de eso se trata la investigación científica. Y finalmente, por ser un ejemplo de un verdadero humanista y hombre de ciencia.

A Cecilia, mi esposa, compañera y amiga en los buenos y malos momentos, gracias por tu apoyo, paciencia y cariño.

A los Doctores Paul Hanson, Kenneth Madriz y Federico Albertazzi, por sus consejos y revisión del trabajo escrito, así como por alentarme a realizar este trabajo de investigación.

A Anabelle Castro por apoyar decididamente el proyecto de investigación a partir del cual deriva este trabajo.

A mis familiares y amigos, quienes me han acompañado a lo largo de mi vida y han sido una profunda fuente de motivación e inspiración.

A la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del Instituto Tecnológico de Costa Rica, por su apoyo financiero y logístico a través del Proyecto de Investigación No. 5402-2160-1401, a partir del cual se desprende el presente trabajo. Un agradecimiento especial a Vicente Gómez, Ana Abdelnour y a Milagro González por su apoyo.

Esta tesis fue aceptada por la comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado de Magíster Scientiae en Biología.



Dr. Federico Albertazzi Castro
Representante del Decano del Sistema de Estudios de Posgrado



Dr. Pedro León Azofeifa
Director de tesis



Dr. Paul Hanson
Asesor



Dr. Kenneth Madriz Ordeñana
Asesor



M.Sc. Axel Retana Salazar
Representante del Director del Programa de Posgrado en Biología



Omar Gätjens Boniche
Candidato

INDICE

	PÁGINA
Agradecimientos	iii
Resumen	viii
Lista de Figuras	x
Lista de abreviaturas	xiii
I) INTRODUCCIÓN	1
II) REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Significado y naturaleza adaptativa de las agallas	3
2.2 Insectos inductores de agallas y su diversidad	5
2.3 Desarrollo y diversidad morfológica de las agallas	7
2.4 Posibles mecanismos de inducción	14
2.5 Comparación de la composición química entre agallas y otros tejidos de la planta	18
III) OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	21
IV) METODOLOGÍA	22
4.1 Selección de un modelo idóneo	22
4.2 Purificación de ADN	23
4.2.1 Extracción y purificación de ADN genómico de larvas de <i>Latrophobia brasiliensis</i> y de hojas y agallas de la planta <i>Cousarea hondensis</i> colectadas en el bosque	26
4.3 Detección de bandas de ADN amplificadas diferencialmente en agallas mediante RAPDs (ADN Polimorfo Amplificado Aleatoriamente)	28

INDICE

	PÁGINA
Cuadro 1: Resumen de los principales RAPDs utilizados y las condiciones en las que estos se realizaron _____	33
4.4 Purificación del plásmido Ri de <i>Agrobacterium rhizogenes</i> _____	34
4.5 Obtención y procesamiento de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> _____	34
4.6 Aislamiento, purificación y reamplificación de los fragmentos de ADN amplificados diferencialmente _____	35
4.7 Clonaje de genes o fragmentos de ADN amplificados diferencialmente _____	38
4.8 Secuenciación _____	39
4.9 Reacciones de PCR con marcadores específicos para agallas _____	39
4.10 Secuenciación de fragmentos amplificados de forma específica a partir de agallas de <i>Manihot sculenta</i> _____	40
4.11 Análisis de los fragmentos de ADN secuenciados _____	41
V) RESULTADOS _____	42
5.1 Extracción y purificación de ADN genómico de hojas y agallas de yuca _____	42
5.2 Extracción y purificación de ADN genómico de larvas de <i>Latrophobia brasiliensis</i> y de hojas y agallas de la planta <i>Cousarea hondensis</i> colectadas en el bosque _____	43

INDICE

	PÁGINA
5.3 Detección de bandas de ADN amplificadas diferencialmente en agallas mediante RAPDs (ADN Polimorfo Amplificado Aleatoriamente) _____	43
5.4 Purificación del plásmido Ri de Agrobacterium rhizogenes _____	47
5.5 Aislamiento, purificación y reamplificación de los fragmentos de ADN amplificadas diferencialmente _____	47
5.6 Clonaje de genes o fragmentos de ADN amplificadas diferencialmente a partir de agallas de yuca _____	49
5.7 Secuenciación y análisis de los fragmentos de ADN amplificadas diferencialmente _____	50
5.8 Reacciones de PCR utilizando marcador específico para agallas _____	51
5.9 Secuenciación y análisis de los fragmentos de ADN amplificadas por PCR con los iniciadores específicos diseñados para agallas _____	53
VI) DISCUSIÓN _____	54
VII) CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS _____	67
FIGURAS _____	69
ANÉXOS _____	90
VIII) BIBLIOGRAFÍA _____	92

RESUMEN

En términos generales las agallas se definen como desviaciones del patrón normal de desarrollo de las plantas, producidas por una reacción específica a la presencia y actividad de un organismo "foráneo". Las agallas de plantas inducidas por insectos son tejidos especializados que presentan un arreglo ordenado de diferentes capas de células y un crecimiento predeterminado. En estas estructuras, el tamaño, forma y metabolismo de las mismas está bajo el control del respectivo insecto inductor.

Se han propuesto una serie de hipótesis para tratar de explicar los mecanismos de inducción de las agallas de plantas. La hipótesis más relevante sostiene que las agallas son inducidas por la acción de sustancias químicas secretadas por los insectos inductores, tales como auxinas, citocininas, ácido indolacético u otros tipos de compuestos; sin embargo el modo de acción de estas sustancias químicas, los procesos de desarrollo que estas alteran y el mecanismo de inducción es aún desconocido.

Este estudio propone la hipótesis de que los tejidos que conforman la agalla están transformados genéticamente, en otras palabras las células que conforman estas estructuras tienen algún tipo de elemento genético insertado en su genoma. Para probar esta hipótesis se seleccionó como modelo de estudio el sistema de agallas cilíndricas inducidas en yuca (*Manihot esculenta*) por el insecto *Latrophobia brasilensis*. Se purificó el ADN de muestras provenientes del tejido sano de las hojas y de los tejidos que conforman las agallas y se realizaron comparaciones pareadas de las bandas amplificadas diferencialmente por medio de la técnica de RAPDs, esto con el fin de detectar secuencias amplificadas en el ADN de la agalla, las cuales estarían ausentes en el ADN de la hoja. Para realizar esto se utilizaron iniciadores derivados de sitios conservados de inserción de plásmidos bacterianos que transforman células vegetales.

Los resultados mostraron no solamente la amplificación diferencial de fragmentos de ADN en las agallas de yuca, sino que también se observó que los iniciadores de RAPDs amplificaron bandas en muestras de *Agrobacterium tumefaciens* y en el plásmido Ri de *A. rhizogenes*.

Posteriormente se diseñó un marcador específico para agallas, el cual amplificó un fragmento de PCR a partir de las muestras de ADN en agallas de yuca y en agallas de la planta *Cousarea hondensis*. Este marcador específico para agallas amplificó también una serie de productos de PCR en las muestras de ADN de larvas del insecto *Latrophobia brasilensis* y en las muestras de *Agrobacterium*.

En conclusión, los resultados y evidencias obtenidas a partir del presente trabajo de investigación, sugieren claramente la posibilidad de una transformación genética de las células que forman la agalla en plantas de yuca. Específicamente, la transformación genética de los tejidos de la planta estaría mediada por un microorganismo endosimbionte presente en el insecto. Este último regularía la actividad de estas secuencias de inserción presentes en el genoma de la planta a través de la secreción de factores químicos reguladores. Además como un producto derivado de este trabajo de investigación, se propone un posible modelo de inducción para las agallas de yuca, el cual podría reflejar un mecanismo general de inducción de este tipo de estructuras en otros sistemas similares.

LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1. Esquema del probable proceso de amplificación diferencial de bandas de ADN utilizando RAPDs _____	78
Figura 2. Esquema resumido de la metodología a seguir en el trabajo de investigación de tesis _____	79
Figura 3. Agallas inducidas en hojas de <i>Manihot esculenta</i> (Yuca) por el insecto <i>Latrophobia brasilensis</i> ; Díptera, Cecidomyiidae _____	80
Figura 4. Agallas inducidas en hojas de la planta <i>Cousarea hondensis</i> colectada en una zona de bosque _____	81
Figura 5. Electroforesis de ADN total extraído de hojas y agallas de <i>Manihot sculenta</i> (yuca). Muestras de la 27 a la 36 _____	82
Figura 6. Electroforesis de fragmentos de ADN amplificados a partir del RAPD-Prugrad1 (prueba de gradientes 1), en muestras de hojas y agallas de yuca _____	83
Figura 7. Electroforesis de fragmentos de ADN amplificados a partir del RAPD- 05 en muestras de hojas y agallas de yuca _____	84
Figura 8. Electroforesis de fragmentos de ADN amplificados a partir del RAPD- 06 en muestras de hojas y agallas de yuca _____	85
Figura 9. Electroforesis de fragmentos de ADN amplificados a partir del RAPD- 06 en muestras de hojas y agallas de yuca _____	86

LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 10. Electroforesis de fragmentos de ADN reamplificados con las reacciones de Reamplificación 01, 02 y 03 _____	87
Figura 11. Electroforesis de fragmentos de ADN amplificados con las reacciones de Reamplificación- 04 (A) y Reamplificación- 05 (B) _____	88
Figura 12. Electroforesis de fragmentos de ADN amplificados con las reacciones de Reamplificación- 07 _____	89
Figura 13. Clones de <i>E. Coli</i> , transfectados con plásmidos pAMP1, conteniendo insertos de los fragmentos de ADN amplificados diferencialmente a partir de agallas, creciendo en medio de cultivo selectivo _____	90
Figura 14. Alineamiento de las secuencias 2,3 y 4 amplificadas diferencialmente por RAPDs, a partir de ADN extraído de agallas de <i>Manihot sculenta</i> (yuca) _____	91
Figura 15. Electroforesis de productos de PCR utilizando iniciadores específicos para agallas en muestras de <i>Manihot sculenta</i> (yuca) _____	92
Figura 16. Electroforesis de productos de PCR utilizando iniciadores específicos para agallas en muestras de larvas del insecto <i>Latrophobia brasilensis</i> , <i>Agrobacterium tumefaciens</i> y plásmido Ri de <i>Agrobacterium rhizogenes</i> _____	93
Figura 17. Electroforesis de productos de PCR utilizando iniciadores específicos para agallas en muestras de ADN de larvas del insecto <i>Latrophobia brasilensis</i> , <i>Agrobacterium tumefaciens</i> y hojas y agallas de la planta <i>Cousarea hondensis</i> _____	94

LISTA DE FIGURAS

PÁGINA

- Figura 18. Alineamiento de las secuencias 5,6 y 7 amplificadas de forma específica a partir del ADN extraído de las muestras de agallas 38, 39 y 40 respectivamente y de la secuencia amplificada diferencialmente por RAPD en la muestra de agalla 11 _____ 95
- Figura 19. Posible Modelo de inducción, formación y acción "In Situ" para explicar la formación de las agallas _____ 96
- Figura 20. Modelo bidimensional causa – efecto, para explicar la formación de agallas de plantas inducidas por insectos _____ 97

LISTA DE ABREVIATURAS

AIA: Ácido Indolacético.

TBE: Solución amortiguadora Tris-Borato EDTA.

TE: Solución amortiguadora Tris-EDTA.

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate (Dodecil sulfato de sodio)

PVP: Polivinil Pirrolidona.

RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA
(ADN Polimorfo Amplificado Aleatoriamente).

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

MPM: Marcador de Peso Molecular.

FQRs: Factores Químicos Reguladores.

1) INTRODUCCIÓN

Se estima que no menos del 80 por ciento de la diversidad biológica del planeta se concentra en las zonas tropicales, las cuales ocupan solamente cerca de un 8 por ciento de la superficie de la tierra. En este sentido Costa Rica es una de las regiones biológicamente más diversas del mundo, se estima que en nuestro territorio están presentes aproximadamente del 5 al 7 por ciento de todas las especies del planeta (Gámez, 1999). Estos datos y numerosos estudios han revelado que Costa Rica es uno de los países con mayor biodiversidad por kilómetro cuadrado del mundo, lo cual constituye un recurso y un patrimonio invaluable.

Los expertos señalan que uno de los problemas ambientales más graves que afronta la sociedad moderna, es la pérdida de la diversidad biológica en el planeta. Esta diversidad biológica es determinada por las características genéticas de los organismos y la diversidad de los ecosistemas resultantes de las complejas interacciones entre los organismos y entre estos y el medio físico que los rodea. Gámez (1999) señala que existe un consenso a nivel mundial sobre la necesidad de que la sociedad moderna realice un cambio importante en su estilo de desarrollo, de tal forma que este no solo mejore la calidad de vida del ser humano, sino que también conserve la vitalidad y la diversidad de vida sobre la tierra. Este nuevo enfoque propone una conservación de la biodiversidad basada en la facilitación de su uso, por medio de una nueva estrategia que se fundamenta en tres principios fundamentales: salvar, conocer y utilizar. Enfatizando en este último aspecto con el fin de aprovechar las oportunidades que la diversidad biológica ofrece para mejorar la calidad de vida de la humanidad, por medio de su utilización racional y sustentable, con fines económicos, intelectuales y espirituales.

Los seres vivos son sistemas altamente organizados que pueden presentar una serie de interacciones complejas, en este contexto se conoce ampliamente la capacidad que poseen algunos insectos de alterar y manipular el desarrollo normal de las plantas, para promover el crecimiento y desarrollo de estructuras altamente organizadas llamadas agallas. Las agallas son entidades que se desarrollan debido a la influencia tanto del insecto como de la planta. Su tamaño, metabolismo y estructura están

determinados en gran medida por la especie del insecto inductor y el tipo de planta hospedera, siendo esta relación muy específica e interesante en una amplia variedad de aspectos (Leitch, 1994; Ananthakrishnan, 1998). Algunos de los aspectos más relevantes relacionados con la biología de las agallas incluyen la extraordinaria diversidad de formas, colores, tamaños y estructuras internas que estas presentan. Un gran número y diversidad de insectos inductores de agallas han sido reportados alrededor del mundo. En términos generales se podría considerar que pocos géneros de plantas se encuentran libres de agallas y aunque estas son más comunes en algunos grupos, la mayoría se encuentran en plantas dicotiledóneas (Shorthouse y Rohfritsch, 1992; Williams, 1994; Ananthakrishnan, 1998).

Las primeras descripciones sobre agallas fueron realizadas aparentemente hace unos trescientos años antes de Cristo por Theophrastus y posteriormente por otros naturalistas como Dioscorides y Pliny un siglo antes de Cristo. No obstante se considera al trabajo realizado por Malpighi en 1679, como la primera investigación científica en el campo de la Cecidología, que es la disciplina científica dedicada al estudio de las agallas (Williams, 1994).

Durante la edad media las agallas de plantas fueron usadas como medicamentos y como fuente de colorantes. Y más recientemente se les ha utilizado como fuente de taninos y en la elaboración de tintes (Williams, 1994).

Las agallas son entidades que parecen tener un significado fundamental en aspectos que han intrigado a los científicos por décadas, aspectos tan relevantes como aquellos relacionados con la diferenciación celular, la determinación y formación de órganos y los mecanismos de interacción entre células animales y vegetales (Shorthouse y Rohfritsch, 1992).

El objetivo principal del proyecto está relacionado con el estudio de la biología molecular de las agallas y está enfocado principalmente a la búsqueda y aislamiento de elementos genéticos "foráneos" a la planta, que puedan estar mediando la inducción y control de la agalla. Específicamente, se plantea la hipótesis de que los tejidos que conforman la agalla están transformados genéticamente, en otras palabras las células

que conforman estas estructuras tienen algún tipo de elemento genético insertado en su genoma. Los elementos genéticos mencionados anteriormente podrían ser plásmidos, virus, transposones o algún tipo de retroelemento.

Las investigaciones realizadas como parte de este trabajo de tesis, se desarrollaron en el Laboratorio de Genética Molecular del Centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular, ubicado en la Ciudad de la Investigación, en Sabanita de Montes de Oca y en el laboratorio de Biología Molecular de la Sede San Carlos del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

II) REVISIÓN DE LITERATURA

2.1) *Significado y naturaleza adaptativa de las agallas:*

El término agalla de planta ha sido aplicado incorrectamente a diferentes sistemas y aunque no existe un consenso general sobre la definición del término, el mismo se ha utilizado como una expresión generalizada más que un término o concepto científico preciso (Williams, 1994). No obstante, en términos generales las agallas se podrían definir como desviaciones del patrón normal de desarrollo de las plantas, producidas por una reacción específica a la presencia y actividad de un organismo foráneo. En estas estructuras, el tamaño, forma y metabolismo de las mismas está bajo el control del respectivo organismo inductor (Bloch, 1965, citado por Shorthouse y Rohfritsch, 1992).

El posible significado o valor adaptativo de las agallas y de las características asociadas a estas estructuras es objeto de un amplio y continuo debate entre los diferentes grupos de investigadores (Nyman y Julkunen 2000; Stone y Schönrogge, 2003). Algunos investigadores sostienen que las agallas surgieron como un mecanismo de defensa desarrollado por los insectos contra el ataque de enemigos naturales, no obstante esta y otras ideas al respecto son aún el blanco de amplios debates (Ananthakrishnan, 1998; Stone y Cook 1998). En este mismo contexto, Price *et al.* (1986) mencionan que las agallas son estructuras inducidas por los insectos en las

plantas, las cuales pueden llegar a desarrollar un alto grado de complejidad y organización. La función principal de estas estructuras es dar refugio y alimento a las larvas del insecto que las produce, por lo que las agallas de insectos son el producto de una asociación inter-específica entre la planta y el respectivo insecto inductor. Aunque las agallas están compuestas por los tejidos de la planta huésped, su desarrollo se cree es controlado por los genes del insecto (Stone y Schönrogge, 2003).

En general el tipo de interacción biológica existente entre los insectos inductores de agallas y su planta hospedera es motivo de un continuo debate. Al respecto, diferentes líneas de pensamiento relacionan las agallas con procesos de patogénesis, simbiosis, o bien con mecanismos de defensa de las plantas (Hartnett y Abrahamson, 1979; Price *et al.*, 1986). No obstante algunos autores apoyados en investigaciones recientes, consideran que los mecanismos moleculares involucrados en los diferentes procesos de simbiosis y patogénesis presentan una serie de mecanismos comunes, lo que ha permitido revelar las similitudes existentes en la modulación e interacción de patógenos y simbiosis con sus hospederos.

En procariotas, además de los cromosomas, los organismos poseen diferentes clases de elementos genéticos móviles, tales como Islas Genómicas, Plásmidos, Transposones, Secuencias de Inserción o bacteriófagos, que les permiten inducir cambios estructurales y fisiológicos, o bien la adquisición o pérdida de regiones del genoma. Además, el hecho de que un gran número de determinantes patogénicas y simbióticas se localicen en elementos genéticos móviles, permite que se genere una fuente permanente de variación en estos organismos. En este sentido, la variabilidad genética desempeña un papel muy importante, al generar las condiciones que permiten la evolución de nuevos tipos de interacciones entre los organismos. Actualmente existen nuevas evidencias con respecto a la transferencia horizontal de genes, tanto entre organismos patógenos de animales y plantas, como entre simbiosis y patógenos de plantas. Esto sugiere que la transferencia horizontal de genes entre diferentes especies podría representar un poderoso mecanismo por medio del cual el resultado final de la interacción entre un patógeno o simbiote y su hospedero puede alterarse de forma permanente (Hentschel *et al.*, 2000).

Sin importar el tipo de interacción específica entre los insectos inductores de agallas y sus plantas hospederas, la selección natural actúa consecuentemente sobre el insecto para estimular el desarrollo de tejidos protectores o nutritivos en la planta y por otra parte, en la planta la selección natural actúa para resistir el estímulo generado por el insecto. El ambiente establecido por la agalla favorece al insecto inductor al proporcionarle alimento, bajos niveles de sustancias químicas potencialmente nocivas y protección contra el acceso de enemigos naturales. Las inusuales concentraciones de sustancias nutritivas en el interior de la agalla por otro lado proveen las condiciones favorables para el desarrollo de comunidades de microorganismos (Ananthakrishnan, 1998).

2.2) Insectos inductores de agallas y su diversidad:

Las agallas no son inducidas únicamente por los insectos, una gran variedad de organismos que incluyen bacterias, hongos, nemátodos y ácaros pueden inducir también este tipo de estructuras. No obstante, en general las agallas formadas por estos grupos de organismos son básicamente "hinchamientos" o bien masas de células indiferenciadas o con un bajo nivel de diferenciación. Las agallas más complejas y diversas son las inducidas por los insectos de la familia Cynipidae y Cecidiomyiidae, pertenecientes a los ordenes *Hymenoptera* y *Diptera* respectivamente (Leitch, 1994; Williams, 1994; Ananthakrishnan, 1998).

Los insectos inductores de agallas son herbívoros altamente especializados y sedentarios, que se alimentan únicamente de ciertas células especializadas presentes en la estructura que ellos mismos han formado, a partir del tejido de la planta que ha sido atacado (Shorthouse y Rohfritsch, 1992).

La capacidad de inducir agallas ha surgido aparentemente de forma convergente en varios ordenes de insectos y en muchos de estos ordenes la capacidad de formar estas estructuras tiene al parecer un origen independiente (Nyman y Julkunen 2000; Nyman et al., 2000). El registro fósil de las agallas ha generado un amplio y rico linaje, que se

extiende al menos desde hace trescientos millones de años (Stone y Schönrogge, 2003).

Rohfritsch y Shorthouse (1982), Leitch (1994), Williams (1994) así como Ananthakrishnan (1998), mencionan que miles de insectos inductores de agallas han sido reportados alrededor del mundo, 13 000 especies de acuerdo a Stone y Schönrogge (2003), la mayor parte pertenecen a los ordenes Thysanoptera (Trips), Hemiptera, Lepidóptera, Coleóptera, Díptera, e Himenóptera. Los insectos inductores de agallas tienen por lo general plantas hospederas específicas y pueden inducir la formación de agallas en hojas, brotes, flores, tallos, raíces y en otros órganos de la planta, dependiendo de la especie del inductor.

Las agallas inducidas por los insectos del orden Thysanoptera viven en colonias compuestas por un gran número de individuos de diferentes edades e incluso de diferentes especies. Por esta razón es difícil determinar cuál especie es responsable de inducir un determinado tipo de agalla o bien cuál especie es simplemente un inquilino. Las agallas inducidas por "trips" son relativamente abundantes en regiones tropicales, especialmente en el continente asiático en donde se han estudiado intensamente (Shorthouse y Rohfritsch, 1992).

El orden Hemiptera incluye un gran número de insectos inductores de agallas, que se caracterizan por la diversidad estructural que presentan. En los hemípteros los insectos inductores de agallas se encuentran únicamente en la familia Tingidae. Los coleópteros, a pesar de constituir un orden relativamente grande y diverso presentan pocas especies que inducen agallas. En este sentido la mayoría de coleópteros inducen estas estructuras en plantas dicotiledóneas y solamente unos pocos las inducen en gimnospermas. Un gran número de coleópteros inductores de agallas pertenecen a la familia Curculionidae y Buprestidae, así mismo algunos pocos representantes de la familia Cerambycidae causan también el desarrollo de agallas. Por su parte, los lepidópteros tienen pocas especies inductoras de agallas, sin embargo muchos de estos son de gran interés biológico (Dreger- Jauffret y Shorthouse, 1992, en Shorthouse y Rohfritsch, 1992).

El orden Díptera contiene el mayor número de especies inductoras de agallas, las cuales se agrupan en los subórdenes Nematócera, familia Cecidomyiidae (gall midges) y Cyclorhapha, familias Tephritidae (mosca de la fruta) y Agromyzidae. Los inductores de agallas pertenecientes a este orden presentan una amplia distribución alrededor del mundo y al contrario de otros ordenes de insectos inductores de agallas, también se les puede encontrar en plantas monocotiledóneas, especialmente en gramíneas (Dreger-Jauffret y Shorthouse, 1992, en Shorthouse y Rohfritsch, 1992). De acuerdo a Skuhravá *et al.* (1984, citados en Shorthouse y Rohfritsch, 1992), el 60% de los insectos de la familia Cecidomyiidae descritos para la región "panártica" son inductores de agallas y constantemente nuevas especies de insectos inductores pertenecientes a esta familia son descritos alrededor del mundo.

Por su parte el orden de los himenópteros contiene las agallas más complejas y organizadas descritas para la clase Insecta. En este grupo los insectos inductores de agallas se encuentran clasificados en el suborden Symphyta, Familia Tenthredinidae, en el suborden Apocrita, súperfamilia Chalcidoidea, que incluye a las familias Pteromalidae, Eurytomidae, Agaonidae y la súperfamilia Cynipoidea, representada por la familia Cynipidae. Los himenópteros inductores de agallas presentan una amplia distribución en diversas zonas del planeta y pueden encontrarse en diversos grupos de plantas dicotiledóneas e incluso monocotiledóneas, especialmente en especies de gramíneas. Los cinípidos (principales inductores del orden de los Himenópteros), producen el desarrollo de diferentes tipos de agallas en distintos órganos de la planta. Cuando se presenta la alternancia de generaciones en el ciclo de vida de estos insectos, ambos estados pueden producir agallas notablemente diferentes (Dreger-Jauffret y Shorthouse, 1992, en Shorthouse y Rohfritsch, 1992).

2.3) Desarrollo y diversidad morfológica de las agallas:

Como ya se ha mencionado, las agallas de plantas son tejidos altamente especializados inducidos en las plantas por otros organismos. Estas estructuras presentan un arreglo ordenado de diferentes capas de células y un crecimiento predeterminado, que tiene como resultado la formación de entidades morfológicas organizadas, que presentan un tamaño y forma particular (Ananthakrishnan, 1998).

Algunos de los aspectos más relevantes relacionados con la biología de las agallas incluyen la gran diversidad de formas, colores, tamaños y estructuras internas que presentan. Las características antes mencionadas están asociadas estrechamente con el respectivo insecto inductor, de tal forma que las agallas inducidas por una especie particular de insecto son básicamente iguales y pueden diferir de forma notable de otras inducidas por especies relacionadas. Las características distintivas de cada tipo de agalla se deben probablemente a pequeñas variaciones en la forma en que cada especie de insecto estimula el desarrollo de la agalla en el respectivo tejido de la planta (Shorthouse y Rohfritsch, 1992).

La asociación entre la agalla y su organismo inductor fue reconocida probablemente desde el inicio de los estudios realizados en estos sistemas. Sin embargo no fue sino hasta hace relativamente poco tiempo que el crecimiento y desarrollo de estas estructuras se correlacionó con la actividad de alimentación, oviposición y requerimiento nutricional del insecto inductor (Mani, 1992, en Shorthouse y Rohfritsch 1992).

En términos generales el tamaño, estructura y metabolismo de la agalla está bajo el control del respectivo insecto inductor (Nyman y Julkunen, 2000; Stone y Schönrogge, 2000). Algunos de los factores que afectan el tamaño de las agallas incluyen el número de larvas, diversidad estructural de las agallas, porcentaje de tejido infectado, estado fisiológico del hospedero, condiciones ambientales y genes presentes en la planta hospedera. El grado en el cual el insecto manipula el crecimiento de la planta para formar la agalla varía considerablemente, e involucra desde la inducción de la proliferación celular, hasta la formación de una estructura compleja que la planta no produce en condiciones normales. Al igual que otros órganos y estructuras normales de las plantas, las agallas inducidas por insectos presentan características anatómicas e histológicas propias, las cuales varían enormemente en diversidad y en el grado de complejidad (Mani, 1992, en Shorthouse y Rohfritsch 1992; Ananthakrishnan, 1998; Stone y Schönrogge, 2003).

El proceso de morfogénesis de las agallas es un fenómeno complejo, que involucra la recanalización o reorientación del desarrollo de la planta por parte del insecto inductor (Ananthakrishnan, 1998). Los insectos inductores de agallas activan regiones específicas de la planta hospedera, provocando un gradiente citológico y bioquímico a partir de las células más cercanas al sitio en donde se localiza el insecto (Mani, en Shorthouse y Rohfritsch 1992). Los tejidos cercanos al insecto inductor muestran cambios citológicos y morfológicos que favorecen su proceso de alimentación y desarrollo. Estos tejidos conocidos también como células nutritivas, presentan comúnmente altas concentraciones de azúcares, lípidos, proteínas y otros nutrientes, que proveen un recurso continuo de alimento para el insecto (Miles, 1968; Rohfritsch y Shorthouse, 1982; Shorthouse y Rohfritsch 1992). Al respecto, varios estudios han demostrado que los insectos se alimentan generalmente de una zona reducida de la agalla (Nyman y Julkunen, 2000). Las células nutritivas que rodean la cámara interna de la agalla tienen la característica de presentar un citoplasma denso con grandes cantidades de vacuolas, núcleos grandes y cloroplastos modificados en diversos grados (Shorthouse y Rohfritsch 1992).

Los insectos inductores de agallas de plantas tienen la capacidad de modificar la expresión de genes en áreas restringidas de la planta hospedera, provocando así nuevos eventos de desarrollo en los tejidos bajo su influencia. El proceso de morfogénesis de las agallas ocurre en períodos relativamente cortos, sin embargo este hecho no influye aparentemente en la complejidad observada en estas entidades morfológicas (Ananthakrishnan, 1998).

En muchos tipos de crecimientos anormales o desviaciones del desarrollo normal de los organismos, existen alteraciones en los mecanismos que regulan la diferenciación y proliferación celular. En este contexto las "agallas de corona" inducidas por bacterias, se forman debido a la proliferación de células con un bajo nivel de diferenciación, por ello son consideradas las más simples y poco derivadas dentro de la amplia variedad de estas estructuras encontradas en la naturaleza. Por el contrario las agallas inducidas por insectos son estructuras muy organizadas que presentan diferentes grados de diferenciación, por lo que se las considera como las más complejas y derivadas. No obstante, a pesar de que existen diferencias claras entre estos dos tipos extremos de agallas, también estas presentan semejanzas importantes. Al respecto ambos sistemas

presentan un estado previo de "condicionamiento" al desarrollo de la estructura. En el caso de las agallas de insectos, el "condicionante" es el insecto en sí mismo, el cual condiciona el tejido que formará la estructura mediante la acción mecánica y la secreción de sustancias químicas. Mientras que en las "agallas de corona" el factor condicionante está dado por una serie de eventos metabólicos previos a la transformación genética de las células vegetales por parte de las bacterias (Rohfritsch y Shorthouse, 1982; Davey *et al.*, 1994; Piñol *et al.*, 1996).

Al igual que en las células tumorales de las "agallas de Corona", las células que forman las agallas de insectos adquieren cierta autonomía e independencia del desarrollo normal del tejido al que pertenecen. A partir del proceso de inducción, el desarrollo de las células es recanalizado debido a la influencia del agente inductor. Sin embargo a diferencia de las agallas de insectos, las agallas de corona tienen un crecimiento incontrolado sin un patrón de desarrollo definido. Después del estímulo inicial, la proliferación celular en ambos sistemas se desarrolla de forma diferente, en el caso de las agallas de corona inducidas por bacterias, la proliferación de las células se produce de forma incontrolada y no requiere de la presencia de la bacteria. En contraste, para un adecuado y completo desarrollo de las agallas inducidas por insectos, se requiere la presencia activa del respectivo insecto (Rohfritsch y Shorthouse, 1982; Davey *et al.*, 1994).

Las agallas de plantas presentan cuatro estados básicos de desarrollo, sin embargo los mismos pueden presentar diferencias significativas entre los diferentes grupos. Estas etapas de desarrollo involucran el estado de iniciación, crecimiento y diferenciación, maduración y finalmente dehiscencia. El estado de crecimiento y desarrollo es un proceso continuo de división y diferenciación celular, que depende por lo general de la actividad de alimentación de la larva, la que a su vez es la principal responsable de modelar la forma de la cámara interna de la agalla. Después de formarse el tejido nutritivo alrededor de la cámara interna, una masa de células une el tejido vascular de la agalla con el de la planta. Frecuentemente un tejido esclerenquimatoso se desarrolla también alrededor de la cámara interna y cerca del tejido vascular de la agalla, lo que ocasiona la separación de la misma en una región interna y otra externa. Se considera que la región interna es influida por la actividad de

la larva, en tanto que la región externa o corteza de la agalla esta bajo la influencia de la planta. La apertura y dehiscencia de las agallas ocurre hacia el final de la etapa de maduración y constituye el periodo de mayores cambios químicos y fisiológicos en los tejidos que la conforman. En la actualidad se ha demostrado que no solamente los tejidos meristemáticos reaccionan a los estímulos de los insectos inductores de agallas, también se ha observado que tallos jóvenes de varias especies de plantas pueden ser estimulados y modificados para formar estas estructuras (Rohfritsch y Shorthouse, 1992).

Varios autores han tratado de clasificar las agallas de acuerdo a una serie de criterios morfológicos, que a pesar de ser artificiales, han sentado las bases para el desarrollo de un gran número de estudios. Kuster (1911, citado por Shorthouse y Rohfritsch 1992, y por Williams 1994) distingue dos tipos básicos de agallas, las organoides y las histioides. Las primeras resultan de la proliferación de órganos o bien de la modificación de órganos que conservan su estructura básica. Las agallas histioides por el contrario se originan a partir de la proliferación de células modificadas que conducen a la formación de un tejido nuevo. Este mismo autor también clasifica las agallas de acuerdo a criterios más morfológicos, al respecto las agallas llamadas kataplásmicas son irregulares en forma y tamaño, además presentan un crecimiento irregular con escasa diferenciación de sus tejidos. Por su parte las agallas prosoplásmicas son más complejas y diferenciadas y dan como resultado la formación de una nueva estructura (Miles, 1968; Williams, 1994). No obstante es importante enfatizar que cualquier intento de clasificación resulta difícil debido principalmente a que existen una gran cantidad de estados y formas intermedias entre las diferentes clases de agallas. Así, en última instancia se puede decir que la forma y estructura de las agallas depende de un gran número de factores, entre los cuales se pueden mencionar la especie a la que pertenece la planta hospedera, la especie del insecto inductor, el tipo de órgano atacado, el estado de desarrollo de la planta y en algunos casos incluso el sexo del insecto, solo para mencionar algunos.

Como se mencionó anteriormente algunas agallas son simplemente "hinchamientos" o bien masas de células indiferenciadas o con un bajo nivel de diferenciación, en tanto que otras muestran un sorprendente grado de diferenciación, organización y

especialización en sus células y tejidos; frecuentemente con características asociadas exclusivamente a la agalla de la cual proceden. En función de lo anterior, este último tipo de agalla llamada prosoplásmica, presenta una anatomía e histología muy característica y propia (Mani, 1992, en Shorthouse y Rohfritsch 1992).

Las agallas prosoplásmicas inducidas por algunas familias de insectos son, debido a su alto grado de complejidad y organización, las que generan una mayor expectativa e interés (Mani, en Shorthouse y Rohfritsch 1992); y constituyen por lo tanto, el principal material de partida para llevar a cabo los estudios e investigaciones contempladas en el presente proyecto.

A pesar de que los himenópteros y dípteros son los mayores inductores de agallas, igual diversidad se puede encontrar en las agallas formadas por, trips, áfidos, cochinillas y otros grupos de insectos (Ananthakrishnan, 1998).

Las agallas inducidas por los ordenes Thysanoptera y Homóptera se manifiestan como pequeños abultamientos o crecimientos anormales, cuyos tejidos están conformados esencialmente por células parenquimatosas. Algunas especies pueden causar también un enrollamiento de las hojas acompañado de una hipertrofia celular. En el caso de los homópteros estos inducen una gran variedad de tipos de agallas, que varían desde formas simples a aquellas que producen estructuras complejas. A pesar de que las agallas de homópteros son relativamente simples, existen algunas como las formadas por *Chermes strobilobius* en brotes de *Picea exelsa* que presentan una estructura de multicámaras muy elaborada y habitadas por un gran número de individuos (Rohfritsch y Shorthouse, 1982; Shorthouse y Rohfritsch 1992).

Las agallas producidas por los coleópteros se caracterizan por la ausencia de tejido nutritivo. Las larvas de varias especies producen túneles en diferentes partes de las plantas y los huevos son colocados en el interior de cavidades preparadas por las hembras (Shorthouse y Rohfritsch, 1992).

Las agallas formadas por los lepidópteros al igual que las de coleópteros no presentan por lo general el desarrollo de tejidos nutritivos, las larvas de estos insectos se alimentan masticando el tejido que rodea la cámara interna, produciendo así una gran cantidad de detritus (Shorthouse y Rohfritsch, 1992).

Los himenópteros y más concretamente los miembros de la familia Cynipidae, como principales representantes del grupo, inducen agallas en varias especies de plantas o bien viven como inquilinos en las formadas por otras especies. La mayoría de los representantes de esta familia inducen la formación de agallas en hojas, brotes, tallos y raíces. Las hembras ponen los huevos en la superficie del tejido y el huevo por sí mismo induce una pro agalla, pero las larvas de estos insectos son los principales agentes inductores de la estructura. Los huevos de cinípidos tienen un efecto lítico en las células que los rodean, lo que da como resultado la formación de una cámara que protege a la joven larva. Las larvas poseen estructuras bucales que les permiten romper la pared celular vegetal para succionar el contenido de las células nutritivas. Muchas especies de cinípidos se caracterizan por tener ciclos de vida complejos, comúnmente acompañados por una alternancia de generaciones. Los individuos de ambas generaciones pueden atacar el mismo órgano o diferentes tipos de órganos en la planta, produciendo como resultado la formación de agallas radicalmente diferentes y en algunos casos incluso los individuos de las dos generaciones son morfológicamente diferentes. La superficie de las agallas formadas por los cinípidos puede estar recubierta de tricomas, escamas, espinas u otro tipo de prolongaciones. Sin embargo una de las características estructurales más importantes es la formación de zonas concéntricas de diferenciación y una zona de células esclerenquimatosas alrededor de la cámara larval (Rohfritsch y Shorthouse, 1982; Shorthouse y Rohfritsch 1992).

Las agallas asociadas a dípteros y en especial las inducidas por los individuos de la familia Cecidomyiidae, exhiben el mayor ámbito de complejidad dentro de los insectos inductores de estas estructuras y presentan a su vez una amplia variación de formas y tamaños. Al menos la mitad de las agallas descritas para los insectos de esta familia se producen en hojas, sin embargo también se producen en brotes, tallos, flores y raíces. Las agallas formadas por los dípteros se caracterizan por el alto grado de diferenciación de sus tejidos y los insectos por su parte se caracterizan por la complejidad de sus

ciclos de vida. Otra característica importante presente en los dípteros inductores de agallas es la capacidad que tienen muchas de sus especies de pupar dentro de la agalla (Rohfritsch y Shorthouse, 1982; Shorthouse y Rohfritsch 1992).

En las agallas formadas por los insectos de la familia Cecidomyiidae, las células que forman el tejido nutritivo y el tejido de almacenamiento, están presentes a lo largo del desarrollo de la estructura. Así mismo para el desarrollo y mantenimiento del tejido nutritivo es necesaria la presencia activa de la larva del respectivo insecto inductor (Ananthakrishnan, 1998). Las hembras de esta familia depositan los huevos en la superficie del tejido de la planta y posteriormente al eclosionar, la larva busca un sitio adecuado para iniciar el desarrollo de la agalla. En la familia Cecidomyiidae, únicamente las larvas tienen la capacidad de inducir agallas, estas tienen un escaso desarrollo de sus estructuras bucales y se alimentan succionando los fluidos exudados de las células presentes en la agalla sin causar ningún daño o necrosis (Rohfritsch y Shorthouse, 1982; Shorthouse y Rohfritsch 1992).

2.4) Posibles mecanismos de inducción:

La capacidad que poseen un gran número de insectos de formar agallas en diferentes grupos de plantas, ha motivado una gran cantidad de investigaciones con el fin de encontrar el mecanismo de inducción de este tipo de estructuras. Hori (en Shorthouse y Rohfritsch 1992) describe cuatro hipótesis principales que podrían explicar la formación de estas estructuras. La primera de estas hipótesis sugiere la inyección de un fluido por parte del insecto, durante el proceso de oviposición, el cual estaría mediando la inducción de la agalla. Una segunda hipótesis establece que la formación de las agallas es el resultado de una irritación mecánica producida en las plantas debido a la presencia de un cuerpo extraño en sus tejidos. La tercera hipótesis sostiene que la formación de las agallas es inducida por la secreción de componentes activos en la saliva de los insectos. Y finalmente una cuarta hipótesis sustenta la idea de que la formación de las agallas esta mediada por la excreción de productos metabólicos por parte de los insectos.

Shorthouse y Rohfritsch (1992) separan la morfogénesis de las agallas inducidas por insectos en dos procesos. El primero es un efecto permanente, que se mantiene aun cuando el respectivo insecto es removido de la agalla o muere. Un segundo proceso implica que el efecto es generado por medio de una estimulación continúa por parte del insecto inductor, el cual desaparece si el insecto es removido de la agalla o si este muere.

El proceso de morfogénesis de las agallas de plantas inducidas por insectos podría dividirse para una mayor simplificación en tres fases principales. La primera de estas fases involucra el "condicionamiento" de las células del respectivo tejido de la planta por parte del insecto, para hacerlas más susceptibles y apropiadas a su acción como inductor. En la siguiente fase se da el proceso de inducción de la agalla como tal, producto del alargamiento y la división celular, que tiene como resultado la formación de una agalla "primaria". La fase final consiste en la maduración de la agalla, en la cual la agalla primaria crece hasta completar su morfogénesis (Shorthouse y Rohfritsch 1992).

Como se mencionó en el párrafo anterior, en el proceso de inducción de las agallas, las células de la planta deben ser condicionadas para producir un estado fisiológico particular. Al respecto, diferentes estudios han mencionado que los aminoácidos presentes en las secreciones salivales de los insectos inductores de agallas, esencialmente lisina, histidina y triptófano, podrían funcionar como "preacondicionadores" para la inducción de las agallas. Al parecer los aminoácidos secretados en la saliva provocarían una mayor plasticidad e incrementarían la sensibilidad de los tejidos de la planta a la acción del respectivo insecto inductor. Aunque la presencia de pectinasas en la saliva de los insectos no se ha correlacionado con la inducción de las agallas, estas enzimas podrían degradar las paredes celulares y con ello contribuirían a condicionar el tejido para la acción del insecto. En el mismo sentido, se ha especulado que la polifenol oxidasa (PPO), presente también en las secreciones salivales de los insectos y los compuestos fenólicos derivados de su acción enzimática, podrían incrementar la sensibilidad de los tejidos de la planta al estímulo por parte del respectivo insecto inductor. No obstante, se ha especulado que la compleja interacción entre los tejidos de la planta hospedera y la polifenol oxidasa, podría tener una importancia fundamental en la formación de las agallas (Miles, 1968;

Hori, 1992, en Shorthouse y Rohfritsch, 1992; Ananthkrishnan, 1998). Al respecto, Miles (1968) menciona que la interacción y balance entre el sistema de la polifenol oxidasa de los insectos y la planta hospedera, podría determinar si el “ataque” por parte del insecto produce una lesión (necrosis) o bien el desarrollo de la agalla.

Diferentes estudios han reportado que el Ácido Indolacético (AIA) podría ser un poderoso agente inductor de las agallas, también se ha especulado que este compuesto podría interactuar con otros reguladores de crecimiento vegetal, como citocininas y giberelinas, o de forma sinérgica con otras sustancias para promover el proceso de inducción y maduración de este tipo de estructuras (McCalla *et al.*, 1961; Miles, 1968; Hori, 1992, en Shorthouse y Rohfritsch, 1992; Leitch, 1994; Ananthkrishnan, 1998; Stone y Schönrogge, 2003). Sin embargo el mecanismo o modo de acción por medio del cual estas sustancias actúan para promover el desarrollo de las agallas es poco comprendido y es motivo de un amplio debate entre los investigadores del tema. Este panorama se complica aún más en el caso de las agallas prosoplásmicas, como las formadas por los insectos de las familias Cecidomyiidae y Cynipidae, debido a la complejidad de su desarrollo y estructura, y a la diversidad de estrategias adaptativas que presentan.

En el caso particular de los insectos inductores de agallas pertenecientes a la familia Cecidomyiidae, se ha reportado que el huevo o la hembra al ovipositar podrían generar el estímulo inicial y que la larva al secretar sustancias que promueven el crecimiento del tejido vegetal bajo su acción, provocaría la formación de la agalla. No obstante, debido a la complejidad del proceso de inducción y desarrollo de este tipo de agallas, la hipótesis química, en toda su amplitud, es una explicación poco probable para comprender en su totalidad el mecanismo de morfogénesis de este tipo de estructuras. Sin embargo Boysen-Jensen (1952, citado por Hori, 1992, en Shorthouse y Rohfritsch, 1992) y Miles (1968) sustentan la hipótesis de la inducción química, argumentando que la larva se mueve instintivamente y secreta sustancias reguladoras en sitios apropiados del tejido “atacado” y en tiempos específicos, generando así un ambiente propicio que favorece el desarrollo de la agalla.

Con respecto a los himenópteros de la familia Cynipidae, diferentes trabajos han asociado tanto a las auxinas como a las citoquininas con el proceso de inducción y morfogénesis de las agallas. Más aún, se ha correlacionado la morfogénesis e inducción de estas estructuras con la actividad de oviposición de la hembra, secreciones del huevo y la actividad y secreción de sustancias a partir de la larva (Miles, 1968; Hori, 1992, en Shorthouse y Rohfritsch, 1992). Shorthouse y Rohfritsch (1992) mencionan que en un trabajo realizado por Yokota et al. en 1973 se describe que el principal factor inductor de agallas en *D. kuriphilus* no incluiría ni a las auxinas ni a las citocininas. Al igual que para las agallas formadas por los insectos de la familia Cecidomyiidae, el mecanismo de morfogénesis de las agallas formadas por los Cinípidos no puede explicarse simplemente por la acción de algún regulador de crecimiento vegetal. Aunque se ha postulado que el micro ambiente generado por la larva durante el proceso de alimentación podría contribuir al proceso de morfogénesis, tal como se mencionó también para las agallas formadas por los dípteros pertenecientes a la familia Cecidomyiidae.

Estructuras o síntomas similares a agallas fueron obtenidos en pruebas realizadas por medio de la inoculación de extractos totales de hemípteros y homópteros inductores de agallas en sus respectivas plantas hospederas. Así mismo por medio de la inyección adecuada de AIA u otros tipos de auxinas, o bien auxinas mezcladas con aminoácidos, se han logrado obtener resultados similares, pero con menos éxito. Aunque los insectos de estos ordenes producen agallas poco diferenciadas, los resultados obtenidos por medio de estos experimentos han apoyado la hipótesis sobre la inducción química de este tipo de estructuras (McCalla et al., 1961; Miles, 1968; Hori, 1992, en Shorthouse y Rohfritsch, 1992).

Aunque en términos generales se ha aceptado el hecho de que algún tipo de "estímulo" químico por parte del insecto está involucrado en la inducción y morfogénesis de las agallas (McCalla et al., 1961; Miles, 1968; Rohfritsch y Shorthouse, 1982; Hori, 1992, citado en Shorthouse y Rohfritsch, 1992; Leitch, 1994; Ananthakrishnan, 1998); la posibilidad de que exista un mecanismo de inducción molecular que involucre la transferencia de elementos genéticos no ha sido considerada ni explorada seriamente. Algunos investigadores como Ananthakrishnan (1998), Nieves- Aldrey, (1998), así como

Stone y Schönrogge (2003), han considerado la posibilidad de que un mecanismo a nivel genético molecular pueda estar mediando el proceso de formación y control de la morfogénesis de la agalla. Específicamente se ha sugerido que el insecto inductor podría insertar plásmidos, viroides o virus mutualistas en el genoma de la planta, los que regularían y controlarían el proceso de formación de las agallas. Sin embargo estos autores no ofrecen ninguna evidencia o trabajo que pueda sustentar esta afirmación. Las bases moleculares del proceso de inducción de las agallas de plantas inducidas por insectos es aún desconocido (Stone y Schönrogge, 2003). Por otra parte, la naturaleza fisiológica del estímulo dado por el insecto inductor y la influencia de su propia constitución genómica, así como la reacción generada por la planta, son preguntas que permanecen abiertas y sugieren la necesidad de realizar investigaciones más profundas en este campo (Ananthakrishnan, 1998).

Stone y Schönrogge (2003) mencionan tres grandes problemas o retos en la identificación de las molecular responsables del proceso de formación de las agallas. Primero, la dificultad de establecer ensayos apropiados para los tejidos de la planta involucrados en el proceso de inducción. En segundo lugar, las posibles moléculas inductoras utilizadas por los insectos, podrían ser químicamente similares a aquellas presentes normalmente en la planta. Y tercero, debido a que se espera que las señales provenientes del insecto generen una cascada de respuestas en la planta, es difícil separar el primer impacto morfogenético originado por el inductor, de la respuesta secundaria generada por la planta.

2.5) Comparación de la composición química entre agallas y otros tejidos de la planta:

Investigaciones realizadas en agallas de diferentes especies de plantas, han revelado que la composición y concentración de sustancias químicas en estas estructuras puede ser diferente al resto de tejidos u órganos de la planta. En este sentido, numerosos estudios como los realizados por Hartley y Lawton (citados por Ananthakrishnan 1998), han demostrado que las agallas inducidas por insectos de la familia Cynipidae, pueden contener altos niveles de ciertos metabolitos secundarios y nitrógeno.

Ananthakrishnan (1998), menciona que los tejidos cercanos al exterior de la agalla frecuentemente acumulan altos niveles de taninos y otros compuestos químicos, relacionados con el proceso de defensa de la agalla y en consecuencia también del insecto. Un estudio realizado por Vereecke *et al.* (1997), reveló que la composición química de extractos etanólicos y acuosos de agallas producidas en las hojas de *Nicotiana tabacum*, cambian drásticamente al compararlos con extractos de tejidos de la planta no infectados. Se ha reportado que las concentraciones de algunos carbohidratos como sacáridos hemicelulosicos, xilosa y arabinosa, se incrementa durante el desarrollo de agallas en *Zelcowa serrato* (Yeo *et al.*, 1997). Otros investigadores también han reportado diferencias en las concentraciones de ciertos compuestos secundarios en los tejidos que forman las agallas (Kraus y Spiteller, 1997; Pinkwart *et al.*, 1997). Vaneckova (1998) analizó también los contenidos de calcio, magnesio, potasio y plomo en agallas de seis especies de dípteros y encontró que el contenido de estos elementos químicos puede variar al comparar las agallas con el tejido normal de la planta. La diferencia más significativa se encontró en los niveles de potasio, los cuales son significativamente mayores en el tejido agálico.

Un gran número de autores han reportado altas concentraciones de ciertas sustancias nutritivas en los tejidos de las agallas, algunas de estas sustancias incluyen, proteínas, fosfatos, lípidos y compuestos nitrogenados. En contraposición a este descubrimiento, algunos investigadores han descrito que las agallas pueden presentar bajos niveles de ciertos compuestos químicos, relacionados al parecer con procesos de defensa en la planta, este es el caso por ejemplo de determinados compuestos fenólicos (Price *et al.*, 1986).

Debido al hecho de que muchas agallas presentan altas cantidades de ciertos nutrientes y bajos niveles de sustancias químicas nocivas para el insecto. Se ha postulado una hipótesis que asume que los insectos inductores de agallas son capaces de manipular el desarrollo de sus plantas hospederas, para así producir tejidos con un mayor valor alimenticio (hipótesis nutricional). No obstante varios estudios realizados recientemente con el objetivo de demostrar esta hipótesis, revelaron que las concentraciones de ciertos compuestos químicos considerados como de defensa en las plantas, están en mayores concentraciones en los tejidos formados por las agallas, lo

cual es contrario a la hipótesis en mención y plantea la necesidad de un replanteamiento de la misma (Nyman y Julkunen, 2000).

Tomando como referencia numerosos estudios, como los realizados por Nyman y Julkunen (2000), con respecto a la comparación de la composición química entre agallas y tejidos normales de las plantas, se podría afirmar que los insectos inductores de agallas controlan las propiedades químicas de estas estructuras.

III) OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN:

El propósito de esta investigación es el estudio de algunos aspectos relacionados con las interacciones moleculares entre los insectos inductores de agallas y las plantas hospederas.

Para alcanzar este propósito, se han planteado los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL:

- Estudiar la posible inserción de elementos genéticos externos al genoma de las plantas hospederas, como base de un probable mecanismo molecular involucrado en la formación de agallas de plantas.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Elegir un modelo Insecto – Planta hospedera– Agalla que proporcione las facilidades y ventajas adecuadas para su estudio.
- Determinar y optimizar diferentes metodologías para la extracción de ADN a partir de las plantas y agallas, así como de las larvas del respectivo insecto inductor. Seleccionando aquellas que resulten más apropiadas para realizar los análisis respectivos.
- Comprobar la existencia de elementos genéticos externos al genoma de la planta, por medio de la implementación de la metodología de RAPDs.
- Clonar en vectores de expresión apropiados, los fragmentos de ADN amplificados diferencialmente a partir de las agallas.
- Diseñar iniciadores específicos de PCR para las secuencias de inserción presentes en los tejidos que conforman la agalla, a partir de la información generada.

- Evaluar los iniciadores de PCR diseñados como marcadores específicos de agallas, en un tipo de agalla diferente a la inducida en el sistema escogido como modelo para el trabajo de investigación.
- Determinar la presencia de la secuencia de inserción obtenida a partir del ADN de agallas en el insecto inductor.
- Generar un modelo hipotético con los resultados del estudio, que explique el posible mecanismo de inducción para el tipo de agalla considerado en la presente investigación.

IV) METODOLOGIA:

4.1 Selección de un modelo idóneo:

La escogencia se realizó tomando en consideración aspectos tales como la disponibilidad y distribución de las agallas e importancia económica de la planta hospedera, así como el hecho de que el insecto inductor y la planta hospedera están identificados taxonómicamente y además la agalla inducida es una agalla compleja. También se consideraron ciertos aspectos de la biología y ecología del sistema, que contribuyen a que estas estructuras resulten interesantes y apropiadas para llevar a cabo este tipo de estudios. En este sentido se eligió el sistema de agallas cilíndricas inducidas en yuca (*Manihot esculenta*) por el insecto *Latrophobia brasilensis* (Montaldo, 1977). La agalla inducida por este insecto induce una coloración rojo brillante en la superficie de la agalla (ver figura 3).

Para constatar la utilización de los iniciadores diseñados como marcadores específicos de agallas en otro sistema de agallas diferente al inducido en plantas de yuca, se escogió un tipo de agalla presente en la planta *Cousarea hondensis* (identificada por Alonso Quesada, herbario del Museo Nacional, San José, Costa Rica); para observar la morfología de este tipo de agalla ver la figura 4.

4.2 Purificación de ADN:

Se realizaron purificaciones de ADN en las agallas de las plantas de yuca y en los tejidos de hojas circundantes a esta estructura. La cantidad de material vegetal utilizado en las extracciones de ADN fue mayor en las hojas que en las agallas. La cantidad de muestras procesadas tanto de hojas como de agallas, fue de aproximadamente cincuenta. Las muestras colectadas y procesadas provienen de diferentes variedades de yuca pertenecientes a un banco de germoplasma presente en la Sede San Carlos del Instituto Tecnológico de Costa Rica. También se colectaron muestras en plantaciones presentes en fincas propiedad del Instituto Tecnológico de Costa Rica, Sede San Carlos, ubicadas en la comunidad de Santa Clara de San Carlos, Región Huetar Norte de Costa Rica.

Se probaron diferentes metodologías para la extracción y purificación de los ácidos nucleicos, la elección del método de purificación más adecuado se realizó de acuerdo a la cantidad y calidad de las moléculas de ADN purificadas. La calidad de los ácidos nucleicos se estimó visualmente por medio de electroforesis en geles de agarosa.

La metodología seleccionada para llevar a cabo la extracción de ADN de hojas y agallas de yuca, corresponde a un protocolo de extracción tomado y modificado a partir de Dellaporta *et al.* (1983), e implementado en el CIAT de Colombia. El **primer** paso para la extracción es lavar las hojas y agallas con jabón líquido y etanol al 70%. Luego se cortan las agallas por la mitad con la ayuda de un bisturí estéril y se eliminan tanto la larva del insecto como la epidermis de la cámara interna. Esto permite eliminar posibles contaminaciones de la muestra con el ADN de microorganismos, ácaros y algunos tipos de insectos, que bajo ciertas condiciones pueden desarrollarse y crecer en la cámara interna de la agalla. Después las agallas se lavan nuevamente con etanol al 70% y se les adiciona 1.0 ml de solución amortiguadora de extracción de ADN (100 mM Tris – HCl, pH: 8.0, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, Mercaptoetanol al 0.7 % y Polivinil Pirrolidona al 2 %). Se procede luego a triturar de 150 – 250 mg de material vegetal (agallas individuales de 40- 70 mg) en morteros limpios esterilizados, previamente tratados con hipoclorito de sodio al 3.5% y lavados con etanol al 70% y agua destilada

estéril. Posteriormente se transfiere el material vegetal triturado y homogenizado a tubos plásticos limpios de 1.5 ml. Manteniendo los tubos siempre sobre hielo se agregan 75 μ l de SDS al 20 %; la mezcla se incuba luego en un baño de agua a 65 °C por 10 minutos y después se le añaden 340 μ l de acetato de potasio 5 M, mezclando vigorosamente. Después se incuba la mezcla resultante en hielo por 30 minutos y se centrifuga la misma a 15 000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. Se colecta la fase superior y se transfiere a tubos plásticos limpios de 1.5 ml, luego a la fase superior obtenida se le realizan dos o tres extracciones con un volumen de Fenol-cloroformo– alcohol Isoamilo, para lo cual se agita la solución en el mezclador “vórtex” por 1 –2 minutos y después se centrifuga la misma por 2 a 3 minutos, colectando la fase superior y transfiriéndola nuevamente a tubos limpios. Posteriormente se agrega un volumen de cloroformo– Isoamilo y se agita la mezcla en el “vórtex” durante 1 a 2 minutos, luego se centrifuga por 2 a 3 minutos a 10 000 rpm, colectando la fase acuosa superior y transfiriendo la misma a tubos limpios de 1.5 ml. Los ácidos nucleicos se precipitan con un volumen de isopropanol, la mezcla se agita suavemente y se deja reposar por dos horas o toda la noche a 4°C. La solución resultante se centrifuga por 15 minutos a 14 000 rpm, luego se seca el precipitado con los ácidos nucleicos a temperatura ambiente o a 35°C por 5 minutos en el concentrador de ADN. El precipitado se resuspende en un volumen de 50 μ l de agua bidestilada estéril, al cual se le agrega la cantidad de ARNasa necesaria para obtener una concentración final de 10 μ g / ml y se incuba por 30 minutos a 37°C. Posteriormente se realizan dos o tres extracciones con un volumen de cloroformo – Isoamilo y una extracción adicional con un volumen de cloroformo, repitiendo para tal fin la secuencia de mezcla, centrifugación y colecta de la fase acuosa superior seguida anteriormente para la extracción con Fenol-cloroformo– alcohol Isoamilo. Seguidamente se toman 700 μ l de la fase acuosa superior y se transfieren a tubos plásticos limpios de 1.5 ml. Los ácidos nucleicos se precipitan con un volumen de isopropanol, agitando suavemente la mezcla y dejándola reposar por dos horas o toda la noche a 4°C. El precipitado se obtiene centrifugando la mezcla anterior por 15 minutos a 14 000 rpm. Al precipitado obtenido se le agrega 1 ml de etanol frío al 70% y se centrifuga por 3 minutos a 14 000rpm, repitiendo la secuencia del paso anterior dos veces. Finalmente se seca el precipitado de ADN a temperatura ambiente (o a 35°C por 5 minutos en el concentrador de ADN) y se resuspende en 50 μ l de agua estéril calidad PCR (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA).

Para la primera extracción de ADN genómico a partir de hojas y agallas de yuca, se tomó material únicamente de una agalla, para así contabilizar un total de siete muestras tanto de hojas como de agallas; estas muestras provenían de diferentes plantas de yuca de la variedad Valencia, las cuales formaban parte de un banco de germoplasma del Instituto Tecnológico de Costa Rica, Sede San Carlos. La calidad del ADN extraído se estimó visualmente cargando 4 μ l del ADN resuspendido en agua calidad PCR, en un gel de agarosa al 0.8 % y en solución amortiguadora TBE 0.5 X, a 75 voltios por aproximadamente una hora y quince minutos. Para la segunda extracción de ADN genómico, las muestras fueron colectadas a partir de plantas de yuca de la variedad Valencia, en viales de cristal conteniendo etanol al 95% sobre hielo. Al siguiente día, las muestras fueron colocadas en un congelador de -70 °C. Dentro de una cámara de flujo laminar, las muestras fueron después lavadas cuidadosamente con etanol al 70% y luego se les extrajo la larva (si esta estaba presente) y el tejido circundante a la cámara interna de la agalla. Posteriormente se procedió a lavar nuevamente con etanol de 70% el material vegetal resultante de la disección. La calidad del ADN purificado se estimó visualmente cargando 2 μ l del ADN resuspendido en agua calidad PCR, en un gel de agarosa al 0.8 % y en solución amortiguadora TBE 0.5 X, el cual se separó a 85 voltios por aproximadamente una hora. Procediendo de igual forma que en las purificaciones anteriores, se realizó una nueva extracción de ADN, que incluye las muestras de la número 14 a la 36. Las muestras de la número 14 a la número 31 corresponden aparentemente al tipo de agalla colectada en la variedad Valencia, en tanto que para las agallas de las muestras 32 a 36, no se pudo diferenciar el tipo de variedad de yuca al que pertenecen. Lo anterior debido a las similitudes existentes entre las variedades de yuca presentes en el banco de germoplasma, lo que posteriormente no fue posible determinar dado que estos materiales fueron eliminados por el Instituto Tecnológico de Costa Rica. El ADN purificado fue visualizado cargando 6 μ l de ADN de agallas y 3 μ l de ADN de hojas, en un gel de agarosa al 0.8 % y en solución amortiguadora TBE 0.5 X, el cual se separó a 75 voltios por aproximadamente una hora. Los ADNs fueron resuspendidos en 50 μ l de agua bidestilada y desionizada estéril. Utilizando el procedimiento descrito con anterioridad para colectar y limpiar las agallas, se realizó una nueva purificación de ADN total a partir de diferentes muestras de tejido sano de hojas y a partir de las agallas presentes en estas hojas. A diferencia de las

purificaciones anteriores, para esta extracción de ADN se procedió a tomar más de una agalla por hoja, en la mayoría de las muestras. Así para la muestra 37 se tomaron 2 agallas, para la 38 se tomaron 2 agallas, 4 agallas en la muestra 39, 5 agallas en la muestra 40, 5 en la 41, 3 en la muestra 42, 9 en la muestra de agallas 43₁, 1 agalla en la muestra 43₂, 8 agallas en la muestra 44, 9 agallas en la muestra 45₁ y 1 agalla en la muestra 45₂. Las muestras de la número 37 a la 42 corresponden a las colectadas en la variedad Valencia y de la número 43 a 45 corresponden a las colectadas a partir de la variedad México. En la última extracción de ADN se cuantificó la presencia de larvas en las respectivas muestras de agallas colectadas. Así en las dos agallas disectadas en las muestras 37 y 38 respectivamente y en las tres agallas de la muestra 42, no se observó la presencia de larvas en la cámara interna. Para la muestra de agalla 39 se observó la presencia de la larva en las cuatro muestras colectadas, pero una de las larvas mostró claramente la presencia de lo que parece ser un ectoparásito. En las muestras 40 y 41 respectivamente, se pudo observar la presencia de la larva únicamente en una de las cinco agallas disectadas. Para las muestras 43₁ y 44 se observó la presencia de la larva en tres de las nueve agallas colectadas. Por su parte en la muestra de agallas 45₁ se detectó la presencia de la larva en cinco de las nueve agallas disectadas. Finalmente en la muestra de agallas 43₂ y en la 45₂, se constató la presencia de la respectiva larva en la única agalla colectada.

4.2.1 Extracción y purificación de ADN genómico de larvas de Latrophobia brasilensis y de hojas y agallas de la planta Cousarea hondensis colectadas en el bosque:

Para realizar la extracción de ADN a partir de larvas de *Latrophobia brasilensis*, se colectaron y disectaron una gran cantidad de agallas, provenientes de cultivos de yuca de la variedad Valencia, aledaños a la comunidad de Santa Clara de San Carlos. Las larvas fueron extraídas de las agallas, cortando estas estructuras cuidadosamente por la mitad con la ayuda del bisturí. Se colectaron únicamente las larvas de apariencia sana, esto es sin la presencia de ectoparásitos, de color muy definido (anaranjado claro) y que presentaban una gran actividad. Se colectaron aproximadamente 25 larvas con las características antes mencionadas. Las larvas fueron colectadas con una pinza

estéril en un tubo plástico de 1.5 ml, conteniendo etanol al 70%. Posteriormente se guardó el tubo con las larvas en un congelador de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

En la extracción de ADN se utilizó el mismo protocolo utilizado para las extracciones de ADN genómico descrito en la sección 4.2.1, excepto que la muestra de larvas fue tratada con proteinasa K a una concentración final de $100\text{ }\mu\text{g/ ml}$. La muestra se incubó durante aproximadamente una hora a una temperatura de $65\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente a la muestra de larvas tratada con proteinasa K, se le realizaron tres extracciones con un volumen de Fenol- cloroformo – Isoamilo (PCI), agitando en un mezclador “vortex” por 1 – 2 minutos y luego se centrifugó por 2 – 3 minutos a $10\ 000\text{ rpm}$. Seguidamente se colectó la fase superior y se transfirió a un tubo limpio de 1.5 ml para continuar con el proceso de purificación.

La purificación de ADN a partir de hojas y agallas de la planta *Cousarea hondensis* se realizó colectando varias agallas en una muestra única y tomando tejido proveniente de las hojas sobre las cuales se desarrollaron las agallas. Las muestras fueron colectadas en una zona de bosque perteneciente a la cooperativa de autogestión Coope San Juan R. L., en la comunidad de Pital de San Carlos, Alajuela, Costa Rica. Después de coleccionar el material vegetal las muestras se transportaron en recipientes plásticos conteniendo etanol al 70%, estos recipientes posteriormente se guardaron en un congelador a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento en que se realizó la extracción de los ácidos nucleicos. Antes de realizar la extracción del ADN las muestras fueron lavadas *cuidadosamente dentro de una cámara de flujo laminar con etanol al 70%*. Luego a las agallas se les extrajo tanto la larva (si esta estaba presente) como el tejido circundante a la cámara interna de esta estructura. Posteriormente, se lavó nuevamente el material vegetal resultante de la disección con etanol de 70%. La cantidad de material vegetal utilizado en las extracciones de ADN fue similar tanto en las hojas como en las agallas. En las extracciones de ADN se utilizó el mismo protocolo descrito en la sección 4.2.1 para las plantas de yuca.

La calidad de los ácidos nucleicos se estimó visualmente, cargando 2 μ l del ADN resuspendido en agua calidad PCR, por medio de electroforesis en geles de agarosa al 0.8 % y en solución amortiguadora TBE 0.5 X, a 75 voltios por aproximadamente una hora y quince minutos.

4.3 Detección de bandas de ADN amplificadas diferencialmente en agallas mediante RAPDs (ADN Polimorfo Amplificado Aleatoriamente):

La metodología de RAPDs tiene como principio la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La técnica de PCR permite la amplificación específica de regiones de un genoma flanqueadas por secuencias conocidas de nucleótidos. Oligonucleótidos diseñados con homología a las secuencias flanqueantes son utilizados como iniciadores para la polimerización y amplificación del ADN de la región de interés. La técnica de RAPDs es una modificación de la técnica de PCR, en la cual se utilizan uno o dos tipos de oligonucleótidos cortos (decámeros) conteniendo secuencias aleatorias. Esto permite la amplificación aleatoria de diferentes bandas de ADN o regiones del genoma de un organismo, flanqueadas por las secuencias de los respectivos oligonucleótidos, sin que se conozca su genoma, pues estos decámeros siempre encuentran una secuencia complementaria (Williams *et al.*, 1990; Welsh y McClelland, 1990; Anollés y Gresshoff, 1997; Micheli y Bova, 1997).

La presencia de elementos genéticos "foráneos" en los tejidos que forman las agallas en yuca (*Manihot esculenta*), se determinó inicialmente mediante el análisis de RAPDs, aplicados simultáneamente y de forma comparativa a muestras de ADN genómico, tanto de hojas sanas, como a las agallas presentes en estos tejidos para cada planta individual. Algunas de las muestras de ADN genómico de agallas se obtuvieron a partir de agallas individuales y otras a partir de grupos de agallas presentes en la misma hoja. En la figura 3, se esquematiza el proceso teórico por medio del cual se obtendrían las bandas de ADN amplificadas diferencialmente, a partir de las muestras de agallas.

Se probaron varias reacciones de RAPDs en combinación con diferentes iniciadores, condiciones y programas de reacción. Se emplearon los iniciadores aleatorios de PCR OPC- 06, OPI- 04, OPA-03, OPD-18, OPD-03, OPE-06, OPA-17 y OPB-04 (Operon Technologies, Alameda, California, USA), e iniciadores específicos de 10 bases, correspondientes a secuencias de inserción muy conservadas del gen que codifica para la enzima triptófano monooxigenasa (iaaM), iniciadores iaaM For., 5¹-GTAAGTGGCC-3¹ e iaaM Rev., 5¹ -TCCAATTTCT-3¹ y por otra parte para el gen que codifica para la enzima isopentil transferasa (ipt); iniciadores ipt F., 5¹-CGGTGAACGA-3¹ e ipt R., 5¹-TGTTTGCTAGC-3¹ (sintetizados en el Centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica). Los genes iaaM e ipt están presentes en líneas del género *Agrobacterium* (*A. vitis* y *A. tumefaciens*) y también presentan genes homólogos en *Erwinia herbicola*, y específicamente para el gen iaaM en *Pseudomonas syringae*. Los iniciadores de RAPDs para estos genes se obtuvieron a partir de los alineamientos realizados con el programa DNA Star Lasergene 99 (Madison, Wisconsin, USA). La secuencia de nucleótidos de estos genes fueron obtenidas del National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/). Los números de accesoión para los diferentes genes iaaM son M91609, Z18270, X77327, U04358 y L33867, para los genes ipt son X77327, X53945, X17428, M91610 y Z46375. Las enzimas para las que codifican ambos genes están involucradas en la síntesis de reguladores de crecimiento vegetal. Se realizaron varias repeticiones de algunas de las reacciones bajo distintas condiciones. Aunque se realizaron un gran número de pruebas de RAPDs, las reacciones que mostraron mejores resultados de acuerdo a los objetivos planteados para el trabajo de investigación que se esta considerando, son las que se detallan y resumen a continuación.

Las reacciones fueron numeradas de acuerdo a los parámetros y condiciones específicas de las mismas. Así para el **PAPD- 01**, los reactivos y la concentración final de estos en las reacciones realizadas fueron: Solución amortiguadora de PCR 1X (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50% glicerol, 0.5 % Tween, 1% Triton X-100), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, H₂O calidad PCR (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA), 0.5 µl de Taq Polimerasa (Tico Taq. lote 22),

0.4 μM de los iniciadores OPA-03/ OPA- 17 (Operon Technologies, Alameda, California, USA), 60 ng de ADN de las muestras, todo hasta un volumen final de 25 μl . Las reacciones de RAPDs fueron realizadas con el programa Agallas 2, en un termociclador PTC- 100 de MJ- Research (MJ- Research, Waltham, Massachussets, USA). El programa inicia con 3 minutos a una temperatura de 94 $^{\circ}\text{C}$, seguido de 1 minuto a 94 $^{\circ}\text{C}$, luego se da un decrecimiento en la temperatura desde 65 $^{\circ}\text{C}$ a 37 $^{\circ}\text{C}$ a una razón de 5 $^{\circ}\text{C}$ cada 10 segundos; con 1 minuto y 30 segundos a 72 $^{\circ}\text{C}$. Posteriormente 40 ciclos de 30 segundos a 94 $^{\circ}\text{C}$, 30 segundos a 37 $^{\circ}\text{C}$ y 1:30 minutos a 72 $^{\circ}\text{C}$, seguido de una extensión final de 5 minutos a 72 $^{\circ}\text{C}$.

En el **RAPD- 02** se usaron los iniciadores iaaM For. e iaaM Rev., las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo con el programa Agallas 2, en un termociclador PTC- 100 (MJ- Research, Waltham, Massachussets, USA), bajo las mismas condiciones que las realizadas para el RAPD-01.

Las reacciones para el **RAPD- 03** se realizaron a un volumen final de 25 μl en H_2O calidad PCR, solución amortiguadora de reacción de PCR 1X (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50% glicerol, 0.5 % Tween, 1% Triton X-100), 1.5 mM de MgCl_2 , 0.2 mM dNTPs (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA), 0.5 μl de Taq Polimerasa (Tico Taq. lote 23), 0.8 μM de iniciador iaaM Rev., 19.5 μM de iniciador ipt F. y 4 μl de ADN de las muestras, a una dilución de 1/15 a partir de la solución madre. El programa RAPD*Ag2 fue el utilizado para realizar las amplificaciones (termociclador PTC- 100; MJ- Research, Waltham, Massachussets, USA). El programa inicia con 3 minutos a 94 $^{\circ}\text{C}$, seguido de 42 ciclos a 94 $^{\circ}\text{C}$ por 30 segundos, 32 $^{\circ}\text{C}$ por 30 segundos y 72 $^{\circ}\text{C}$ por 1: 30 minutos, seguido de una extensión final de 5 minutos a 72 $^{\circ}\text{C}$.

El **RAPD- 04** se realizó con el programa de PCR RAPD*Ag3, en un termociclador MJ- Research PTC-100 (MJ-Research, Waltham, Massachussets, USA). El programa inicia con 3 minutos a 94 $^{\circ}\text{C}$, seguido de 42 ciclos a 94 $^{\circ}\text{C}$ por 30 segundos, 36 $^{\circ}\text{C}$ por 30 segundos y 72 $^{\circ}\text{C}$ por 1: 30 minutos, seguido de una extensión final de 5 minutos a 72 $^{\circ}\text{C}$. Los componentes y concentraciones finales de las reacciones fueron, Solución amortiguadora de PCR 1X (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1

mM DTT, 50% glicerol, 0.5 % Tween, 1% Triton X-100), 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA), 0.5 µl de Taq Polimerasa (Tico Taq. lote 22), 10 µM de iniciador ipt F., 4 µM de iniciador ipt R. y 6 µl de ADN de las muestras (20-100 ng), todo en un volumen final de 25 µl de H₂O calidad PCR (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA).

Inicialmente se realizó una prueba con el objetivo de optimizar algunas condiciones de reacción para los RAPDs, utilizando un termociclador de gradientes PTC- 200 DNA Engine (MJ-Research, Waltham, Massachusetts, USA). La prueba llamada **RAPD-Prugrad1** se realizó con el programa de amplificación RAPAGA-2, que inicia con 3:30 minutos a 94 °C, seguido de 15 ciclos a 94 °C por 30 segundos, un gradiente de 34 °C a 40 °C por 30 segundos y 72 °C por 2 minutos; posteriormente 30 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 46 °C por 30 segundos y 72 °C por 2 minutos, seguido de una extensión final de 5 minutos a 72 °C. Los gradientes generados por columna fueron los siguientes: col.1=34°C, col.2=34.2°C, col.3=34.5°C, col.4=35°C, col.5=35.7°C, col.6=36.6°C, col.7=37.6°C, col.8=38.5°C, col.9=39.1°C, col.10=39.5°C, col.11=39.9°C, col.12=40°C. Los reactivos y las concentraciones finales de estos en las reacciones fueron: solución amortiguadora PCR 1X (750 mM Tris-HCl [pH 8.8], 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% Tween 20), 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 2 unidades de Taq Polimerasa, 0.4 µM de iniciador ipt F. (Fermentas Life Sciences, Lithuania) y 2 µl de ADN de las muestras 40 y 41, a una dilución de 1/10 a partir de la solución madre; todo ajustado a un volumen final de 25 µl de H₂O calidad PCR (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA).

Los componentes y concentraciones finales de las reacciones para el **RAPD-05** fueron, solución amortiguadora de PCR 1X (750 mM Tris-HCl [pH 8.8], 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% Tween 20), 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 2 unidades de Taq Polimerasa, 0.8 µM de iniciador ipt F. (Fermentas Life Sciences, Lithuania) y 4 µl de ADN de las muestras (diluciones de 1/10 a partir de la solución madre), todo en un volumen final por muestra de 25 µl de H₂O calidad PCR (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA). Las reacciones fueron llevadas a cabo en un termociclador de gradientes PTC- 200 DNA Engine (MJ-Research, Waltham, Massachusetts, USA), las mismas se realizaron con el programa RAPAGA- 03, que inicia con una temperatura de 94 °C por 3:30 minutos, seguido de 15 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a

34.5 °C y 2 minutos a 72 °C; luego 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 30 segundos a 46 °C y 2 minutos a 72 °C, seguido de una extensión final de 7 minutos a 72 °C.

Para las reacciones del **RAPD- 06** se utilizó el iniciador ipt F. a 0.8 µM, solución amortiguadora de PCR 1X (750 mM Tris-HCl [pH 8.8], 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% Tween 20), 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 1.75 unidades de Taq Polimerasa (Fermentas Life Sciences, Lithuania) y 10 ng de ADN por reacción, todo a un volumen final de 25 µl de H₂O calidad PCR (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA). Las reacciones se realizaron con el programa de amplificación RAPAGA- 03, en un termociclador de gradientes PTC- 200 DNA Engine (MJ-Research, Waltham, Massachusetts, USA). El programa inicia con una temperatura de 94 °C por 3:30 minutos, seguido de 15 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 34.5 °C y 2 minutos a 72 °C; luego 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 30 segundos a 46 °C y 2 minutos a 72 °C, con una extensión final de 7 minutos a 72 °C.

Cuadro 1: Resumen de los principales RAPDs utilizados y las condiciones en las que estos se realizaron.

Nombre	Iniciador	Secuencia de iniciadores	Cantidad de ADN / 25 μ l de reacción	Programa de amplificación
RAPD -01	OPA-03	5' – AGTCAGCCAC -3'	60 ng	Agallas 2
	OPA- 17	5' -GACCGCTTGT-3'		
RAPD -02	iaaM F.	5' -GTAAGTGGCC-3'	60 ng	Agallas 2
	iaaM Rev.	5' -TCCAATTTCT-3'		
RAPD -03	ipt F. (Corriente arriba)	5' -CGGTGAACGA-3'	4 μ l de diluciones 1/15 a partir de la solución madre.	RAPD*Ag2
	iaaM Rev. (Corriente abajo)	5' -TCCAATTTCT-3'		
RAPD -04	ipt F. (Corriente arriba)	5' -CGGTGAACGA-3'	De 20 - 100 ng	RAPD*Ag3
	ipt R. (Corriente abajo)	5' -TGTTTGCTAGC-3'		
RAPD-Prugrad1	ipt F. (Corriente arriba)	5' -CGGTGAACGA-3'	2 μ l de diluciones 1/10 a partir de la solución madre.	RAPAGA- 02
RAPD -05	ipt F. (Corriente arriba)	5' -CGGTGAACGA-3'	4 μ l de diluciones 1/10 a partir de la solución madre.	RAPAGA- 03
RAPD -06	ipt F. (Corriente arriba)	5' -CGGTGAACGA-3'	10 ng	RAPAGA- 03

Los productos o bandas de ADN amplificadas por RAPDs fueron separados y visualizados por electroforesis en geles de agarosa. Los geles de agarosa fueron teñidos previamente, adicionando 1- 1.5 μ l de solución de bromuro de etidio a 10 mg/ml, cerca del punto de gelificación de la solución de TBE 0.5 X y agarosa calentada en horno de microondas. Las bandas amplificadas se cargaron en geles de agarosa entre 1 – 1.5 % y se corrieron en una solución amortiguadora TBE 0.5 X, a un voltaje promedio de 75 voltios. En las separaciones electroforéticas se utilizó una fuente de poder Power Pac 300 (Bio- Rad, Hercules, California, USA) y cámaras para electroforesis horizontal de esta misma compañía.

4.4 Purificación del plásmido Ri de *Agrobacterium rhizogenes*:

El plásmido Ri de *Agrobacterium rhizogenes* se utilizó como control positivo en algunas de las reacciones de PCR realizadas con la técnica de RAPDs. Esto debido a que se probaron varios iniciadores (decámeros) que presentan secuencias altamente conservadas, que corresponden a sitios de inserción de plásmidos bacterianos, tales como el plásmido Ri, involucrados en la transformación genética de células vegetales. Se purificó el plásmido Ri de *Agrobacterium rhizogenes* de acuerdo a la metodología sugerida en Maniatis *et al.* (1989). En la purificación se utilizaron bacterias de la línea silvestre A4 (proporcionada por la Dra. Rosaura Romero, Escuela de Química, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica) cultivadas en medio líquido YEB conteniendo 5 g/L de Extracto de Carne, 5 g/L de Peptona, 5 g/L de Sacarosa, 1 g/L de Extracto de Levadura, 492,8 mg/L de Mg SO₄ 7. H₂O y 15 g/L de Bacto Agar, a un pH de 6.8 (Yoshikawa y Furuya, 1987; Piñol *et al.*, 1996). Las bacterias se cultivaron a temperatura ambiente (aproximadamente 28 °C) por tres días.

4.5 Obtención y procesamiento de *Agrobacterium tumefaciens*:

Se utilizaron bacterias de la cepa C58C1 de *Agrobacterium tumefaciens* (proporcionadas por el Dr. Oscar Mascorro, Universidad Autónoma de Chapingo, México) como referencia para algunas de las reacciones de PCR realizadas con la técnica de RAPDs y para las reacciones llevadas a cabo con los iniciadores de PCR Aliprimer Forward y Aliprimer Reverse, utilizados a su vez como marcadores específicos para agallas. Se tomó una pequeña cantidad de bacterias crecidas en medio de cultivo sólido, con la ayuda de una punta plástica estéril para micropipeta. Después las bacterias se resuspendieron en 100 µl de agua calidad PCR (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA). Las bacterias resuspendidas en agua se desnaturalizaron por 5 minutos a 95 °C en un termociclador de gradientes PTC- 200 DNA Engine (MJ-Research, Waltham, Massachusetts, USA) y posteriormente se guardaron en un congelador a -30 °C.

4.6 Aislamiento, purificación y reamplificación de los fragmentos de ADN amplificados diferencialmente:

Los productos o fragmentos de ADN amplificados por RAPDs fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1.4 %, en solución amortiguadora TBE 0.5X o TAE 1X según corresponda, esto de acuerdo a las especificaciones dadas en los protocolos utilizados para aislar los fragmentos de ADN contenidos en los geles. Los fragmentos de interés separados por electroforesis se cortaron de los geles con la ayuda de un bisturí estéril. Posteriormente los fragmentos contenidos en los geles de agarosa se purificaron utilizando el protocolo descrito en "QIAquick Gel Extraction Kit" (QIAGEN, Hilden, Alemania), o de acuerdo a la metodología descrita en "Wizard PCR Preps DNA Purification Systems" (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA).

La primera reamplificación (REAMPLIFICACIÓN1) de los fragmentos amplificados inicialmente por RAPDs (amplificación diferencial a partir de ADN de agallas) y purificados por columnas como se detalló anteriormente, se realizó con el programa de PCR, RAPD*Ag3, en un termociclador PTC- 100 de MJ- Research (MJ-Research, Waltham, Massachusetts, USA). El RAPD*Ag3 inicia con 3 minutos a 94 °C, seguido de 42 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 36 °C por 30 segundos y 72 °C por 1 minuto y 30 segundos, posteriormente una extensión de 72 °C por 5 minutos. Los componentes y concentraciones finales de las reacciones fueron, solución amortiguadora PCR 1X (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50% glicerol, 0.5 % Tween, 1% Triton X-100), 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM dNTPs (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA), 0.8 µl de Taq Polimerasa (Tico Taq. lote 22), 10 µM de iniciador ipt For. y 0.8 µM de iniciador iaaM Rev. (sintetizados en el Centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica), y 24 µl del ADN purificado por columnas y resuspendido en H₂O; todas las reacciones fueron ajustadas a un volumen final de 50 µl de H₂O bidestilada, desionizada y autoclavada.

Las reacciones para la REAMPLIFICACIÓN-2, se realizaron con el programa de PCR, RAPD*Ag3, descrito para la REAMPLIFICACIÓN-1, en un termociclador PTC-

100 (MJ-Research, Waltham, Massachussets, USA). Los componentes y concentraciones finales de las reacciones fueron las utilizadas para la REAMPLIFICACIÓN-1, excepto que se utilizaron 0.5 μ l de Taq Polimerasa (Tico Taq. lote 22) y 10 μ M de iniciador ipt For. (sintetizado en el Centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica), así como 10 μ l del ADN resuspendido previamente purificado por columnas; todo ajustado a un volumen final de 25 μ l de H₂O bidestilada, desionizada y autoclavada.

En la REAMPLIFICACIÓN-3 los componentes y concentraciones finales en las reacciones fueron, solución amortiguadora PCR 1X (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50% glicerol, 0.5 % Tween, 1% Triton X-100), 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM dNTPs (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA), 0.5 μ l de Taq Polimerasa (Tico Taq lote 22), 6.3 μ M de iniciador ipt For. y 0.8 μ M de iniciador iaaM Rev. (sintetizados en el Centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica), 10 μ l del ADN resuspendido previamente y purificado por columnas; todo ajustado a un volumen final de 25 μ l de H₂O bidestilada, desionizada y autoclavada. Las amplificaciones se realizaron con el programa de PCR, REAM*Ag1, en un Termociclador PTC- 100 (MJ-Research, Waltham, Massachussets, USA). El programa REAM*Ag1 inicia con 4 minutos a 94 °C, seguido de 42 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos y 72 °C por 1 minuto y 30 segundos, posteriormente una extensión de 72 °C por 5 minutos.

Los componentes y concentraciones finales de las reacciones para la REAMPLIFICACIÓN-04 fueron, solución amortiguadora de PCR 1X (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50% glicerol, 0.5 % Tween, 1% Triton X-100), 1.5 mM de MgSO₄, 0.2 mM dNTPs, 1.5 unidades de TFI Polimerasa (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA), 3.2 μ M de iniciador ipt For. (sintetizado en el Centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica) y 10 μ l de ADN de las muestras (diluciones de 1/10 a partir de la solución madre), todo en un volumen final por muestra de 25 μ l de H₂O calidad PCR (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA). Las reacciones fueron llevadas a cabo en un Termociclador PTC- 100 (MJ-Research, Waltham, Massachussets, USA), las mismas se realizaron con el programa REAM*Ag2.

El programa inicia con una temperatura de 94 °C por 4 minutos, seguido de 42 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 46 °C y 2 minutos a 72 °C, luego una extensión final de 7 minutos a 72 °C.

Las condiciones de reacción para la REAMPLIFICACIÓN-05 fueron. solución amortiguadora de PCR 1X (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50% glicerol, 0.5 % Tween, 1% Triton X-100), 1.5 mM de MgSO₄, 0.2 mM de dNTPs, 1.0 unidad de TFI Polimerasa (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA), 3.2 μM de iniciador ipt For. y 3.2 μM de iniciador iaam Rev. (sintetizados en el Centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica), 5 μl de ADN de las muestras (diluciones de 1/10 a partir de la solución madre), todo en un volumen final por muestra de 40 μl de H₂O calidad PCR (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA). Las amplificaciones de las muestras se realizaron con el programa de PCR REAM*Ag2, que inicia con una temperatura de 94 °C por 4 minutos, seguido de 42 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 46 °C y 2 minutos a 72 °C, luego una extensión final de 7 minutos a 72 °C. Las reacciones fueron llevadas a cabo en un termociclador PTC- 100 de MJ- Research (MJ-Research, Waltham, Massachusetts, USA).

Para la REAMPLIFICACIÓN-06 las reacciones se llevaron a cabo con el programa de PCR REAMPLI-2 en un termociclador 96- Well Gene Amp[®] PCR System 9 700 (Applied Biosystems, Foster City, California, USA); el programa tiene una temperatura inicial de 94 °C por 3:30 minutos, seguido de 42 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 42 °C y 2:45 minutos a 72 °C, con una temperatura de extensión final de 72 °C por 7 minutos. Las reacciones se colocaron en el termociclador cuando la temperatura del bloque estaba a 94 °C. Los reactivos utilizados y sus respectivas concentraciones fueron, solución amortiguadora de PCR 1X (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50% glicerol, 0.5 % Tween, 1% Triton X-100), 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM dNTPs (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA), 1.5 μl Taq Polimerasa (Tico Taq. lote 36), 0.8 μM de iniciador ipt For. (Sintetizado en el Centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica), 5 μl de ADN a una dilución de 1/10 a partir de la solución madre,

todo en un volumen final de 25 μ l de H₂O calidad PCR (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA).

La REAMPLIFICACIÓN-07 se realizó para determinar la presencia de sitios complementarios de unión para los iniciadores diseñados como marcadores específicos de agallas, esto a partir de los fragmentos de ADN amplificados diferencialmente por medio de RAPDs en este tipo de estructuras. Los fragmentos amplificados diferencialmente a partir de las muestras de agallas por RAPDs y purificados posteriormente en columnas de purificación utilizando el protocolo QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania), fueron amplificados con el programa de PCR VERIFICA-1, termociclador 96- Well Gene Amp[®] PCR System 9 700 (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). El programa tiene un ciclo inicial de 3 minutos y 30 segundos a 94 °C, seguido de 42 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 50 °C y 2 minutos con 45 segundos a 72 °C, seguido de una extensión final de 72 °C por 7 minutos. Las reacciones se realizaron utilizando los iniciadores Aliprimer For. y Aliprimer Rev. a una concentración final de 0.8 μ M (sintetizados en el Centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica). Las concentraciones finales de los restantes reactivos de PCR fueron las mismas que las utilizadas en la REAMPLIFICACIÓN-06. Se agregaron 3 μ l de ADN de cada una de las muestras analizadas a un factor de dilución de 1/ 50, esto a partir del ADN resuspendido de las muestras. Todas las reacciones se ajustaron a un volumen final de 25 μ l de H₂O calidad PCR (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA).

4.7 Clonaje de fragmentos de ADN amplificados diferencialmente:

Los fragmentos de ADN amplificados diferencialmente a partir de agallas de *Manihot sculenta* (yuca) fueron clonados en el plásmido pAMP1 (GIBCO BRL- Life Technologies, Maryland, USA), los plásmidos posteriormente fueron transfectados en bacterias de la línea XL1- Blue de *Escherichia coli*. Se tomaron aleatoriamente replicas (clones) de algunas de las colonias de bacterias transfectadas con los vectores pAMP1 y se crecieron en medios selectivos de cultivo LB 1X conteniendo kanamicina a 25 μ g/ml y ampicilina a 100 μ g/ml, de acuerdo a lo indicado en Maniatis *et al.* (1989).

Posteriormente las bacterias fueron colectadas para la extracción del respectivo plásmido ("Miniprep"), utilizando para ello el protocolo de extracción descrito por Ausubel *et al.* (1995) en el Current Protocols in Molecular Biology.

Los plásmidos purificados a partir de los clones de *E. coli* XL1- Blue, fueron separados y visualizados en un gel de agarosa al 0.8%, TBE 0.5 X y 75 voltios, por 45 minutos.

4.8 Secuenciación:

La secuenciación de los fragmentos de ADN amplificados diferencialmente mediante RAPDs a partir del ADN de tejidos de agallas, se realizó secuenciando directamente los fragmentos obtenidos por PCR, o bien clonando los fragmentos dentro de un vector de expresión apropiado, para luego secuenciarlos. La secuenciación de los fragmentos amplificados diferencialmente por RAPDs se realizó utilizando el iniciador *ipt*- Forward (5'-CGGTGAACGA-3'), en un secuenciador automático de nucleótidos ABI PRISM™, 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer- Applied Biosystems, Foster City, California, USA), se siguió el protocolo del fabricante de Big Dye Terminador, versión. 2.0. Los fragmentos de ADN amplificados diferencialmente a partir de los RAPDs y utilizados para la secuenciación se purificaron con el protocolo QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania).

4.9 Reacciones de PCR con marcador específico para agallas:

Se diseñaron iniciadores específicos de PCR a partir de los alineamientos realizados con los fragmentos de ADN amplificados diferencialmente a partir de agallas y posteriormente secuenciados. Las secuencias mencionadas corresponden a un fragmento de aproximadamente 500 pb proveniente de la muestra de agalla 10, un fragmento de aproximadamente 500 pb presente en la muestra de agalla 11 y una mezcla de dos fragmentos de aproximadamente 500 pb provenientes de las muestras de agallas 8₁ y 8₂, presentes en una misma hoja de yuca. La finalidad de utilizar estos

iniciadores específicos es para la amplificación selectiva de un fragmento de ADN a partir de material de agallas y emplearlo de esta forma como marcador específico para este tipo de estructuras. Los iniciadores fueron diseñados utilizando el programa Primer Select, que forma parte del paquete de programas DNA Star Lasergene 99 (Madison, Wisconsin, USA). Los iniciadores fueron diseñados para amplificar una región de 240 pares de bases ubicada entre la posición 117 y la posición 357, de la secuencia de alineamiento consenso obtenida. La secuencia de nucleótidos del iniciador Aliprimer Forward es: 5¹-CGGCGCATTTCTGACCTG-3¹ y la secuencia del iniciador Aliprimer Reverse es: 5¹-AATGCTTGGACCGAAACCGAGACT-3¹ (sintetizados en el Centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica)

Las reacciones de PCR se realizaron con el programa ALIFIN- 03 en un termociclador de gradientes PTC- 200 DNA Engine (MJ-Research, Waltham, Massachusetts, USA). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µl con H₂O calidad PCR (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA), conteniendo solución amortiguadora de reacción de PCR 1X (750 mM Tris-HCl [pH 8.8], 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% Tween 20), 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 2 unidades de Taq Polimerasa (Fermentas Life Sciences, Lithuania), 0.1 µM de iniciadores Aliprimer Forward y Aliprimer Reverse (sintetizados en el Centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica) y 10 ng de ADN de las muestras. El programa ALIFIN- 03 inicia con 3 minutos y 20 segundos a una temperatura de 94 °C, seguido de 40 ciclos de 40 segundos a 94 °C, 40 segundos a 60 °C, 2 minutos a 72 °C, seguido de una extensión final de 7 minutos a 72 °C. La temperatura de transición entre cada paso del programa fue de 1 °C / segundo.

4.10 Secuenciación de fragmentos amplificados de forma específica a partir de agallas de *Manihot sculenta* (yuca):

La secuenciación de los fragmentos amplificados por PCR de forma específica a partir del ADN de agallas, se realizó utilizando el iniciador 5¹-CGGCGCATTTCTGACCTG-3¹ (Aliprimer Forward), en el secuenciador automático de

nucleótidos ABI PRISM™, 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer- Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Se siguió el protocolo del fabricante para el "BigDye Terminator versión. 3.1 Sequencing Kit" Los fragmentos de ADN amplificados se purificaron siguiendo el protocolo del QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania).

4.11 Análisis de los fragmentos de ADN secuenciados:

Los fragmentos de ADN amplificados diferencialmente por RAPDs a partir del ADN presente en los tejidos que forman las agallas y posteriormente secuenciados, fueron alineados utilizando el programa DNA Star Lasergene 99 (Madison, Wisconsin, USA) y el programa BioEdit versión 4.8.10.1 (Hall, 2000).

A la secuencia consenso de nucleótidos obtenida como resultado de los alineamientos de los fragmentos de ADN amplificados diferencialmente a partir de agallas, se le aplicó un análisis BLAST (Basic Logic Alignment Search Tool) utilizando los programas e información contenidos en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/), con el objetivo de encontrar regiones consenso o secuencias de nucleótidos similares a otros fragmentos de ADN o genes descritos en otros organismos.

Para un mejor entendimiento de la metodología, los principales pasos experimentales se resumen de forma esquemática en la figura 5. En la misma se indican de forma secuencial las principales técnicas utilizadas o sugeridas, y cómo estas se relacionan y complementan en conjunto.

V) RESULTADOS:

5.1 Extracción y purificación de ADN genómico de hojas y agallas de yuca:

Las primeras siete muestras de ADN genómico de yuca extraído a partir de las hojas y agallas presentes en las mismas, produjeron precipitados visibles en la mayor parte de las muestras. Estos precipitados se resuspendieron posteriormente en 100 µl de agua bidestilada estéril y desionizada. La calidad del ADN extraído fue determinada mediante un gel de agarosa al 0.8 %, lo que produjo bandas visibles que muestran poca degradación y de un alto peso molecular (resultado no mostrado). La segunda extracción de ADN incluye las muestras numeradas del número ocho al número 13. En todas las muestras se obtuvo un precipitado claro, los que posteriormente se resuspendieron en 50 µl de agua bidestilada, desionizada y autoclavada. El ADN extraído fue visualizado en un gel de agarosa al 0.8 %, lo que produjo bandas visibles de buena calidad y de alto peso molecular (imagen de la electroforesis no mostrada). Las nuevas extracciones realizadas que incluyen las muestras de hojas y agallas de la número 14 a la 36, fueron resuspendidas en 50 µl de agua estéril bidestilada y desionizada. El ADN purificado de las muestras 14 a la número 28, después de separarse en un gel de agarosa al 0.8 %, no se pudo observar el ADN, a excepción de la muestra de hoja y agalla 16. Las muestras de la 28 a la 36 fueron separadas también en un gel de agarosa al 0.8 %, lo que permitió visualizar bandas definidas de alto peso molecular y con escasa degradación en todas las muestras, excepto en la muestra de agalla 31 en la cual el ADN parece estar un poco degradado, y únicamente en la muestra de agallas 28 no se observa el ADN. También se puede observar en algunas de las muestras lo que parece ser ARN o ADN degradado de bajo peso molecular (ver Figura 5 como referencia). Las muestras purificadas de hojas y agallas de la número 37 a la 45, fueron separadas en un gel de agarosa al 0.8%, TBE 0.5 X y a 75 voltios. En todas las muestras se observa una banda compacta de ADN, de alto peso molecular, con poca degradación y en cantidades adecuadas, lo que sugiere la obtención de un ADN de buena calidad (imagen no mostrada).

En términos generales la intensidad de las bandas de ADN provenientes de las muestras de hojas, es mayor en comparación con las obtenidas a partir de las muestras de agallas. Este resultado refleja el hecho de que la cantidad de tejido vegetal utilizado en las extracciones de ADN de agallas fue menor a la utilizada en las extracciones para las muestras de hojas, lo anterior debido al pequeño tamaño que **presentan** las agallas de yuca. Las electroforesis de las extracciones de ADN tanto de hojas como de agallas se observan de forma representativa únicamente en la figura 5.

5.2 Extracción y purificación de ADN genómico de larvas de *Latrophobia brasilensis* y de hojas y agallas de la planta *Cousarea hondensis*, colectadas en el bosque:

Las extracciones de ADN a partir de larvas de *Latrophobia brasilensis* y de las muestras de hojas y agallas de la planta *Cousarea hondensis*, colectadas en la zona de **bosque** perteneciente a la Cooperativa de agricultores CoopeSan Juan R. L., Pital de San Carlos; mostraron bandas de alto peso molecular con poca degradación del ADN, esto al ser separadas en un gel de agarosa al 1%, TBE 0.5 X, a 85 voltios. por 45 minutos. No obstante, en la muestra de hojas se observa el ADN un poco más degradado y menos definido (resultados no mostrados).

5.3 Detección de bandas de ADN amplificadas diferencialmente en agallas mediante RAPDs (ADN Polimorfo Amplificado Aleatoriamente):

La calidad del ADN purificado así como las condiciones y programas de amplificación utilizados en esta investigación, permitieron obtener bandas amplificadas de buena calidad al utilizar la técnica de RAPDs. En general una vez dominados los aspectos técnicos de la prueba, la reproducibilidad y fiabilidad de la técnica de RAPDs fueron apropiadas para los fines del trabajo de investigación. Por otra parte, es importante aclarar que la determinación de las bandas amplificadas diferencialmente en agallas se realiza por medio de comparaciones pareadas, esto es comparando el ADN proveniente de tejido sano (hojas), con el ADN proveniente de los tejidos que conforman las agallas. Este procedimiento se realiza principalmente debido al hecho de

que las muestras colectadas proceden de diferentes variedades de yuca, las cuales formaban parte de una colección de plantas de esta especie (banco de germoplasma), colección que posteriormente fue eliminada.

Las pruebas de RAPDs realizadas con los iniciadores aleatorios de PCR OPA-03, OPD-18, OPA-17 y OPB-04, de Operon Technologies, así como con los iniciadores iaaM For., e iaaM Rev., derivados de secuencias de inserción conservadas del gen que codifica para la enzima triptófano monooxigenasa (gen iaaM presente en bacterias del género *Agrobacterium*), permitieron la amplificación de una serie de bandas tanto en las muestras de ADN de hojas como de agallas. Se realizaron varias reacciones alternadas con diferentes condiciones y programas de amplificación, no obstante, no se observó claramente la amplificación diferencial de fragmentos de ADN en las muestras de agallas, a excepción de unas pocas reacciones en las que parece observarse alguna amplificación diferencial, pero de forma muy leve y poco clara. Todas estas amplificaciones fueron realizadas con los programas RAPD- 01 y RAPD-02 y los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa al 1.4% (resultados no mostrados).

Las amplificaciones obtenidas con los RAPD- 03, RAPD- 04, RAPD- 05 y RAPD- 06, mostraron claramente la amplificación diferencial de una serie de bandas, a partir del ADN genómico de agallas de *Manihot esculenta*.

Las reacciones 03 y 04, fueron las primeras en mostrar de forma clara y evidente, bandas de ADN amplificadas diferencialmente a partir de las muestras de ADN de agallas (resultados no mostrados). También se amplificaron fragmentos de diferentes tamaños en la muestra que contenía el plásmido Ri de la línea A4 de *Agrobacterium rhizogenes*, utilizado como control positivo en estas reacciones. Los iniciadores utilizados en las reacciones RAPD- 03 fueron el ipt-F y el iaaM-Rev, en tanto que para el RAPD- 04 los utilizados fueron los iniciadores ipt-F e ipt- R. La utilización de los iniciadores ipt- F. e iaaM Rev, derivados de secuencias conservadas de los sitios de inserción del plásmido Ti de *Agrobacterium*, fueron los que generaron claramente mayores patrones diferenciales de amplificación. Particularmente el decámero iniciador ipt- F fue el que generó la mayor cantidad de bandas amplificadas diferencialmente

(Figuras 7, 8 y 9).

Para determinar la temperatura óptima de alineamiento para el iniciador ipt-F, se realizó una reacción con un gradiente de temperatura de 34 °C a 40 °C. El resultado de esta prueba mostró que al utilizar el programa de amplificación RAPD-Prugrad1, el mayor número de bandas amplificadas se obtuvo a una temperatura de 34.5 °C (ver figura 6).

Las reacciones realizadas con los RAPD- 05 y el RAPD- 06, mostraron bandas de ADN amplificadas más claras y definidas, con lo cual se eliminó en gran medida el “ruido de fondo” provocado por amplificaciones difusas y poco definidas. Las amplificaciones obtenidas permitieron obtener una gran cantidad de bandas amplificadas diferencialmente a partir de las muestras de ADN de agallas. Las bandas amplificadas diferencialmente para el RAPD- 05 presentan diferentes tamaños que van de aproximadamente 200 pb hasta 2 500 pb. Se puede observar también la amplificación de una banda intensa de aproximadamente 1 200 pares de bases en la muestra que contiene el plásmido Ri de la línea A4 de *Agrobacterium rhizogenes*. Además no se observa ningún producto amplificado en los controles negativos (ver detalles en la figura 7). Para el RAPD- 06, los productos de amplificación pueden observarse en las electroforesis de las figuras 8 y 9, en estas se aprecian claramente una serie de bandas amplificadas diferencialmente en todas las muestras de agallas. En las muestras de agallas analizadas, los fragmentos amplificados presentan tamaños que van de los 4 500 pares de bases a los 100 pares de bases. En la figura 8 se observa la amplificación de una serie de fragmentos a partir de la reacción que contiene ADN de *Agrobacterium tumefaciens*, así mismo en la figura 9 se puede observar también la amplificación de un escaso número de bandas en la reacción que contiene el plásmido Ri de la línea A4 de *Agrobacterium rhizogenes*. Los controles negativos para las reacciones realizadas con el RAPD- 06 no mostraron la amplificación de productos de PCR (ver figuras 8 y 9). Por otra parte, la resolución y claridad de las imágenes obtenidas en las separaciones electroforéticas de las figuras 8 y 9, es menor al compararlas con lo observado directamente en los geles, sin embargo se considera que la calidad de las mismas es adecuada para este trabajo de investigación.

Los fragmentos amplificadas diferencialmente en las diferentes pruebas de RAPDs varían en tamaño e intensidad entre las diferentes muestras analizadas, no obstante algunos de los fragmentos amplificadas diferencialmente parecen repetirse en diferentes muestras y en reacciones realizadas en diferentes momentos (ver figuras 7, 8 y 9). Al respecto, entre los fragmentos más importantes se puede señalar una banda de aproximadamente 300 pares de bases (figura 7, muestras de agalla 42 y 43₁; figura 8, agallas 31 y 38), un fragmento de aproximadamente 500 pb, presente en las muestras de agallas 38, 42, y 45₁, figura 7; agallas 37, 38, 43₁, 45₁ y 45₂, de la figura 8 y agallas 40, 42, 44, y 43₂ de la figura 9. Un fragmento de aproximadamente 1 100 pb presente en las muestras de agallas 37, 38, 40, 43₂ y 45₁, figura 7, agallas 31, 37, 38, 39, 45₁ y 45₂ de la figura 8, y en la figura 9 las agallas 35, 36, 42 y 43₂. Otro de los fragmentos observados presenta un tamaño aproximado de 1 300 pb, muestras de agalla 38, 40, 43₂ y 45₁ de la figura 7, agallas 32, 39 y 43₂ de la figura 8, así como las agallas 35, 45₁ y 45₂ de la figura 9. Se observó también la presencia de un fragmento de aproximadamente 1 800 pb en las muestras de agallas 35 y 45₂, figura 9 y otro de aproximadamente 2 000 pb en las agallas 42 y 45₂ de la figura número 7, la agalla 31 de la figura 8 y en la agalla 35 de la figura 9. Otro fragmento de aproximadamente 3 050 pb se observó en las agallas 37 y 43₁ de la figura 7, en la agalla 43₂ de la figura 8 y en las muestras de agallas 40 y 44 presentes en la figura 9. Además se observó la presencia de una banda de aproximadamente 4 100 pb en las muestras de agalla 38 y 43₂, de la figura 7.

Al comparar los fragmentos amplificadas diferencialmente entre las muestras de agallas individuales (muestras 43₂ y 45₂) y las muestras obtenidas colectando varias agallas en una misma muestra ("pooles" de agallas), que corresponden a las muestras 43₁ y 45₁, se puede observar la presencia de una serie de fragmentos amplificadas diferencialmente entre ambos tipos de muestras. Algunos de los fragmentos amplificadas diferencialmente están presentes tanto en las muestras de agallas individuales como en las muestras de agallas agrupadas, no obstante también se observa la presencia de bandas amplificadas únicamente en las muestras de agallas individuales o bien en las muestras de agallas agrupadas (ver detalles en las figuras 7, 8 y 9). Ambos tipos de muestras, agallas individuales y agallas agrupadas, provienen de la misma hoja.

5.4 Purificación del plásmido Ri de *Agrobacterium rhizogenes*:

Después de colocar un inóculo de bacterias de la línea A4 de *Agrobacterium rhizogenes* en medio YEB y dejarlas creciendo a temperatura ambiente (aproximadamente a 25 °C) por dos días y en agitación constante, se observó una gran turbidez en el medio de cultivo, lo que evidencia un crecimiento adecuado de la bacteria.

Los plásmidos purificados a partir de la línea A4 de *Agrobacterium rhizogenes* se resuspendieron en 60 µl de agua bidestilada estéril, desionizada y autoclavada. El ADN extraído fue visualizado en un gel de agarosa al 0.8 %, lo que produjo un fragmento visible muy definido y de alto peso molecular (resultado no mostrado).

5.5 Aislamiento, purificación y reamplificación de los fragmentos de ADN amplificados diferencialmente:

Algunos de los fragmentos de ADN amplificados diferencialmente a partir de las diferentes pruebas de RAPDs, fueron aislados y purificados para su posterior reamplificación. Estas reamplificaciones fueron realizadas para aumentar la concentración de los fragmentos purificados, para su posterior clonaje y secuenciación. Las reamplificaciones realizadas con las reacciones: Reamplificación- 01, Reamplificación- 02 y Reamplificación- 03, así como las condiciones de reacción asociadas a estas, permitieron la amplificación de algunas de las bandas seleccionadas (resultados no mostrados). Los fragmentos amplificados por medio de estas reacciones fueron aislados nuevamente por medio de columnas de purificación. En la figura 10 se puede observar la electroforesis de las bandas purificadas obtenidas con las Reamplificaciones 01, 02 y 03. En esta figura se puede observar en el carril 9, un fragmento de ~500 pb proveniente de la muestra de agalla 13₁ y 13₂ (banda común), reamplificada a partir de un fragmento original de ~1 100 pb. También se observa un fragmento de ~500 pb, proveniente de la muestra de agalla 35, reamplificada a partir de un fragmento original de ~1 500 pb (carril 7). Para el fragmento reamplificado de ~ 450

pb, proveniente de la muestra de agalla 35 (carril 6), el fragmento de ~ 500 pb, proveniente de la muestra de agalla 10 (carril 4), el fragmento de ~ 550 pb, proveniente de la muestra de agalla 11 (carril 3) y el fragmento de ~550 pb, proveniente de la muestra de agalla 8₁ y 8₂ (banda común) (carril 2); además de las bandas esperadas, también se observan bandas más tenues de aproximadamente 1 000 pb. En esta figura se observa además un fragmento de 150 pb proveniente de la muestra de agalla 8₂, en el carril 1. Así mismo en el carril 10 se puede observar un fragmento de ~300 pb, proveniente de la muestra de agalla 13₁ y 13₂ (banda común), reamplificada a partir de un fragmento original de ~1 100 pb y en el carril 8 se puede apreciar un fragmento de ~300 pb, proveniente de la muestra de agalla 35, reamplificada a partir de un fragmento original de ~1 500 pb. Para el carril 10 se observa también una banda más tenue de aproximadamente ~550 pb, que no corresponde al tamaño del fragmento esperado. Es importante resaltar que las bandas observadas en la figura 10 para los carriles 2, 3, 4, 6 y 10, que no corresponden a los tamaños esperados, en todos los casos parecen tener el doble del tamaño de las bandas esperadas.

En las reacciones de la reamplificación-04, ver figura 11-A, se logró únicamente la amplificación de un fragmento de aproximadamente 500 pb en las muestras de agallas 10 y 11, carriles 12 y 13 respectivamente. También se reamplificó un fragmento de unos 150 pb a partir de la muestra de ADN de agallas 8₂ (carril 9). Los fragmentos reamplificados corresponden a los esperados de acuerdo a su tamaño.

En la reamplificación- 05 se amplificó un fragmento de aproximadamente 1 100 pb, a partir de la muestra de agalla número 5, carril número 1 de la figura 11-B. Para estas mismas reacciones se observa la reamplificación de un fragmento de alrededor de 500 pb, proveniente de la muestra de agalla 10, carril número 9. Los fragmentos reamplificados corresponden en tamaño a los esperados. Ninguna de las muestras restantes amplificaron productos de PCR.

La electroforesis para las reacciones de reamplificación- 07, se muestra en la figura número 12. Cuatro de las seis muestras analizadas amplificaron un producto de PCR de aproximadamente 250 pares de bases. Para llevar a cabo estas reacciones de PCR, se utilizaron los iniciadores específicos para agallas Aliprimer Forward y Aliprimer Reverse. Las muestras que amplificaron la banda de 250 pb corresponden al fragmento de 550

pb (muestra de agalla 43₁), el fragmento de 1 300 pb (muestra de agalla 43₁), el fragmento de 1 200 pb (muestra de agalla 43₂) y el fragmento de 2 100 pb (muestra de agalla 43₂). El fragmento de 900 pb proveniente de la muestra de agalla 45₂, no amplificó ningún producto de PCR. El control negativo para estas reacciones de PCR no amplificó ninguna banda.

5.6 Clonaje de fragmentos de ADN amplificados diferencialmente a partir de agallas de yuca:

Las bacterias de la línea XL1- Blue de *Escherichia coli*, transfectadas con los vectores de clonaje (plásmidos) pAMP1 de Invitrogen- Life Technologies, en los cuales fueron introducidos los fragmentos de ADN amplificados diferencialmente a partir de ADN de agallas de yuca, mostraron el crecimiento de un gran número de colonias de bacterias, al cultivarse estas en medios selectivos sólidos (ver figura 13).

Los fragmentos escogidos para realizar el clonaje corresponden a los purificados y reamplificados a partir de las muestras de agallas presentes en las separaciones electroforéticas de las figuras 10, 11-A y 11-B.

Los plásmidos purificados a partir de los clones transfectados de la línea XL1- Blue de *E. coli* y seleccionados de forma aleatoria, mostraron bandas definidas de alto peso molecular y en concentraciones elevadas (imagen de la separación electroforética no mostrada). A partir de esta imagen se determinó también la presencia de restos de ARN en todas las muestras. Así mismo en algunos de los plásmidos purificados se puede observar la presencia de dos conformaciones o bandas diferentes.

Las diferentes reacciones de PCR realizadas con los iniciadores M13 PUC Forward y M13 PUC Reverse, así como con los iniciadores SP6 y T7, no amplificaron productos de PCR, a excepción de un fragmento de muy bajo peso molecular que no corresponde con los tamaños esperados de ninguno de los fragmentos clonados. Estas reacciones fueron llevadas a cabo para constatar la inserción de los fragmentos de ADN amplificados diferencialmente en los vectores de clonaje pAMP1.

Para corroborar la inserción en los vectores de clonaje pAMP1, de los fragmentos de ADN amplificados diferencialmente a partir de agallas, también se realizaron varias reacciones de digestión con las enzimas EcoRI y Hind III. En ninguna de las reacciones de digestión se pudo detectar la incorporación de los fragmentos clonados.

5.7 Secuenciación y análisis de los fragmentos de ADN amplificados diferencialmente:

Se obtuvo la secuencia de nucleótidos de tres de los nueve fragmentos preparados con este fin. Los tres fragmentos secuenciados provienen de distintas plantas de yuca, a saber una banda de aproximadamente 500 pb proveniente de la muestra de agalla 10, una banda de aproximadamente 500 pb presente en la muestra de agalla 11 y una mezcla de dos bandas de aproximadamente 500 pb provenientes de las muestras de agallas 8₁ y 8₂, que corresponden a dos agallas presentes en una misma hoja de yuca (imágenes de las electroforesis no mostradas). Inicialmente estas bandas fueron amplificadas diferencialmente por medio de RAPDs, luego fueron purificadas y reamplificadas nuevamente. Posteriormente, las bandas purificadas provenientes de las reamplificaciones fueron visualizadas por electroforesis. Las bandas secuenciadas corresponden a las observadas en los carriles 2, 3 y 4 de la figura 10. La secuencia de nucleótidos obtenida a partir del fragmento de la muestra de agalla 8₁ y 8₂ tiene un tamaño de 496 nucleótidos. La secuencia de nucleótidos correspondiente a la muestra de agalla 11 presenta un tamaño de 510 bases. Por su parte se obtuvo una secuencia de 510 nucleótidos a partir de la muestra de agalla 10. La secuencia de nucleótidos de los tres fragmentos secuenciados puede observarse en el alineamiento de la figura 14.

La secuencia consenso obtenida como resultado del alineamiento de las tres bandas de ADN amplificadas diferencialmente a partir del ADN de agallas y posteriormente secuenciadas, mostró la misma secuencia de nucleótidos en las bandas analizadas (ver figura 14).

El análisis "Blast" aplicado a las secuencias amplificadas diferencialmente (a partir del ADN de agallas) utilizando las bases de datos del Banco de Genes de la NCBI

(National Center for Biotechnology Information), no mostró ninguna similitud significativa con algún fragmento de ADN o gen descrito. Únicamente se detectaron algunas coincidencias poco significativas con secuencias no mayores a 25 pares de bases. Algunas de las similitudes que podrían considerarse corresponden por ejemplo a una región de 23 pares de bases en *Arabidopsis thaliana* (coincidencia del 95%), que corresponde a una región codificante del gen para la enzima Glucosiltransferasa, esto de acuerdo a lo mencionado en la base de datos del Banco de Genes. Otra coincidencia de 19 pares de bases corresponde al factor I de elongación de la traducción en *Fusarium solani*.

5.8 Reacciones de PCR utilizando marcador específico para agallas:

La secuencia de ADN consenso obtenida a partir del análisis de alineamiento de los fragmentos amplificados diferencialmente por RAPDs y posteriormente secuenciados, fue utilizada como plantilla para el diseño de iniciadores específicos de PCR. La región amplificada en la secuencia consenso y los sitios de unión de los iniciadores de PCR, denominados como Aliprimer Forward y Aliprimer Reverse, se muestran en la figura 14.

Las reacciones de PCR realizadas con los iniciadores diseñados como marcadores específicos para agallas, en muestras de hojas y agallas de yuca, generaron un producto de amplificación de aproximadamente 240 pares de bases en las diferentes muestras de agallas analizadas (figuras 15-A y 15-B).

Por otra parte, los iniciadores de PCR Aliprimer Forward y Aliprimer Reverse amplificaron también un fragmento de PCR de aproximadamente 240 pares de bases y otro de aproximadamente 450 pb en la muestra de ADN de larvas del insecto *Latrophobia brasiliensis* (ver figuras 16-A y 16-B). Estos marcadores específicos para agallas amplificaron también un fragmento de aproximadamente 240 pb y otro de aproximadamente 450 pb en la muestra de ADN de agallas presente en la planta *Cousarea hondensis* (en la figura 17 se muestra únicamente el fragmento de 450 pb). Así mismo se amplificaron una serie de bandas con tamaños comprendidos entre los 100 pb y los 1 200 pb en las muestras de *Agrobacterium tumefaciens* (figuras 16-A, 16-

B y 17). De igual forma a partir de las electroforesis de las figuras 16-A y 17, se observa la amplificación de diferentes bandas para la muestra del plásmido Ri de *Agrobacterium rhizogenes*. Es importante señalar que tanto para las muestras de ADN de larvas del insecto *Latrophobia brasiliensis*, la muestra de ADN de agallas de la planta *Cousarea hondensis*, así como para la muestra de *Agrobacterium tumefaciens* y la del plásmido Ri de *Agrobacterium rhizogenes*, se observa la amplificación de un fragmento de aproximadamente 240 pares de bases (ver figuras 16-A, 16-B y 17). Este fragmento de 240 pb corresponde en tamaño al esperado de acuerdo al diseño realizado con los iniciadores Aliprimer Forward y Aliprimer Reverse.

Todas las reacciones llevadas a cabo utilizando los iniciadores Aliprimer Forward y Aliprimer Reverse, fueron optimizadas para amplificar únicamente el fragmento esperado. Bajo ciertas condiciones de reacción se presentó la amplificación de bandas inespecíficas, tanto en las hojas como en las agallas de las diferentes muestras, aunque siempre se observó la presencia de la banda esperada en las muestras de agallas. La temperatura de alineamiento resultó ser un factor crítico, así al elevar paulatinamente la misma de 57°C (temperatura de alineamiento estimada inicialmente) hasta un valor de 60°C, se obtuvo únicamente la amplificación del fragmento esperado. Los iniciadores Aliprimer Forward y Aliprimer Reverse, fueron diseñados como marcadores específicos de la posible secuencia de inserción presente en el genoma de las células que conforman la agalla, esto inicialmente en plantas de yuca.

La electroforesis de la figura 12 muestra que algunos de los fragmentos de ADN amplificados diferencialmente por medio de RAPDs (esto a partir del ADN de agallas), contienen sitios de unión para los iniciadores específicos Aliprimer Forward y Aliprimer Reverse. De los cinco fragmentos analizados, cuatro amplificaron una banda de aproximadamente 240 pb. La banda amplificada corresponde en tamaño al producto de PCR esperado, esto de acuerdo al diseño de los iniciadores antes mencionados.

5.9 Secuenciación y análisis de los fragmentos de ADN amplificados por PCR con los iniciadores específicos diseñados para agallas:

Los productos de PCR amplificados con los iniciadores Aliprimer Forward y Aliprimer Reverse, en las muestras de agallas de yuca 38, 39 y 40 de la figura 15-A, fueron aislados y secuenciados posteriormente para su análisis.

El alineamiento realizado a los fragmentos secuenciados, mostró una misma secuencia de nucleótidos en las tres muestras analizadas (ver figura 18). Los fragmentos amplificados a partir de las muestras de agallas 38, 39 y 40, mostraron un tamaño similar y la misma secuencia de nucleótidos esperada de acuerdo al diseño realizado con los iniciadores Aliprimer Forward y Aliprimer Reverse.

VI) DISCUSIÓN:

Diferentes líneas de pensamiento relacionan las agallas de plantas inducidas por insectos con procesos de patogénesis, simbiosis, o bien con mecanismos de defensa de las plantas hospederas (Hartnett y Abrahamson, 1979; Price *et al.*, 1986). No obstante, las investigaciones recientes parecen indicar que los procesos involucrados en las interacciones de naturaleza simbiótica o patogénica, presentan una serie de mecanismos comunes.

El hecho de que diferentes grupos de insectos posean la capacidad de formar agallas en una gran variedad de plantas, ha motivado un gran número de investigaciones tendientes a dilucidar el mecanismo de inducción de este tipo de estructuras. A pesar de lo anterior y considerando además la importancia de las agallas como modelos para comprender una serie de procesos fundamentales en el desarrollo de las plantas, los mecanismos de inducción y el contexto evolutivo de este tipo de estructuras es aún poco entendido (Stone y Schönrogge, 2003). Se han propuesto una serie de hipótesis para tratar de explicar los mecanismos de inducción de las agallas de plantas; una de estas hipótesis sugiere que las agallas son el resultado de una irritación mecánica, producida en la planta debido a la presencia y actividad del respectivo insecto en sus tejidos. Otra de las hipótesis relevantes sostiene que las agallas son inducidas por la acción de sustancias químicas secretadas por los insectos inductores. Estas sustancias a su vez, estarían presentes en los fluidos salivales, estructuras ovipositoras o bien en los excrementos. Algunas de estas sustancias químicas incluirían a las Auxinas, Citoquininas, Ácido Indolacético (AIA) y otros tipos de compuestos. Sin embargo en relación con esta última hipótesis, el modo de acción de estas sustancias químicas y los procesos de desarrollo que estas alteran, es aún desconocido (Hori, 1992; en Rohfritsch y Shorthouse, 1992; Stone y Schönrogge, 2003). Finalmente otra hipótesis propone un mecanismo mediado por la acción de virus mutualistas u otro tipo de elemento genético, circunstancia que implicaría por lo tanto la transferencia de ADN hacia las células de la planta hospedera (Ananthakrishnan, 1998; Nieves-Aldrey, 1998; Stone y Schönrogge, 2003).

Los resultados obtenidos como parte de este proyecto de investigación, aportan nuevos elementos y evidencias en favor de un posible mecanismo de inducción mediado por un proceso de transformación genética de las células que conforman los tejidos de la agalla. Además como un producto derivado de este trabajo de investigación, se propone un posible modelo de inducción para las agallas de plantas inducidas por insectos, el cual se dilucidará de forma secuencial a lo largo de la discusión.

La presencia de secuencias de ADN insertadas en los tejidos que forman la agalla en plantas de *Manihot esculenta*, se determinó inicialmente por medio de la detección de bandas amplificadas diferencialmente a partir del ADN extraído de estas estructuras y separadas posteriormente mediante electroforesis, esto mediante la utilización de RAPDs; en otras palabras, bandas de ADN amplificadas “aleatoriamente” presentes en las muestras de agallas y ausentes en las muestras de tejido sano de la planta. En la figura 1 se esquematiza el proceso teórico por medio del cual se obtendrían las bandas de ADN amplificadas diferencialmente. La utilización de iniciadores decámeros derivados de secuencias conservadas de los sitios de inserción del plásmido Ti de *Agrobacterium*, fueron los que generaron claramente patrones diferenciales de amplificación, esto a partir del ADN aislado de las agallas. En este sentido el iniciador ipt – F fue el que generó el mayor número de fragmentos amplificados diferencialmente. Aún cuando los resultados obtenidos mostraron algunas diferencias en los patrones de amplificación entre las diferentes muestras analizadas, esto en relación con el número y tamaño de los fragmentos amplificados diferencialmente, es importante señalar que algunos de estos fragmentos se amplifican de forma constante en diferentes muestras y reacciones de RAPDs realizadas. En este sentido, se puede resaltar la presencia de un fragmento de aproximadamente 500 pb, amplificado en las muestras de agallas 38, 42, y 45₁, figura 7; agallas 37, 38, 43₁, 45₁ y 45₂, de la figura 8 y agallas 40, 42, 44, y 43₂ de la figura 9. Un fragmento de aproximadamente 1 100 pb presente en las muestras de agallas 37, 38, 40, 43₂ y 45₁, figura 7, agallas 31, 37, 38, 39, 45₁ y 45₂ de la figura 8, y en la figura 9 las agallas 35, 36, 42 y 43₂. Así mismo otro fragmento observado presenta un tamaño aproximado de 1 300 pb, muestras de agalla 38, 40, 43₂ y 45₁ de la figura 7, agallas 32, 39 y 43₂ de la figura 8, así como las agallas 35, 45₁ y 45₂ de la figura 9.

A partir del alineamiento realizado entre diferentes especies de bacterias que contienen el gen *ipt* (anexo 1), se puede observar que el iniciador *ipt-F* presenta una secuencia complementaria conservada de 10 pares de bases entre las posiciones 104 y 113, del gen que codifica para la isopentil transferasa (*ipt*), en el plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*. Además, se observa que el iniciador *ipt-F* presenta una homología de 9 pares de bases con respecto al gen *ipt* de la dimetilaliltransferasa en *Erwinia herbicola* (entre la posición 194 y la 203) y para el gen que codifica para la isopentil transferasa en el plásmido Ti de *Agrobacterium vitis* (posición 1070- 1079 pb). Al margen de los resultados y hechos anteriores, el polimorfismo obtenido con la utilización del marcador *ipt-F*, a partir de las diferentes pruebas con RAPDs (RAPD- 03, RAPD- 04, RAPD- 05 y RAPD- 06), podría evidenciar la presencia de elementos genéticos “externos” insertados en el genoma de las células que conforman la agalla.

La secuencia consenso obtenida como resultado del alineamiento de tres bandas de ADN amplificadas diferencialmente (a partir del ADN de agallas) y posteriormente secuenciadas, mostró la misma secuencia de nucleótidos en las bandas analizadas (ver figura 14). Las tres bandas secuenciadas provienen de distintas plantas de yuca, a saber una banda de aproximadamente 500 pb proveniente de la muestra de agalla 10, una banda de aproximadamente 500 pb presente en la muestra de agalla 11 y una mezcla de dos bandas de aproximadamente 500 pb provenientes de las muestras de agallas 8₁ y 8₂, que corresponden a dos agallas presentes en una misma hoja de yuca. La secuencia de ADN consenso obtenida se utilizó posteriormente como plantilla para el diseño de iniciadores específicos de PCR. Estos iniciadores específicos de PCR, llamados Aliprimer Forward y Aliprimer Reverse, fueron diseñados como marcadores específicos de la posible secuencia de inserción, presente en el genoma de las células que conforman la agalla en plantas de yuca (marcador para agallas). Las reacciones de PCR realizadas con los iniciadores Aliprimer Forward y Aliprimer Reverse, en muestras de hojas y agallas de yuca, generaron un producto de amplificación en las diferentes muestras de agallas analizadas (figuras 15-A, 15-B). Este producto de PCR amplificado en las muestras de agallas 38, 39 y 40, figura 15-A, fue aislado y secuenciado posteriormente para su análisis. El alineamiento realizado a las secuencias de los fragmentos amplificados a partir de las muestras de agallas, mostró el mismo tamaño y secuencia de nucleótidos esperado (ver figura 18). El hecho de que el marcador de

PCR diseñado a partir de la secuencia consenso, amplifique selectivamente un fragmento de alrededor de 240 pares de bases en los ADNs aislados de las agallas, permite la utilización de este fragmento como un marcador específico para este tipo de estructuras. Además este resultado es una evidencia más de la posible presencia de elementos genéticos "externos" insertados en el genoma de las células que conforman la agalla, esto en las plantas de yuca.

Por otra parte, los iniciadores diseñados como marcadores específicos para agallas amplificaron también un fragmento de PCR de aproximadamente 240 pares de bases y otro de aproximadamente 450 pb en la muestra de ADN de larvas del insecto *Latrophobia brasiliensis* (ver figuras 16-A y 16-B). Estos marcadores específicos para agallas amplificaron también un fragmento de aproximadamente 240 pb y otro de aproximadamente 450 pb en la muestra de ADN de agallas presente en la planta *Cousarea hondensis* (en la figura 17 se muestra únicamente el fragmento de 450 pb). Así mismo se amplificaron una serie de bandas con tamaños comprendidos entre los 100 pb y los 1 200 pb en las muestras de *Agrobacterium tumefaciens* (figuras 16-A, 16-B y 17). De igual forma a partir de las electroforesis de las figuras 16-A y 17, se observa la amplificación de una serie de bandas para la muestra del plásmido Ri de *Agrobacterium rhizogenes*. Es importante señalar que tanto para las muestras de ADN de larvas del insecto *Latrophobia brasiliensis*, la muestra de ADN de agallas de la planta *Cousarea hondensis*, así como para la muestra de *Agrobacterium tumefaciens* y la del plásmido Ri de *Agrobacterium rhizogenes*, se observa la amplificación de un fragmento de aproximadamente 240 pares de bases (ver figuras 16-A, 16-B y 17). Este fragmento de 240 pb corresponde en tamaño al esperado de acuerdo al diseño realizado con los iniciadores Aliprimer Forward y Aliprimer Reverse, diseñados a su vez a partir de la secuencia consenso obtenida al secuenciar los fragmentos amplificados diferencialmente en agallas por medio de RAPDs. Al margen de estos resultados y considerando por otra parte la procedencia del iniciador ipt- F (región conservada de secuencias de inserción de plásmidos bacterianos que transforman células vegetales), se podría sugerir que los elementos genéticos amplificados diferencialmente, tanto en los RAPDs como en las amplificaciones realizadas con el marcador específico para agallas (iniciadores Aliprimer Forward y Aliprimer Reverse), podrían ser análogos a los

presentes en las secuencias de inserción de algunos plásmidos bacterianos, tales como los presentes en bacterias del género *Agrobacterium*.

El análisis Blast aplicado a la secuencia consenso obtenida a partir de los fragmentos amplificados diferencialmente por medio de la técnica de RAPDs, no mostró ninguna similitud significativa con algún fragmento de ADN o gen descrito, a excepción de algunas coincidencias poco significativas con secuencias no mayores a 25 pares de bases. Estas similitudes correspondieron a una coincidencia de 22 pares de bases en *Arabidopsis thaliana*; que de acuerdo a la información consignada en la base de datos, correspondería a la región codificante del gen para la enzima Glucosiltransferasa. Otra de las coincidencias corresponde a un segmento de 19 pares de bases, del factor I de elongación de la traducción en *Fusarium solani*. No obstante como se mencionó anteriormente, las coincidencias son muy pequeñas para ser tomadas en consideración. Por otra parte, el análisis "Blast" aplicado al iniciador Aliprimer Forward (utilizado como uno de los iniciadores específicos para agallas) mostró una concordancia importante con la transposasa (tnpA), de un transposon presente en *Agrobacterium tumefaciens* (15/ 19 bases, "E- Value" 4,7).

Tomando en consideración algunos aspectos derivados de las diferentes investigaciones realizadas en el campo de la Cecidología (estudio de las agallas) y en concordancia con la hipótesis planteada como parte de este trabajo de investigación, se propone desde una perspectiva general, que la formación de las agallas podría dividirse en tres grandes procesos, teniendo presente que los mismos pueden tener diferencias significativas entre los diferentes grupos. El primero de estos implicaría un proceso de inducción inicial, el segundo incluiría el proceso de "modelación" y modulación del desarrollo de la agalla por parte del insecto y el tercero correspondería a la formación de la agalla madura como tal, incluyendo el proceso de dehiscencia cuando este se presenta. El proceso de inducción inicial a su vez involucraría dos subprocesos paralelos, el preacondicionamiento del tejido, y la hiperplasia e hipertrofia del tejido preacondicionado.

En relación con el preacondicionamiento del tejido, algunos investigadores sostienen que las células de la planta deben ser condicionadas para producir un estado fisiológico

particular, que posteriormente genere las condiciones para el subsecuente desarrollo de la agalla. Al respecto autores como Miles (1968), Hori, (en Rohfritsch y Shorthouse, 1992) y Ananthakrishnan (1998), han mencionado que los aminoácidos presentes en las secreciones salivales de los insectos inductores de agallas, esencialmente lisina, histidina y triptófano, podrían funcionar como "preacondicionadores" para la inducción de las agallas. Al parecer los aminoácidos secretados en la saliva provocarían una mayor plasticidad e incrementarían la sensibilidad de los tejidos de la planta a la acción del respectivo insecto inductor. También se ha especulado con relación a la participación de las enzimas pectinasas, debido a que estas enzimas podrían degradar las paredes celulares y con ello podrían contribuir a condicionar el tejido para la acción del insecto. No obstante la presencia de pectinasas en la saliva de los insectos **no se ha** correlacionado con la inducción de las agallas. En el mismo sentido, se ha sugerido que la polifenol oxidasa (PPO), presente también en las secreciones salivales de los insectos y los compuestos fenólicos derivados de su acción enzimática, podrían incrementar la sensibilidad de los tejidos de la planta al estímulo por parte del respectivo insecto inductor. Más aún, se ha especulado que la compleja interacción entre los tejidos de la planta hospedera y la polifenol oxidasa, podría tener una importancia fundamental en la formación de las agallas. Al respecto, Miles (1968) menciona que la interacción y balance entre el sistema de la polifenol oxidasa de los insectos y la planta hospedera, podría determinar si el "ataque" por parte del insecto produce una lesión (necrosis) o bien el desarrollo de la agalla. Los reportes derivados de algunas investigaciones sobre la posibilidad de que algunos reguladores de crecimiento vegetal, encontrados en secreciones y otros fluidos de los insectos inductores, tales como el ácido indolacético (AIA), las citocininas y las geberelinas, podrían actuar como sustancias inductoras y reguladoras en la formación de las agallas, McCalla *et al.* (1961), Miles (1968); Hori, (en Rohfritsch y Shorthouse, 1992), Leitch (1994), Ananthakrishnan (1998), Stone y Schönrogge (2003); podrían sugerir desde otra perspectiva, una función indirecta de este tipo de sustancias, al intervenir las mismas como preacondicionadoras en el proceso inicial de inducción de las agallas. La presencia de este tipo de sustancias en las secreciones salivales u otros fluidos de los insectos inductores, podría ser entonces una consecuencia indirecta derivada de las actividades de alimentación de los mismos; no obstante no se puede descartar a priori

la importancia de este tipo de compuestos químicos en el proceso de inducción de las agallas.

Concretamente, la hipótesis planteada y derivada de los resultados de esta investigación, propone que la hiperplasia que caracteriza la fase inicial final de inducción de la agalla, es generada por el estímulo y acción de un elemento genético similar o análogo al plásmido Ti, presente en líneas del género *Agrobacterium*. Este plásmido a su vez sería transmitido al tejido vegetal, probablemente por alguna bacteria endosimbionte presente en algunos tipos de fluidos del respectivo insecto inductor. Estos fluidos incluirían las secreciones salivales, excrementos, e inclusive secreciones producidas durante el proceso de oviposición, según sea el caso. En una segunda etapa del proceso de formación de la agalla, el insecto estaría en capacidad de regular y modular el proceso de hiperplasia e hipertrofia inicial, por medio de algún factor químico regulador (análogos a reguladores de crecimiento vegetal, factores de transcripción, metabolitos, etc). Estos factores químicos reguladores, que en lo sucesivo se denominarán como **FQRs**, podrían ser análogos a los compuestos descritos en las investigaciones realizadas por Doss y colaboradores (2000). Estos investigadores encontraron que cierto tipo de sustancias secretadas por insectos de la especie *Bruchus pisorum* (gorgojo del guisante), y llamadas por ellos conjuntamente como "bruchinas", tienen la capacidad de alterar el desarrollo en plantas de guisante. Específicamente estas sustancias aparentemente tienen la capacidad de actuar como estimuladores del crecimiento vegetal, produciendo un estado de neoplasia en el tejido afectado (Doss *et al.*, 2000). Al respecto Weber (2002) menciona que las bruchinas y otros compuestos derivados de los insectos, son moléculas inductoras especializadas que pueden alterar el desarrollo de las plantas. De acuerdo a este autor, estos compuestos podrían contener señales similares a otras moléculas presentes en las vías que conducen a una determinada respuesta biológica.

Las bruchinas son lípidos relativamente estables formados por cadenas largas de α,ω -dioles, mono o diesterificados con ácido 3- hidroxipropanoico, que además constituyen un nuevo tipo de compuestos químicos. Las bruchinas son potentes sustancias reguladoras en plantas, que en cantidades tan pequeñas como 0.5 pg, pueden causar el crecimiento de células indiferenciadas en tejidos no meristemáticos de

guisante (estado de neoplasia). Estas sustancias han sido aisladas inicialmente a partir de los insectos *Bruchus pisorum* y *Callosobruchus maculatus* (Doss *et al.*, 2000; Cooper *et al.*, 2005).

En función de lo anterior, podría interpretarse desde otra perspectiva, que las bruchinas o bien compuestos de naturaleza similar, podrían tener la capacidad de regular la expresión de genes involucrados en la síntesis de reguladores de crecimiento endógenos en las plantas (fitohormonas). Además, dado que se trata de moléculas relativamente pequeñas, estas podrían difundir a través de las paredes celulares de la planta. Por otra parte, debido a la naturaleza lipídica de las bruchinas, se propone que las mismas podrían tener un mecanismo de acción similar al de otras moléculas derivadas de ácidos grasos u hormonas esteroideas en animales.

En plantas se ha demostrado que diferentes lípidos derivados de ácidos grasos, como el Ácido Jasmónico, presentan un escenario complejo en la cascada bioquímica de respuesta, con la presencia de múltiples moléculas de señalamiento, una situación similar a la que se presenta en mamíferos con las prostaglandinas (Weber, 2002). El supuesto planteado sobre el posible mecanismo de acción de las bruchinas o compuestos de naturaleza similar, es apoyado también por el descubrimiento en las plantas de los brasinoesteroides. Fujioka y Yokota (2003) mencionan que estas sustancias actúan como hormonas esteroideas, regulando el crecimiento y desarrollo en las plantas. Los brasinoesteroides muestran semejanzas estructurales con las hormonas esteroideas de insectos y vertebrados (Müssing y Altmann, 2001). En los animales y en las plantas las hormonas esteroideas pasan a través de la membrana celular por difusión simple y regulan la transcripción de genes por medio de la unión a receptores nucleares en las células blanco. Las hormonas esteroideas presentan también un efecto no genómico mediado por receptores de membrana. En plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas (modelo de *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa*) se han identificado los receptores BRI1 y OsBRI1 para los brasinoesteroides. Los receptores BRI1 y OsBRI1 son quinasas cuya señal es mediada por dominios intracelulares que tienen la propiedad de autofosforilar residuos de serina y treonina, y al parecer también podrían fosforilar otros tipos de moléculas. En el caso específico del receptor quinasa BRI1, la señal del brasinoesteroide se transduce a través de la

membrana plasmática para mediar un efecto genómico (Müssing y Altmann, 2001; Fukuda, 2004).

Por lo tanto, tomando en consideración todo lo expuesto anteriormente, las bruchinas o moléculas similares podrían convertirse en candidatos apropiados para actuar como factores químicos reguladores en la formación de las agallas. Estos factores químicos reguladores (FQRs) podrían regular entonces la actividad y expresión de los genes presentes en las secuencias de inserción del plásmido u otro tipo de elemento genético, insertado en el genoma de las células vegetales que conforman la agalla. Los genes presentes en las secuencias de inserción y que en principio podrían estar regulados por los FQRs, pueden ser genes que codifican para enzimas involucradas en la síntesis de reguladores de crecimiento vegetal, tales como las auxinas, citocininas, giberelinas u otras. Por su parte, estos FQRs podrían ser secretados por la hembra durante el proceso de oviposición, por el huevo o bien por la larva del respectivo insecto inductor. Al respecto, actualmente se conocen algunos genes que realizan esta función en sistemas como el descrito para el género *Agrobacterium*. En estos organismos se conoce claramente la acción de los genes *ipt*, *iaaM* e *iaaH*, como precursores de las enzimas involucradas en la síntesis de citocininas y auxinas; sustancias esenciales para mantener el estado de neoplasia en los "tumores vegetales" inducidos por este tipo de bacterias. Los genes *ipt*, *iaaM* e *iaaH*, están presentes en la secuencia de inserción del plásmido Ti de *Agrobacterium* y son insertados conjuntamente en el genoma de las células vegetales (Alberts *et al.*, 2002; Watson *et al.*, 1996). Otros sistemas similares al de *Agrobacterium* han sido descritos por Lichter *et al.* (1995) en *Erwinia herbicola* y en *Rhodococcus fascians* por Temmerman *et al.* (2000). Estos investigadores han reportado que estas bacterias inducen en diferentes especies de plantas la formación de crecimientos anormales similares a agallas de corona, por medio de la introducción de elementos genéticos presentes en los plásmidos pPATH y pFiD188, en *Erwinia* y *Rhodococcus* respectivamente. Algunos de los elementos genéticos presentes en los plásmidos pPATH y pFiD188, codifican para genes involucrados en la síntesis de reguladores de crecimiento vegetal, tales como las citocininas.

Por lo tanto, en función de la hipótesis de trabajo que se está planteando, las células transformadas involucradas en la síntesis de los reguladores de crecimiento vegetal, generarían un gradiente de reguladores desde las capas más próximas a la cámara interna de la agalla, hasta el exterior de la misma. Así, las capas de células transformadas más cercanas a la cámara interna de la agalla, estarían más expuestas a la acción de los FQRs secretados por las larvas del insecto. El gradiente de reguladores de crecimiento generado provocaría a su vez una diferenciación celular en la dirección del gradiente, fenómeno muy conocido en sistemas vegetales. lo que explicaría en principio la diferenciación de tejidos y capas celulares alrededor de la cámara interna de la agalla. El hecho de que el tejido más próximo a la cámara interna de la agalla fue eliminado durante la disección, en la mayoría de las muestras de agallas de yuca (para minimizar el riesgo de contaminación), podría sugerir la presencia de varias capas de células transformadas alrededor de la cámara interna de la agalla. Otro posible mecanismo por medio del cual algunos insectos modularían la morfogénesis de la agalla, especialmente en agallas que muestran una menor complejidad, es por algún tipo de acción mecánica llevada a cabo por parte de la larva del insecto. Así, el ámbito de acción y por otra parte el grado de regulación y modulación del proceso de formación de la agalla por parte del insecto inductor, explicaría en parte el extraordinario nivel de complejidad y diversidad encontrado en los diferentes tipos de agallas. El modelo general que resume de forma esquemática esta hipótesis se presenta en la figura 20. Así mismo el modelo sugerido para tratar de explicar la inducción y formación "In Situ" de las agallas de plantas inducidas por insectos, se esquematiza en la figura 19. Este último modelo trata de explicar desde una perspectiva muy general, el proceso de inducción y formación de las agallas prosoplásmicas, similares a las formadas por el insecto *Latrophobia brasilensis* en las hojas de *Manihot esculenta* (yuca). No obstante, los principios y fundamentos teóricos que sustentan este modelo, son aplicables también a la formación de otros tipos de agallas inducidas por insectos.

En función de lo mencionado anteriormente, se propone un posible escenario evolutivo, en el cual un crecimiento similar al que se observa actualmente por la infección de *Agrobacterium* en plantas, sería causado probablemente por alguna línea ancestral de esta bacteria. Esta circunstancia a su vez podría haber generado un microambiente o nicho apropiado para la alimentación de "antiguos" insectos. Este

escenario hipotético pudo haber propiciado que estos insectos adquiriesen la capacidad de transportar e inocular esta posible bacteria ancestral de *Agrobacterium* de una planta a otra. Al amparo de esta suposición y dado la factibilidad de la transferencia horizontal de genes, tal como se ha mencionado en los trabajos de Hentschel *et al.* (2000) y De la Cruz y Davies (2000), se sugiere la posibilidad de una transferencia de información genética por medio de plásmidos u otro tipo de elementos genéticos móviles, entre una cepa ancestral de *Agrobacterium* y alguna bacteria endógena o endosimbionte presente en los insectos. La adquisición y transferencia efectiva de *Agrobacterium* por insectos ha sido demostrada por Zeidan y Szosneck (1994). Estos investigadores demostraron que la mosca blanca (*Bemisia tabaci*) puede adquirir y transmitir *Agrobacterium tumefaciens*, al alimentarse de cultivos líquidos conteniendo la bacteria o directamente a partir de la alimentación de agallas de corona. Asimismo el trabajo de estos investigadores demostró no solo que la bacteria puede ser adquirida y transmitida por *Bemisia tabaci*, si no que la misma permanece intacta en los insectos. Los resultados derivados de esta investigación apoyan la hipótesis planteada, al demostrar la viabilidad de la adquisición, movimiento y transferencia de bacterias tales como *Agrobacterium tumefaciens*, o bien de algún tipo de bacteria relacionada, por parte de los insectos; en este caso específico por *Bemisia tabaci*. En este contexto, el hecho de que los iniciadores específicos diseñados como marcadores de agallas amplifiquen productos de PCR en las muestras de bacterias del género *Agrobacterium* (*A. tumefaciens* y plásmido Ri de *A. rhizogenes*), así como en la muestra de ADN obtenida a partir de las larvas de *Latrophia brasilensis* y en las agallas de las plantas (plantas de yuca y plantas de *Cousarea hondensis*), podría apoyar este supuesto, debido a que este marcador al parecer reconoce secuencias similares o idénticas presentes en estos organismos.

La transferencia horizontal de genes implica el movimiento y transferencia de información genética entre diferentes organismos y es un fenómeno común entre organismos patógenos de animales y plantas, o bien entre simbioses y patógenos de plantas (De la Cruz y Davies, 2000; Hentschel *et al.*, 2000). Algunos sistemas en los cuales la transferencia horizontal de genes estaría involucrada, incluyen al sistema de nodulación en leguminosas, inducido por bacterias del género *Rhizobium*. En *Corynebacterium diphtheriae*, bacteria causante de la difteria, así como en *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Shigella dysenteriae* y *E. coli*, las

determinantes patogénicas son acarreadas por fagos integrados en los cromosomas de estas bacterias. En bacterias se conoce también la importancia de la transferencia horizontal de genes en la distribución de genes involucrados con la resistencia a antibióticos, genes relacionados con la degradación de sustancias y genes relacionados con determinantes simbióticas y patogénicas (De la Cruz y Davies, 2000).

En la actualidad se conocen algunos de los mecanismos moleculares de interacción entre los hospederos y los organismos simbioses o patógenos, tanto de plantas como de animales. Estas investigaciones han revelado que los mecanismos moleculares involucrados en los distintos procesos de patogénesis y simbiosis son básicamente similares, al menos en el caso concreto de las bacterias (Hentschel *et al.*, 2000).

Las similitudes entre patógenos y simbioses tienen como factor común el hecho de que algunas de las determinantes genéticas involucradas en estos sistemas, están localizadas en elementos genéticos móviles. Tales *elementos genéticos móviles* incluyen a los plásmidos, islas genómicas, transposones, elementos de inserción y fagos entre otros (Hentschel *et al.*, 2000; De la Cruz y Davies, 2000).

De la Cruz y Davies (2000) afirman que la transferencia horizontal de genes no solo es responsable de la especiación y subespeciación en bacterias, si no que también constituye un mecanismo importante en organismos eucariotas. En este sentido, se tiene suficiente información en relación con el papel del proceso de conjugación en la transferencia de información genética desde bacterias a células eucariotas. Tales células eucariotas incluyen a las levaduras, hongos filamentosos y células vegetales. Por ejemplo en el caso de las células vegetales, es bien conocido el mecanismo por el cual *Agrobacterium tumefaciens* transfiere genes desde la bacteria a las células de la planta, esto por medio de la acción del segmento T- DNA presente en el plásmido Ti. Por lo tanto, algunas bacterias, retrovirus y virus ADN, constantemente integran diferentes tipos de elementos genéticos en los cromosomas de las células tanto de plantas como de animales, esto por medio de diferentes mecanismos como la conjugación y la transformación (De la Cruz y Davies, 2000).

Por otra parte, dentro del contexto de la hipótesis planteada, algunas diferencias observadas en los patrones de amplificación entre diferentes muestras de agallas obtenidas por RAPDs, podrían ser explicadas en función de los diferentes tipos de reorganización de las secuencias insertadas en el genoma de las células transformadas, situación que ha sido ampliamente reportada en estudios sobre inserción de transgenes en diferentes sistemas. Este tipo de reorganizaciones de los elementos genéticos presentes en las secuencias de inserción podrían involucrar secuencias consecutivas, secuencias invertidas y diferencias derivadas de la incorporación de tales secuencias de inserción, en diferentes sitios del genoma de las células transformadas. Este supuesto es apoyado experimentalmente al comparar los patrones de amplificación obtenidos por medio de la utilización de RAPDs, esto entre las muestras de agallas individuales y las muestras obtenidas colectando varias agallas en una misma muestra ("pooles" de agallas). Ambos tipos de muestras, agallas individuales y agallas agrupadas, están presentes en la misma hoja. Así, al comparar los fragmentos amplificados diferencialmente entre las muestras de agallas agrupadas, (muestras 43₁ y 45₁) y las muestras de agallas individuales (muestras 43₂ y 45₂), se puede observar la presencia de una serie de fragmentos amplificados diferencialmente entre ambos tipos de muestras (ver detalles en las figuras 7, 8 y 9).

Los resultados obtenidos parecen demostrar también que algunos de los fragmentos de ADN amplificados diferencialmente por RAPDs (a partir del ADN de agallas), contienen sitios de unión para los iniciadores Aliprimer Forward y Aliprimer Reverse. Estos iniciadores fueron diseñados y utilizados como marcadores específicos para agallas. La banda amplificada a partir de los fragmentos de RAPDs de las muestras analizadas (aproximadamente de 240 pb), corresponde en tamaño al producto de PCR esperado, esto de acuerdo al diseño de los iniciadores Aliprimer Forward y Aliprimer Reverse (ver electroforesis de la figura 12). Este hecho podría ser de gran utilidad para la futura secuenciación de los fragmentos amplificados diferencialmente a partir de las muestras de agallas.

En función de los argumentos expuestos anteriormente, se propone un modelo general causa – efecto, para tratar de explicar la formación de agallas de plantas inducidas por insectos (figura 20). En este modelo se incluyen los resultados derivados de este proyecto de investigación y se resumen los principales aspectos relacionados

con el proceso de inducción y formación de las agallas. Este modelo trata de integrar también algunas hipótesis sugeridas por investigaciones realizadas en el tema, pero partiendo del hecho, de que se está en presencia de un proceso de transformación genético natural. Así el resultado final (formación de la agalla madura), depende de una serie de variables y acontecimientos, que de forma conjunta determinan el desarrollo y viabilidad de este sistema altamente complejo.

VII) CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS:

- Los resultados y evidencias obtenidas a partir del presente trabajo de investigación, sugieren claramente la posibilidad de una transformación genética de las células que forman la agalla, en plantas de yuca.
- La utilización de iniciadores de RAPDs con homología a determinados elementos genéticos y bajo condiciones específicas, permite la amplificación de regiones del genoma que tienen similitud con los mismos, tales como secuencias de inserción de plásmidos bacterianos relacionados con la transformación de células vegetales.
- Este estudio permitió diseñar iniciadores de PCR, que al amplificar selectivamente un fragmento de aproximadamente 200 pb a partir del ADN de agallas, permitieron identificar un marcador específico para este tipo de estructuras.
- Al utilizar los iniciadores de PCR diseñados como marcadores específicos de agallas, se evidenció la presencia de secuencias similares en agallas de la planta *Cousarea hondensis*, en el insecto *Latrofobia brasiliensis*, en *Agrobacterium tumefaciens* y en el plásmido Ri de *Agrobacterium rhizogenes*.

- El proceso de transformación genética sugerido como parte del proceso de formación de las agallas inducidas en yuca por el insecto *Latrophobia brasiliensis*, podría reflejar un mecanismo general de inducción de este tipo de estructuras en otros sistemas similares.
- Es importante corroborar mediante técnicas de hibridación de ADN, la "procedencia" del fragmento aislado y secuenciado utilizado como marcador específico de agallas, esto comparando el ADN aislado del tejido sano y el ADN aislado a partir de la agalla.
- Es necesario realizar más investigaciones con el objetivo de tratar de dilucidar la secuencia total de inserción para las agallas de yuca. Así mismo es importante determinar que genes de la planta se activan durante la inducción y morfogénesis de las agallas, y por otra parte como estos genes regulan y actúan en la fisiología de la planta.
- Una vez se determine la secuencia total de inserción en el genoma de los tejidos que conforman la agalla en plantas de yuca, el próximo paso a seguir sería buscar y comparar las posibles semejanzas y diferencias existentes entre los diferentes tipos de agallas y como éstas podrían influir en la extraordinaria diversidad observada en estos sistemas.
- Debido a la extraordinaria diversidad de formas y colores, y debido a la estructura compleja de las agallas, estos sistemas podrían constituir modelos idóneos para estudiar cómo la forma y la estructura esta determinada a nivel molecular en los sistemas biológicos, concretamente tomando como parámetro los sistemas vegetales.
- Un mayor conocimiento del sistema insecto- planta – agalla podría potenciar su utilización como un sistema alternativo de transformación genética natural.

FIGURAS

FIGURA 1. Esquema del probable proceso de amplificación diferencial de bandas de ADN utilizando RAPDs, en el cual se muestran los sitios hipotéticos de unión de los iniciadores y las respectivas bandas amplificadas. **(A)** Bandas amplificadas a partir del ADN de tejido no agálico de la planta. **B-1)** Banda amplificada diferencialmente en donde uno de los iniciadores tiene su sitio de unión en el ADN de la planta y el otro iniciador tiene su sitio de unión en el ADN de la secuencia insertada. **B- 2)** Banda amplificada diferencialmente con ambos sitios de unión del iniciador dentro de la secuencia insertada en el genoma de la planta.

A

AMPLIFICACION A PARTIR DE ADN DE TEJIDO "SANO"

■ = ADN de la planta
▶ = Iniciador

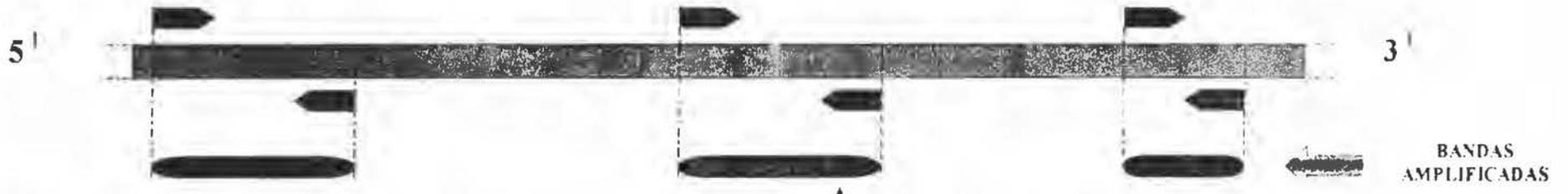


B

AMPLIFICACION A PARTIR DE ADN DE AGALLAS: CASO 1

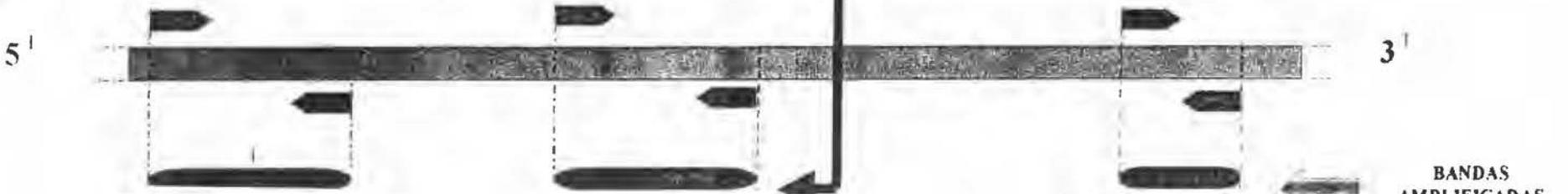
■ = ADN "Foráneo" insertado

B-1)



CASO 2

B-2)



BANDA AMPLIFICADA DIFERENCIALMENTE

FIGURA 2. Esquema resumido de la metodología sugerida y utilizada en el trabajo de investigación. Los números en los círculos indican puntos claves de la metodología, en los cuales se utilizan técnicas que comprueban o dan indicios sobre la presencia de secuencias de ADN "foráneas" insertadas en el genoma de la planta.

ESQUEMA BASICO DE METODOLOGIA

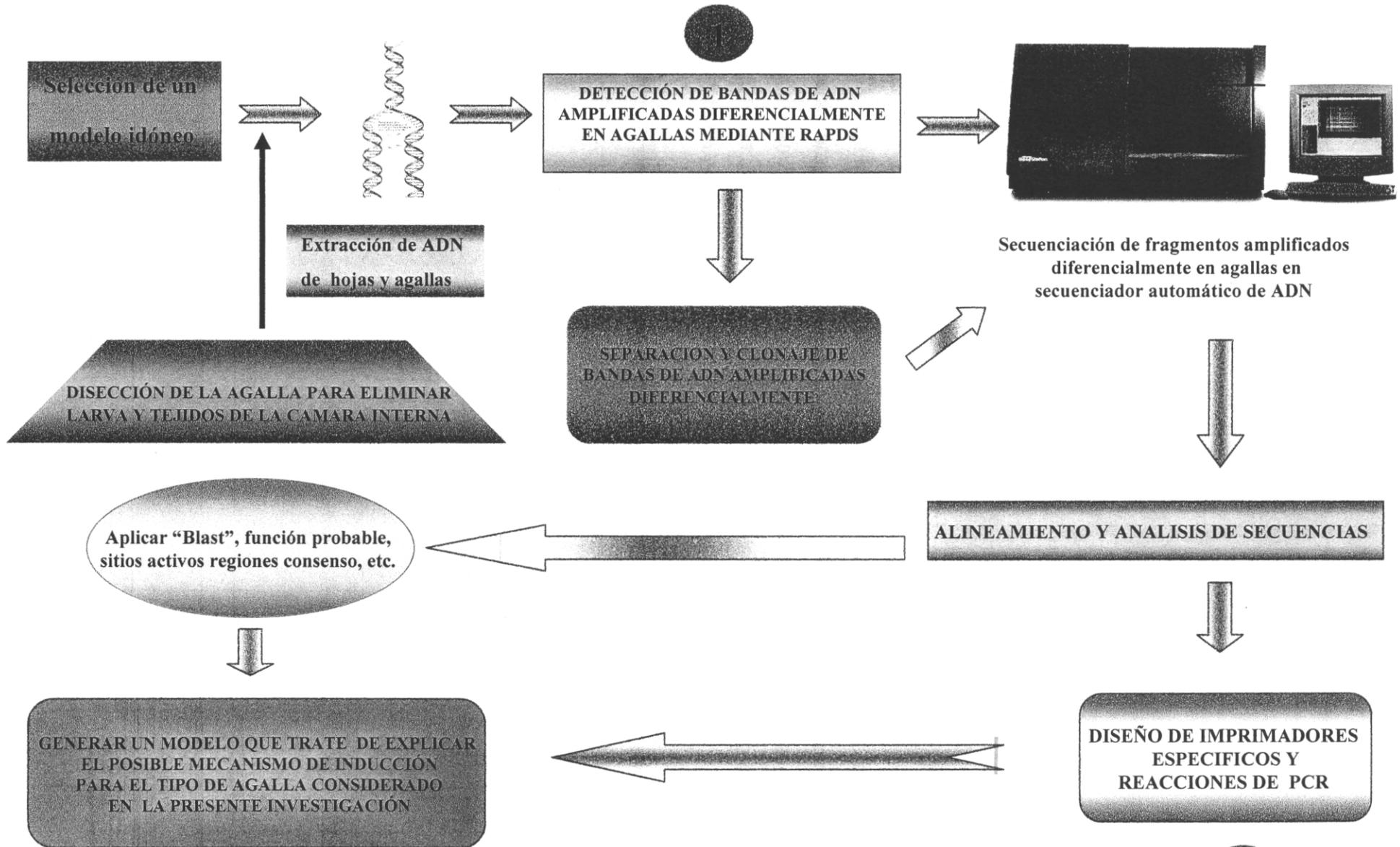


Figura 3. Agallas inducidas en hojas de *Manihot esculenta* (Yuca) por el insecto *Latrophobia brasilensis* (Díptera, Cecidomyiidae). **A)** Agalla individual en donde se muestra su tamaño promedio. **B)** Conducto de salida del insecto en agallas de yuca, vista del envés de la hoja. **C y D)** Corte transversal de la agalla en donde se muestra la cámara interna y la larva del insecto. **E)** Agallas en la superficie de la hoja.

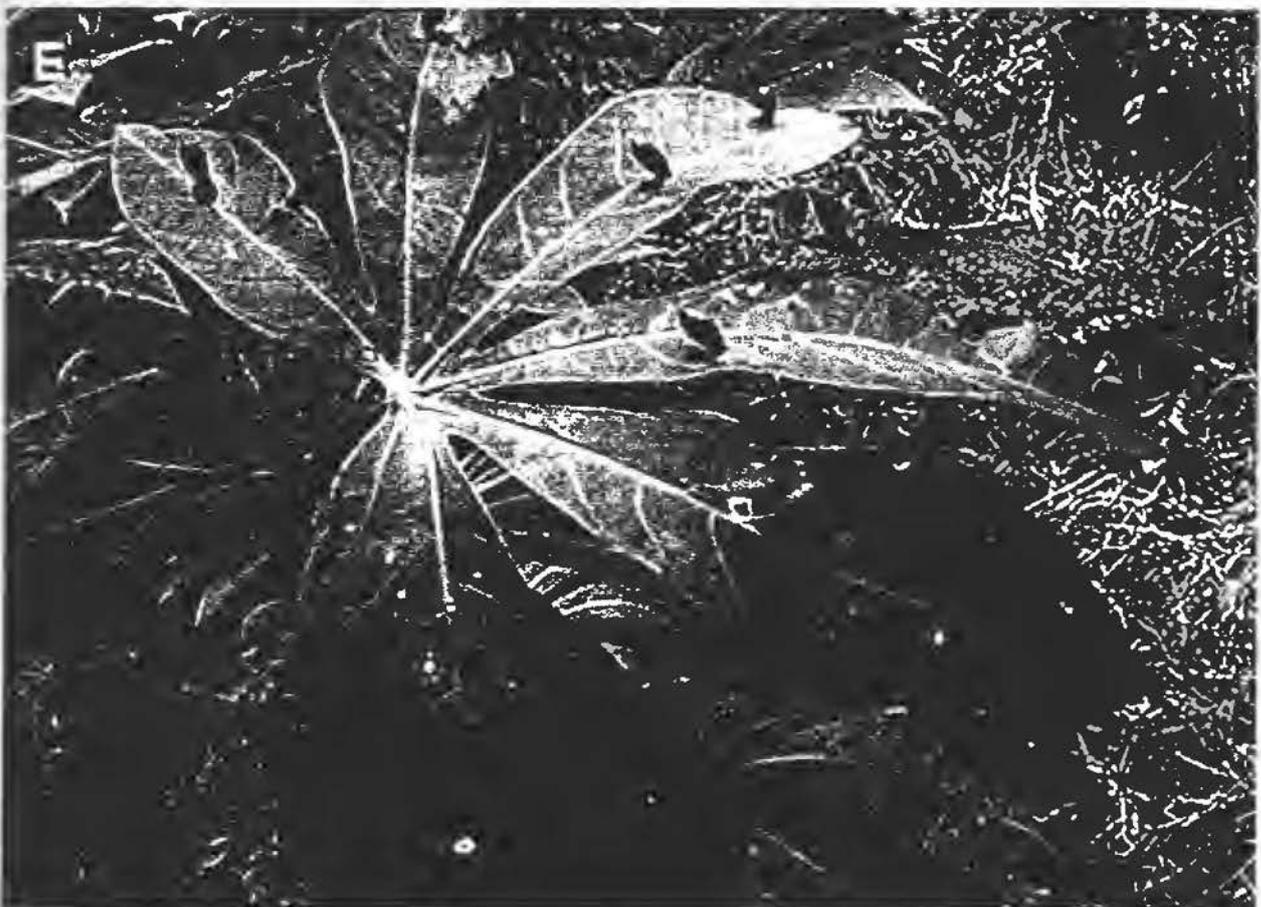
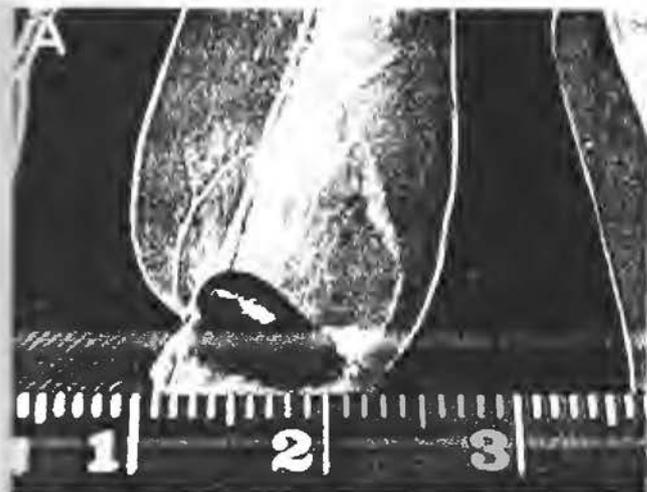


Figura 4. Agallas inducidas en hojas de la planta *Cousarea hondensis* colectada en una zona de bosque ubicada en Pital de San Carlos. **A)** Imagen lateral de la agalla. **B)** Vista posterior de la agalla en donde se observa una estructura similar a un "plumero". **C)** Corte transversal de la agalla en donde se muestra la cámara interna. **D)** Vista del envés de la hoja en donde se observa la parte inferior de la agalla.

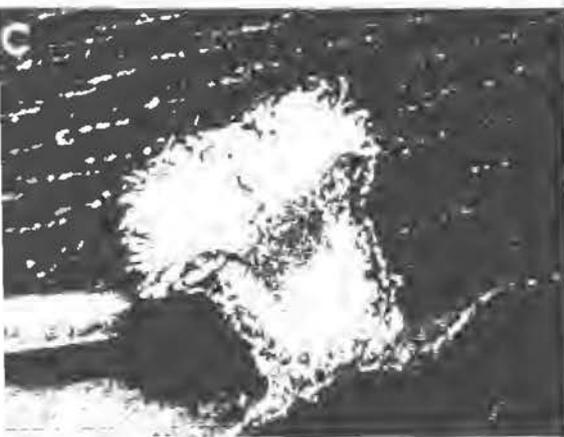
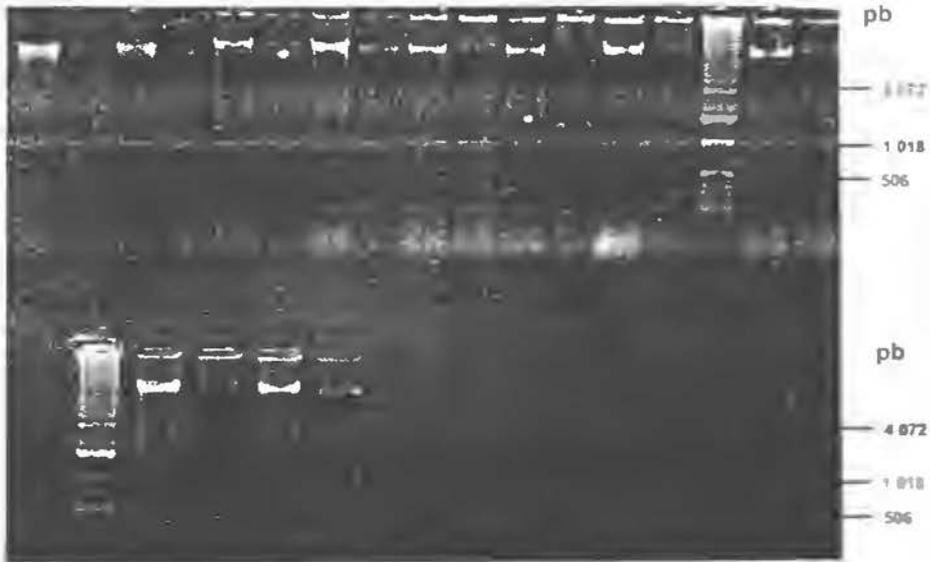


Figura 5. Electroforesis de ADN total extraído de hojas y agallas de *Manihot sculenta* (yuca). Las muestras se separaron en un gel de agarosa al 0.8%, TBE 0.5 X y a 75 voltios, por una hora y quince minutos. El prefijo H indica que el ADN fue extraído de las respectivas muestras de hojas y el prefijo A indica que el ADN fue extraído de las correspondientes muestras de agallas. En ambos casos se indica también el correspondiente número de la muestra. Se cargaron 5 μ l de marcador de peso molecular (MPM)= 1Kb, 6 μ l de ADN de las muestras de agallas y 3 μ l de las muestras de hojas.

H27 A27 H28 A28 H29 A29 H30 A30 H31 A31 H32 A32 H33 A33 M H34 A34



M H35 A35 H36 A36

Figura 6. Electroforesis de fragmentos de ADN amplificados a partir del RAPD-Prugrad1 (prueba de gradiente 1), en muestras de hojas y agallas de *Manihot sculenta* (yuca). Las muestras fueron separadas en un gel de agarosa al 1.0%, TBE 0.5 X, a 75 voltios por 1 hora y 30 minutos. El prefijo H con el respectivo número identifica la respectiva muestra de hoja y el prefijo A con su respectivo número identifica la correspondiente muestra de agalla. Se utilizó el plásmido purificado de la línea A4 de *Agrobacterium rhizogenes* como control positivo C(+). Los subíndices en las muestras de cada carril, denotan el gradiente de temperatura generado en las respectivas columnas del Termociclador. Se cargaron 8 μ l de marcador de peso molecular (MPM)= λ (lambda) y el total de la mezcla de reacción (~25 μ l) para cada muestra amplificada.

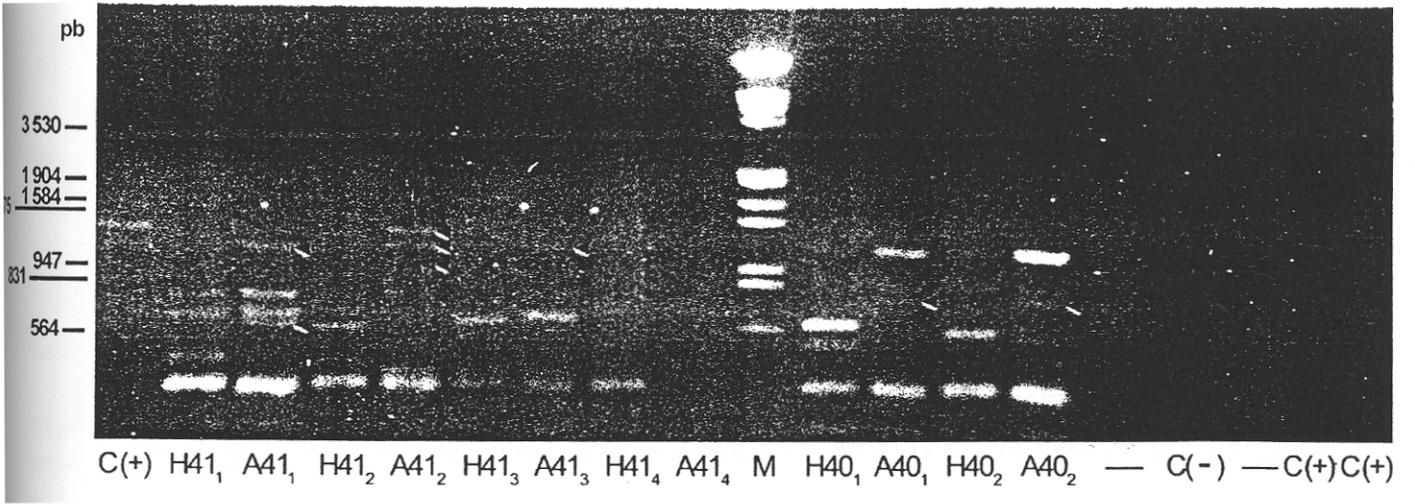


Figura 7. Electroforesis de fragmentos de ADN amplificados a partir del RAPD- 05, en muestras de hojas y agallas de *Manihot sculenta* (yuca). Las muestras se separaron en un gel de agarosa al 1.5%, TBE 0.5 X, a 85 voltios por 1 hora y 45 minutos. El prefijo H con su respectivo número identifica la correspondiente muestra de hoja y el prefijo A con su número identifica la correspondiente muestra de agalla. Se utilizó el plásmido purificado de la línea A4 de *Agrobacterium rhizogenes* como control positivo C(+). Se cargaron 8 µl de marcador de peso molecular (MPM)= 1Kb y el total de la mezcla de reacción (~25 µl) para cada una de las muestra amplificadas.

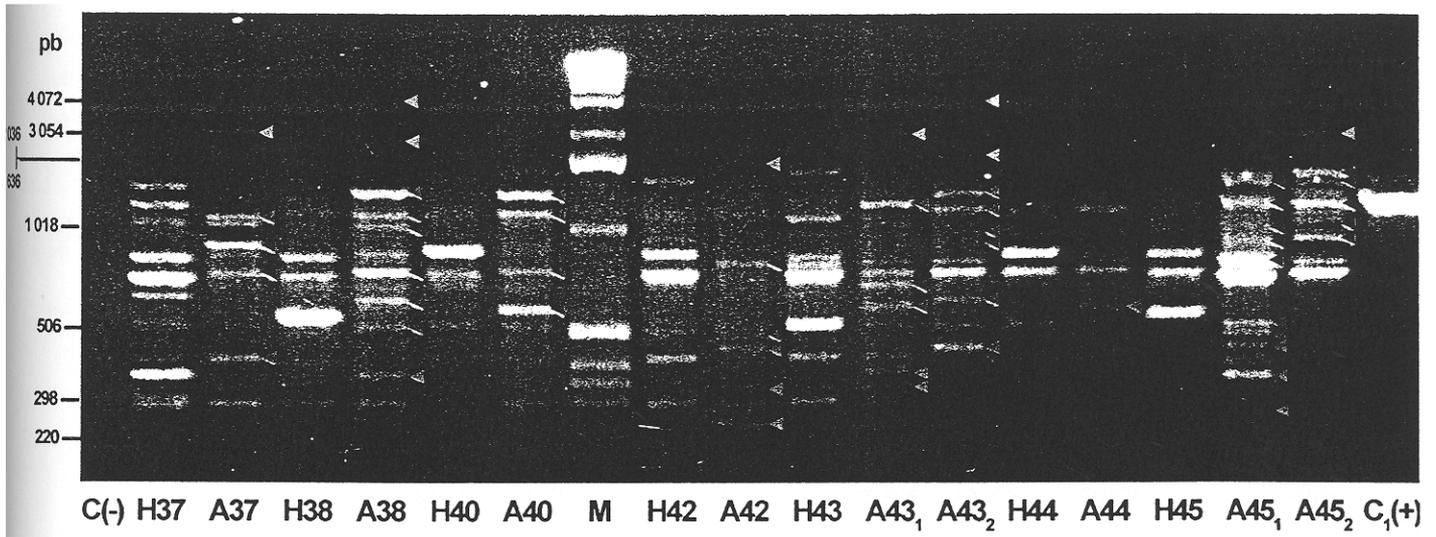


Figura 8. Electroforesis de fragmentos de ADN amplificados a partir del RAPD- 06. en muestras de hojas y agallas de *Manihot sculenta* (yuca). Las muestras fueron separadas en un gel de agarosa al 1.4%, TBE 0.5 X, a 95 voltios por 1 hora y 20 minutos. El prefijo H con su respectivo número identifica la correspondiente muestra de hoja y el prefijo A con su número identifica la correspondiente muestra de agalla. Se utilizó como control positivo C(+) bacterias de *A. tumefaciens* calentadas a 95°C en solución amortiguadora 10X para reacciones de PCR. Se cargaron 12 µl de marcador de peso molecular (MPM)= λ (lambda) y el total de la mezcla de reacción (~25 µl) para cada una de las muestra amplificadas.

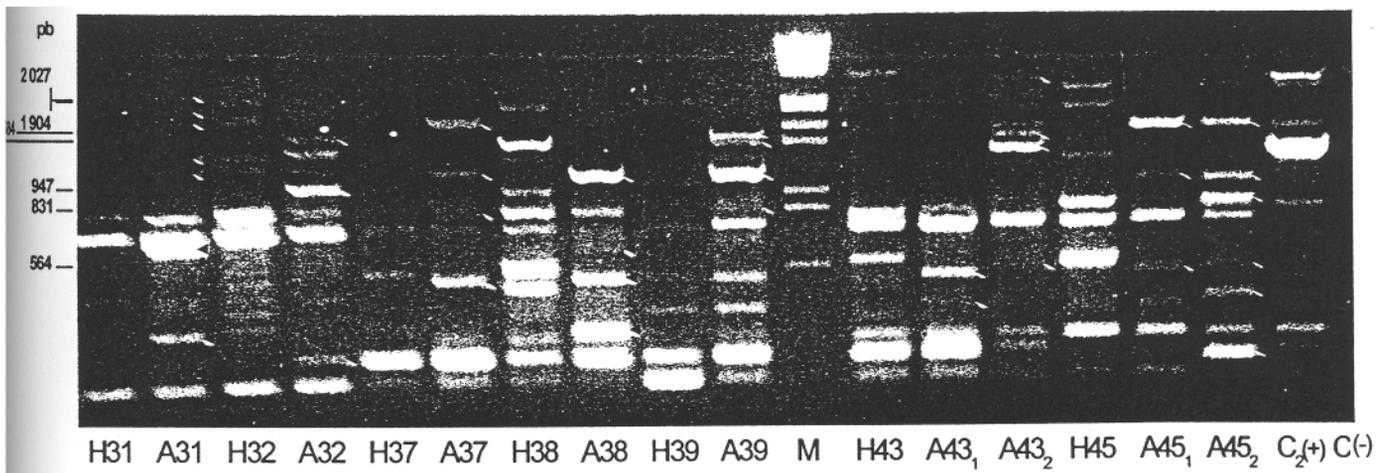


Figura 9. Electroforesis de fragmentos de ADN amplificados a partir del RAPD- 06, en muestras de hojas y agallas de *Manihot sculenta* (yuca). Los productos de PCR fueron separados en un gel de agarosa al 1.4%, TBE 0.5 X, a 75 voltios por 20 minutos y después a 65 voltios por 1 hora y 15 minutos. El prefijo H con su respectivo número identifica la correspondiente muestra de hoja y el prefijo A con su número identifica la correspondiente muestra de agalla. Se utilizó el plásmido purificado de la línea A4 de *Agrobacterium rhizogenes* como control positivo C(+). Se cargaron 14 µl de marcador de peso molecular (MPM)= λ (lambda) y el total de la mezcla de reacción (~25 µl) para cada una de las muestra amplificadas.

H35 A35 H36 A36 H40 A40 M H41 A41 H42 A42 H44 A44 H43 A43₁ A43₂ H45 A45₁ A45₂ C₁(+) C(-)

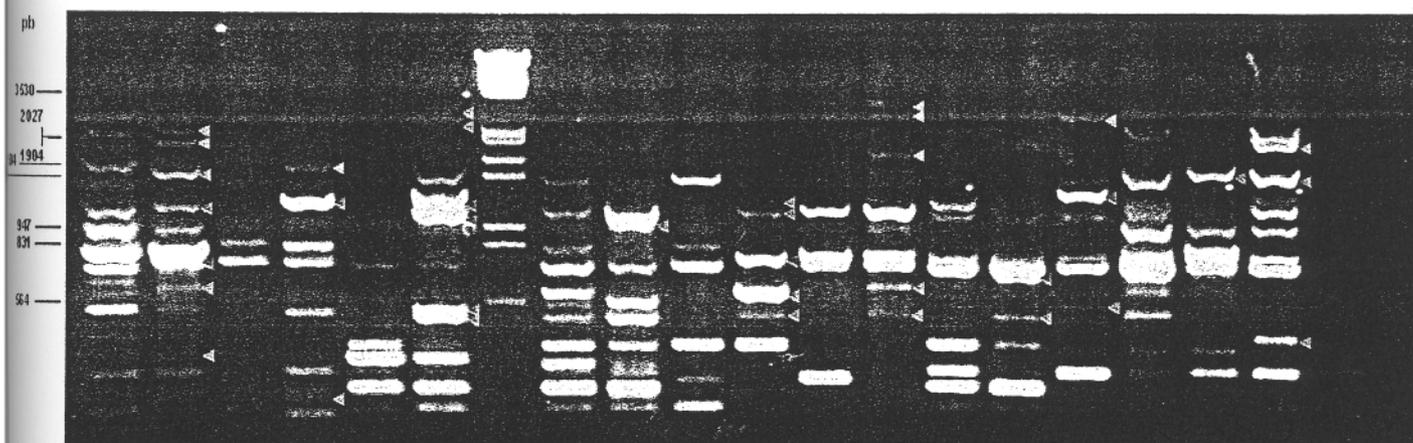


Figura 10. Electroforesis de fragmentos de ADN reamplificados a partir de los fragmentos amplificados diferencialmente en diferentes RAPDs, en agallas de *Manihot sculenta* (resultados no mostrados). Los fragmentos fueron amplificados con las reacciones de Reamplificación 01, 02 y 03. Las bandas corresponden a las aisladas y purificadas por columnas de purificación (Wizard PCR Preps DNA Purification System, de Promega). Los productos de PCR fueron separados en un gel de agarosa al 1.5%, TAE 1X, a 90 voltios por 75 minutos. Se cargaron 5 μ l de marcador de peso molecular (MPM)= Origene, 8 μ l de ADN para las muestras de los carriles 7-10 y 15 μ l para las restantes muestras.. Carril 1: fragmento de ~150 pb, proveniente de la muestra de agalla 8₂. Carril 2: fragmento de ~550 pb, proveniente de las muestras de agallas 8₁ y 8₂ (banda común). Carril 3: fragmento de ~ 550 pb, proveniente de la muestra de agalla 11. Carril 4: fragmento de ~ 500 pb, proveniente de la muestra de agalla 10. Carril 5: marcador de peso molecular origene. Carril 6: fragmento de ~ 450 pb, proveniente de la muestra de agalla 35. Carril 7: fragmento de ~500 pb, proveniente de la muestra de agalla 35, reamplificada a partir de un fragmento original de ~1 500 pb. Carril 8: fragmento de ~ 300 pb, proveniente de la muestra de agalla 35, reamplificada a partir de un fragmento original de ~1 500 pb. Carril 9: fragmento de ~500 pb, proveniente de las muestras de agallas 13₁ y 13₂ (banda común) reamplificadas a partir de un fragmento original de ~1 100 pb. Carril 10: fragmento de ~300 pb, proveniente de las muestras de agallas 13₁ y 13₂ (banda común), reamplificadas a partir de un fragmento original de ~1 100 pb,

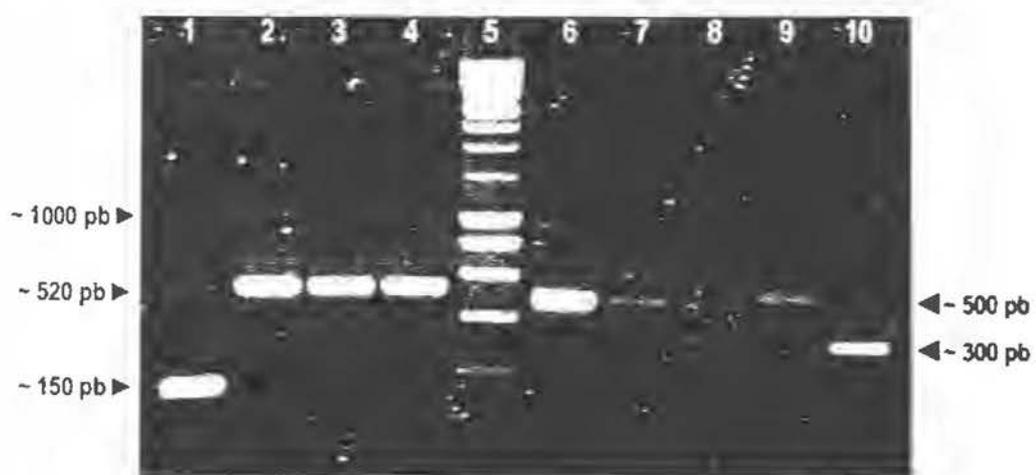
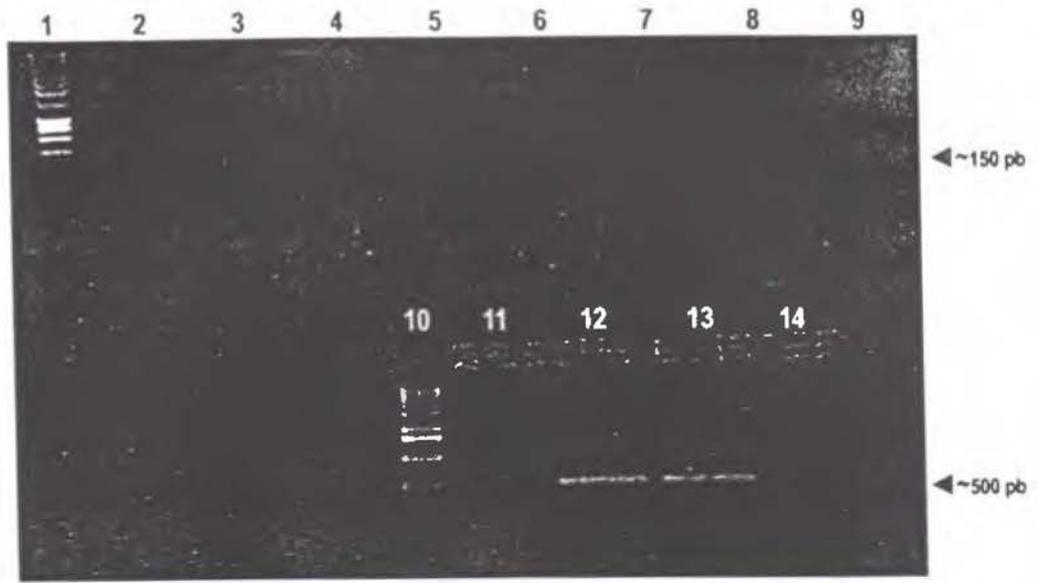
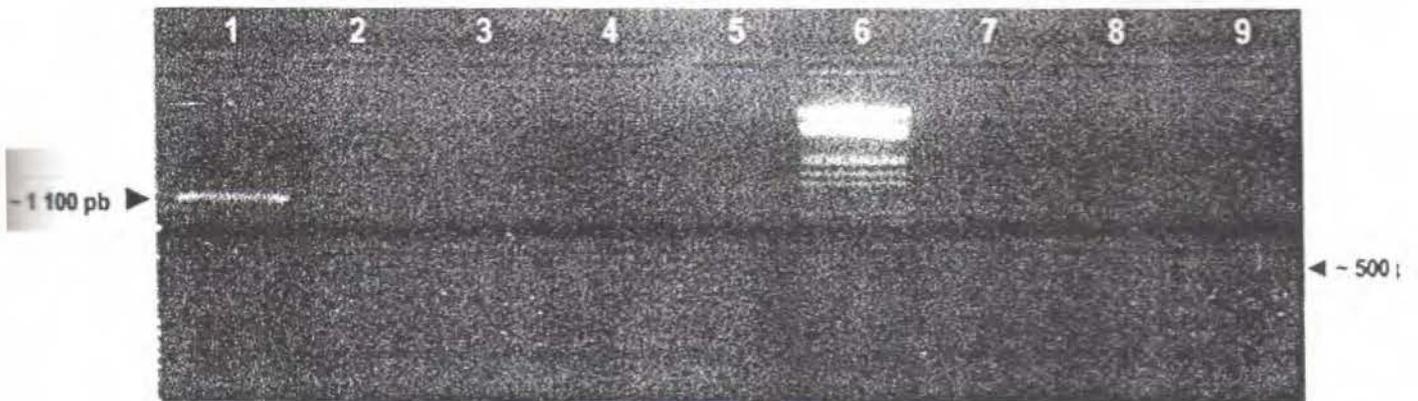


Figura 11. Electroforesis de los productos de PCR obtenidos con las reacciones de Reamplificación- 04 **(A)** y los provenientes de la reamplificación- 05 **(B)**. Los fragmentos a partir de los cuales se realizó la reamplificación, corresponden a los amplificados diferencialmente en agallas de *Manihot sculenta* (resultados no mostrados). **(A)** Las muestras se separaron en un gel de agarosa al 1%, TBE 0.5X, a 90 voltios por 60 minutos. Se cargaron los 40 µl de la mezcla de reacción de PCR. Carril 1: Marcador de peso molecular, origene (5 µl). Carril 2: fragmento de ~700 pb, proveniente de la muestra de agalla 3. Carril 3: fragmento de ~1 100 pb, proveniente de la muestra de agalla 3. Carril 4: fragmento de ~480 pb, proveniente de la muestra de agalla 5. Carril 5: fragmento de ~500 pb, proveniente de la muestra de agalla 5. Carril 6: fragmento de ~1 100 pb, proveniente de la muestra de agalla 5. Carril 7: fragmento de ~900 pb, proveniente de la muestra de agalla 11. Carril 8: fragmento de ~250 pb, proveniente de la muestra de agalla 35. Carril 9: fragmento de ~150 pb, proveniente de la muestra de agalla 8₂. Carril 10: marcador de peso molecular 1kb. Carril 11: fragmento de ~1 100 pb, proveniente de la muestra de agalla 12. Carril 12: fragmento de ~500 pb, proveniente de la muestra de agalla 10. Carril 13: fragmento de ~500 pb, proveniente de la muestra de agalla 11. Carril 14: control negativo de la reacción. **(B)** Las muestras fueron separadas en un gel de agarosa al 1.4%, TBE 0.5X, a 85 voltios. Se cargaron 40 µl de la mezcla de reacción de PCR. Carril 1: fragmento de ~1 100 pb, proveniente de la muestra de agalla 5. Carril 2: fragmento de ~320 pb, proveniente de la muestra de agalla 33. Carril 3: fragmento de ~400 pb, proveniente de la muestra de agalla 32. Carril 4: fragmento de ~600 pb, proveniente de la muestra de agalla 10. Carril 5: fragmento de ~600 pb, proveniente de la muestra de agalla 8₁. Carril 6: marcador de peso molecular lambda (8 µl). Carril 7: fragmento de ~600 pb, proveniente de la muestra de agalla 11. Carril 8: fragmento de ~150 pb, proveniente de la muestra de agalla 8₂. Carril 9: fragmento de ~500 pb, proveniente de la muestra de agalla 10. El carril posterior al número 9 corresponde al control negativo, no aparece en la imagen por falta de espacio al tomar la fotografía.



A



B

Figura 12. Electroforesis de las reacciones de PCR realizadas a partir de los fragmentos de ADN amplificados diferencialmente provenientes de diferentes RAPDs, en agallas de *Manihot sculenta* (yuca). Los fragmentos fueron previamente aislados y purificados en columnas de purificación (Quiaquick Gel Extraction Kit). Las reacciones se realizaron con el programa de PCR Reamplificación- 07, utilizando los iniciadores específicos para agallas Aliprimer For. y Aliprimer Rev. Las muestras fueron separadas en un gel de agarosa al 1.4%, TBE 0.5 X, a 95 voltios por 2 horas. Se cargaron 8 μ l de marcador de peso molecular (MPM)= 1Kb y el total de la mezcla de reacción (~25 μ l) para cada una de las muestra amplificadas. Carril 1: fragmento de ~550 pb, proveniente de la muestra de agalla 43-1. Carril 2: fragmento de ~1 300 pb, proveniente de la muestra de agalla 43-1. Carril 3: fragmento de ~1 200 pb, proveniente de la muestra de agalla 43-2. Carril 4: fragmento de ~2 100 pb, proveniente de la muestra de agalla 43-2. Carril 5: fragmento de ~900 pb, proveniente de la muestra de agalla 45-2. Carril 6: control negativo.

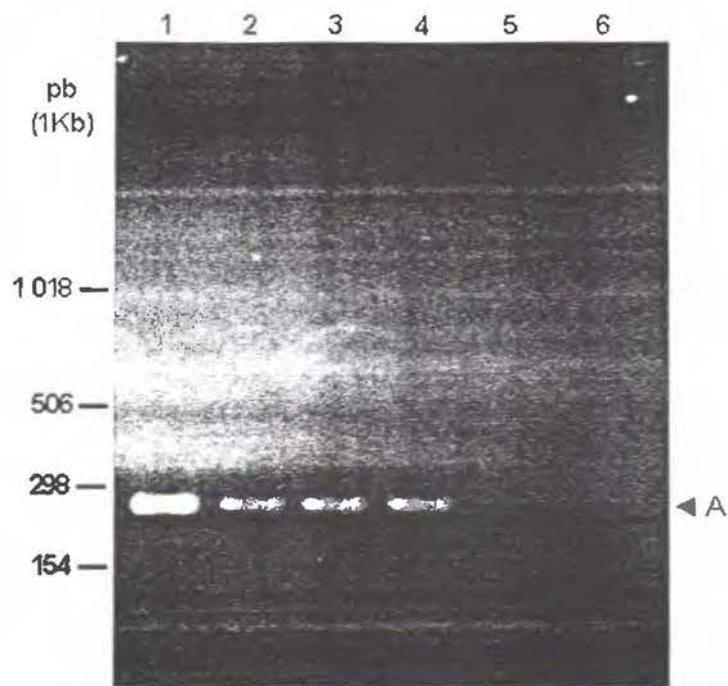


Figura 13. Colonias conteniendo fragmentos de ADN amplificado diferencialmente a partir de agallas de *Manihot sculenta* (yuca), los cuales fueron clonados en vectores de clonaje (plásmidos) pAMP1 de Invitrogen- Life Technologies y posteriormente transfectados en bacterias de la línea XL1- Blue de *Escherichia coli*. A) Placa petri conteniendo colonias individuales de *E. coli* en medio selectivo. B) Clonas 1 y 2, seleccionadas para crecer en medio líquido selectivo, con el fin de purificar los plásmidos utilizados para el clonaje.

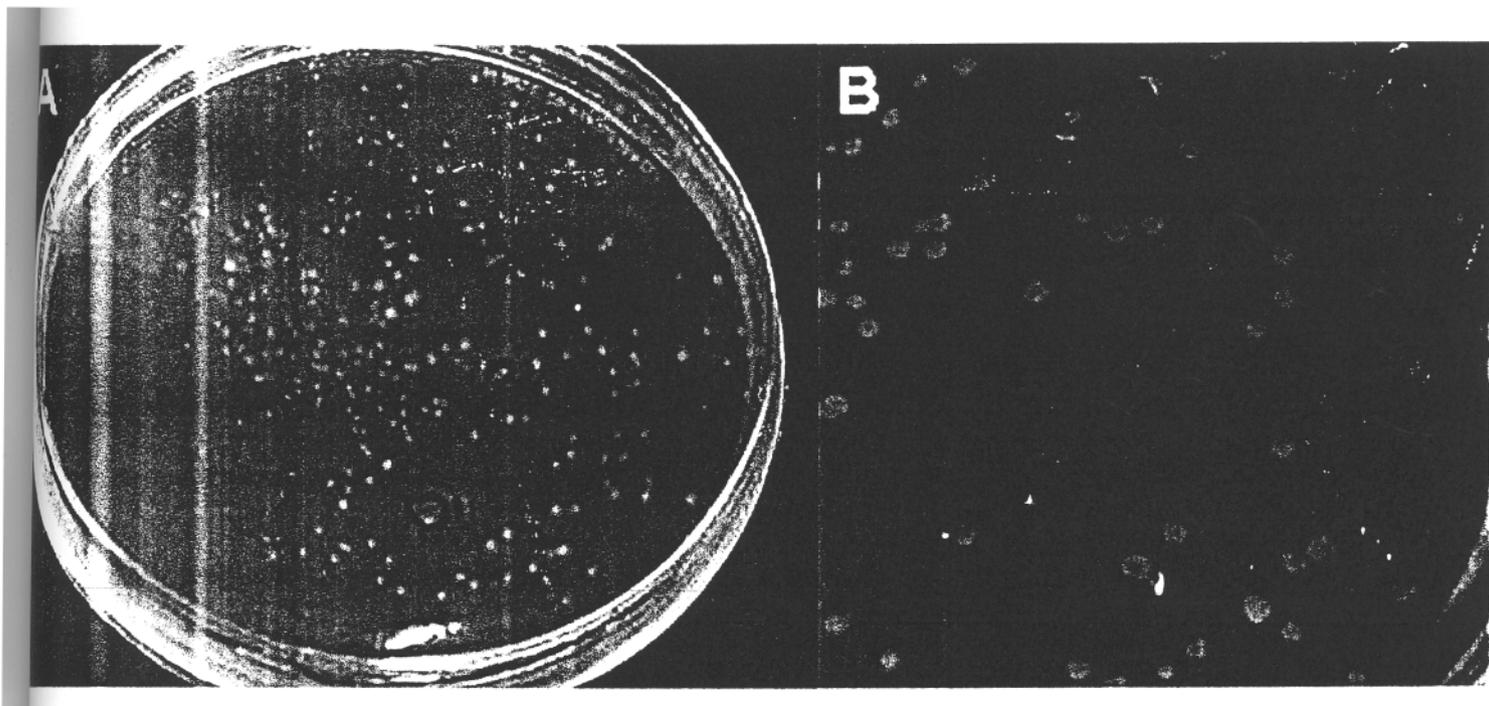


Figura 14. Alineamiento de las secuencias 2,3 y 4 amplificadas diferencialmente por RAPDs, a partir de ADN extraído de agallas de *Manihot sculenta* (yuca). Se muestra la secuencia de nucleótidos consenso, así como la secuencia de región amplificada con los iniciadores específicos (región coloreada de gris y negro respectivamente).

Alignment: A:\Aliniamiento de secuencias 2,3 y 4.

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      5      15      25      35      45      55
A81 ---GAGGCC TTGACATGN- TCTGGAGCGG AGCANNTCTA CAATGATGNC CAAGGCCG-A
A11 ---GAGNCC TTGACATGN- TCTGGAGCGG AGCANTTCTA CAATGATGTC CNAGGCCCGA
A10 GNNNGAGNCC TTGACATGNT TNTGGAGCGG AGCCCNTCTA CAATGATGTC CNAGGCCG-A
al Co * ** ***** * ***** ** * ***** *

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      65      75      85      95     105     115
A81 CCTCACGATG ATCTTCGCTT NNNAAGNAT AGGCGCATCG GCNAGGACGG CGATCACGGC
A11 CCTCACGATG ATCTTCGCTT NNAAAAGTAT AGGCGCATCG GCAAGGACGG CGATCACGGC
A10 CCTCACGATG ATCTTCGCTT TTAAAAGTAT AGGCGCATCG GCAAGGACGG CGATNNCGGC
al Co ***** ***** **** * ***** ** * ***** **

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
     125     135     145     155     165     175
A81 GCATTTCCTG ACCTG TTAGCGGCGGCAATGATGATGACAAATG
A11 GCATTTCCTG ACCTG TTAGCGGCGGCAATGATGATGACAAATG
A10 GCATTTCCTG ACCTG TTAGCGGCGGCAATGATGATGACAAATG
al Co ***** ***** ***** ***** * ***** *****

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
     185     195     205     215     225     235
A81 TTAGCGGCGGCAATGATGATGACAAATG
A11 TTAGCGGCGGCAATGATGATGACAAATG
A10 TTAGCGGCGGCAATGATGATGACAAATG
al Co ***** ***** ***** ***** ***** *****

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
     245     255     265     275     285     295
A81 TTAGCGGCGGCAATGATGATGACAAATG
A11 TTAGCGGCGGCAATGATGATGACAAATG
A10 TTAGCGGCGGCAATGATGATGACAAATG
al Co ***** ***** ***** ***** ***** *****

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
     305     315     325     335     345     355
A81 TTAGCGGCGGCAATGATGATGACAAATG TTAGTCTCG GTTTCGGTCC ATGCATTGAT
A11 TTAGCGGCGGCAATGATGATGACAAATG TTAGTCTCG GTTTCGGTCC ATGCATTGAT
A10 TTAGCGGCGGCAATGATGATGACAAATG TTAGTCTCG GTTTCGGTCC ATGCATTGAT
al Co ***** ***** ***** ***** ***** *****

```



```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      365      375      385      395      405      415
OG. 2  A81  CATGAGATCA TCACTCAACC ACTGGTCATC GATCTGCTCA TCTCATTCTG CTACAGCAGT
OG. 3  A11  CATGAGATCA TCACTCAACC ACTGGTCATC GATCTGCTCA TCTCATTCTG CTACAGCAGT
OG. 4  A10  CATGAGATCA TCACTCAACC ACTGGTCATC GATCTGCTCA TCTCATTCTG CTACAGCAGT
Clustal Co *****

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      425      435      445      455      465      475
OG. 2  A81  GCTGCGAATG GCATTCTCAA GGACTTTCCT GTGGGATTGG CGATCACAGT ACCACGCTCG
OG. 3  A11  GCTGCGAATG GCATTCTCAA GGACTTTCCT GTGGGATTGG CGATCACAGT ACCACGCTCG
OG. 4  A10  GCTGCGAATG GCATTCTCAA GGACTTTCCT GTGGGATTGG CGATCACAGT ACCACGCTCG
Clustal Co *****

```

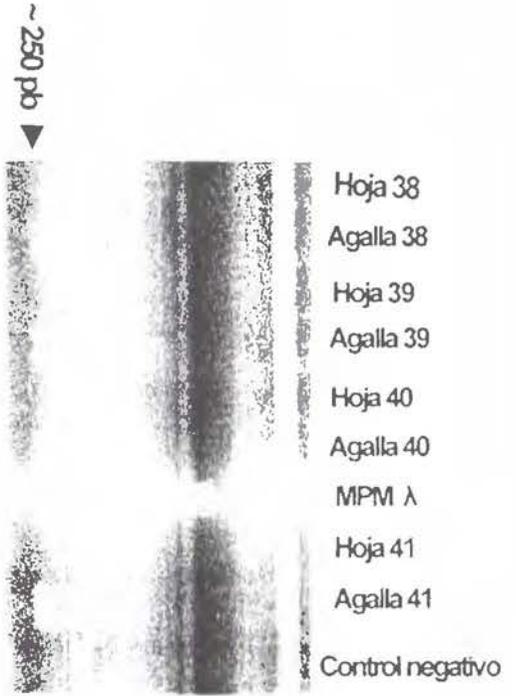
```

      ....|....| ....|....| ....|.
      485      495      505      515
OG. 2  A81  TTCACCGGGN NNN--NCNNG NNN-----
OG. 3  A11  TTCACCGAGN NNNG-CCTTG CNAAAANTNAT GANCTN
OG. 4  A10  TTCACCGGAA NNN---CCTG NCAAACTNAT NANCN-
Clustal Co *****

```

Figura 15. Electroforesis de productos de PCR utilizando iniciadores específicos para agallas de *Manihot sculenta* (yuca). Las reacciones se realizaron con el programa ALIFIN-03. Los productos de las reacciones de PCR fueron separados en un gel de agarosa al 1.4%, TBE 0.5 X, a 75 voltios por 2 horas (A) y a 95 voltios por 1 hora y 15 minutos (B). Se cargaron 8 μ l de marcador de peso molecular (MPM)= Lambda (λ) y el total de la mezcla de reacción (~25 μ l) para cada una de las muestras analizadas.

A



B

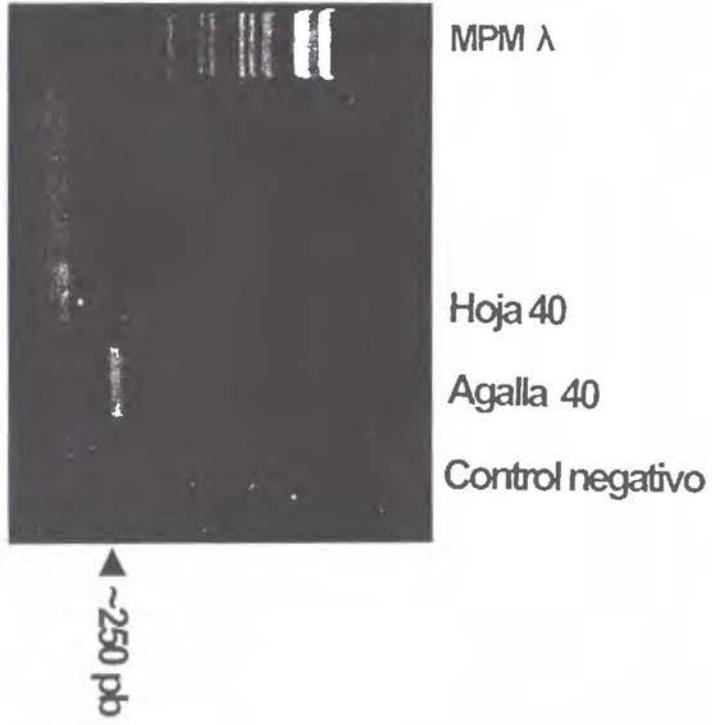
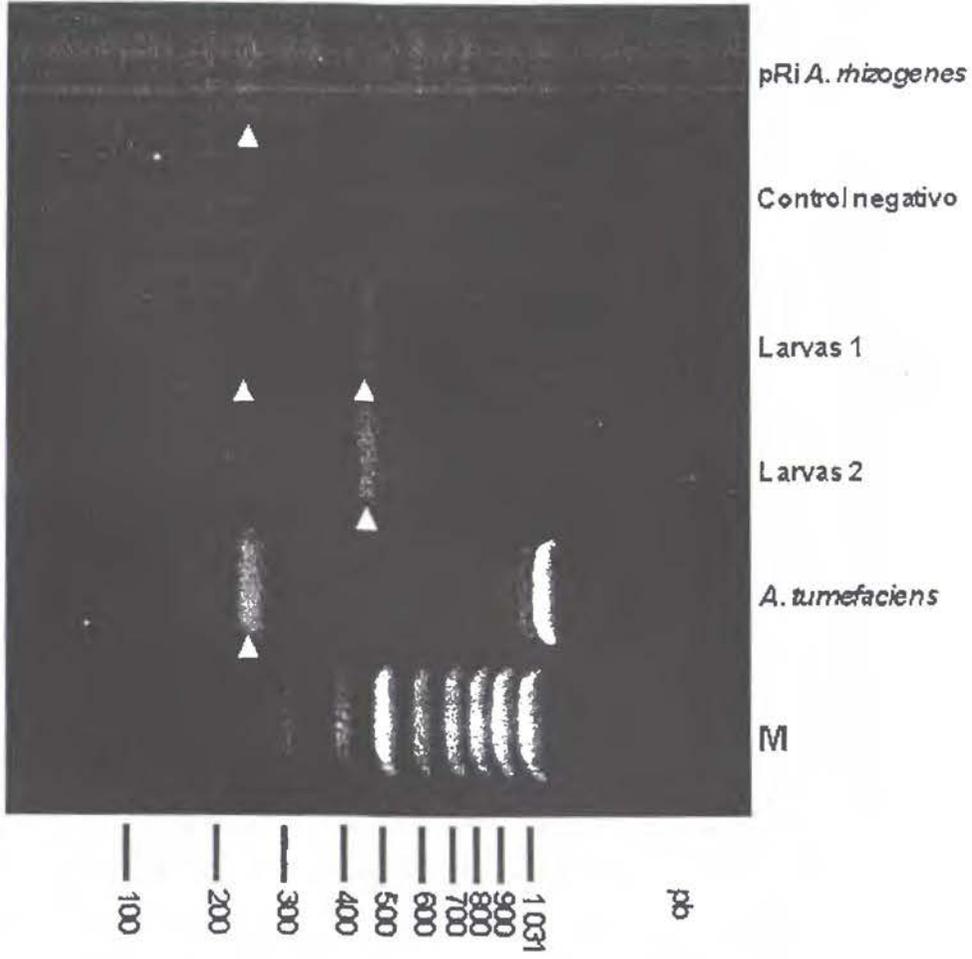


Figura 16. Electroforesis de productos de PCR utilizando iniciadores específicos para agallas de *Manihot sculenta* (yuca). Las reacciones se realizaron utilizando las muestras de ADN de las larvas del insecto *Latrophobia brasilensis* (varias replicas), bacterias de la cepa C58C1 de *Agrobacterium tumefaciens* y el plásmido Ri purificado a partir de la línea A4 de *Agrobacterium rhizogenes*. Las reacciones se realizaron con el programa ALIFIN-03. **(A)** Los productos de las reacciones de PCR se separaron en un gel de agarosa al 2%, TBE 0.5 X, a 85 voltios por 30 minutos y luego a 25 voltios por 1:10 horas. **(B)** Los productos de estas reacciones de PCR fueron separados en un gel de agarosa al 2%, TBE 0.5 X, a 85 voltios por 1 hora y 30 minutos. Se cargaron 12 µl de marcador de peso molecular (M)= Mass Ruler (Fermentas) y el total de la mezcla de reacción (~25 µl) para cada una de las muestras analizadas.

E



A

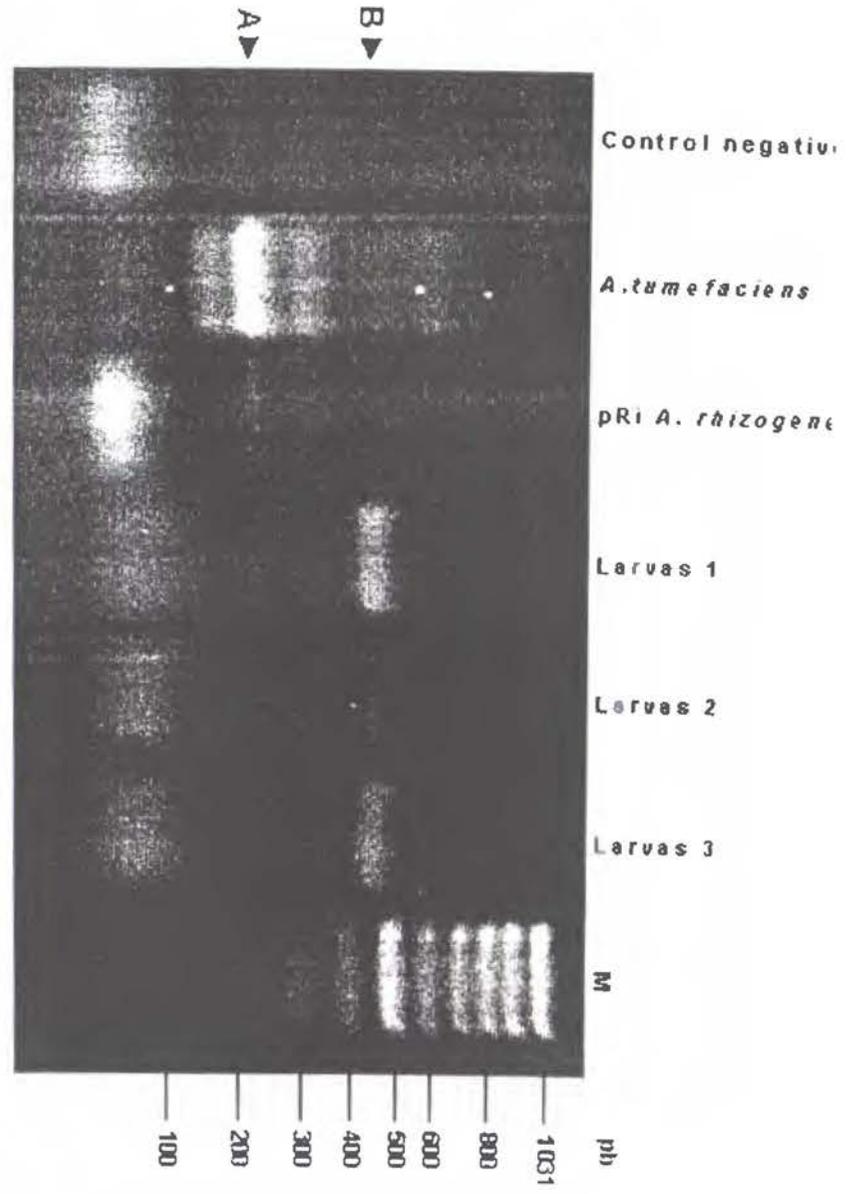


Figura 17. Electroforesis de productos de PCR utilizando iniciadores específicos para agallas de *Manihot sculenta*. Para las reacciones se utilizaron muestras de ADN de las larvas del insecto *Latrophobia brasilensis* (dos replicas), bacterias de la cepa C58C1 de *Agrobacterium tumefaciens* (dos replicas), hojas y agallas de la planta *Cousarea hondensis*, Rubiaceae; colectada en Pital de San Carlos (dos replicas), y el plásmido Ri purificado a partir de la línea A4 de *Agrobacterium rhizogenes*. Las reacciones se realizaron con el programa ALIFIN-03. Los productos de las reacciones de PCR fueron separados en un gel de agarosa al 2%, TBE 0.5 X, a 95 voltios por 1 horas. Se cargaron 12 μ l de marcador de peso molecular (M)= Mass Ruler (Fermentas) y el total de la mezcla de reacción (~25 μ l) para cada una de las muestras analizadas.

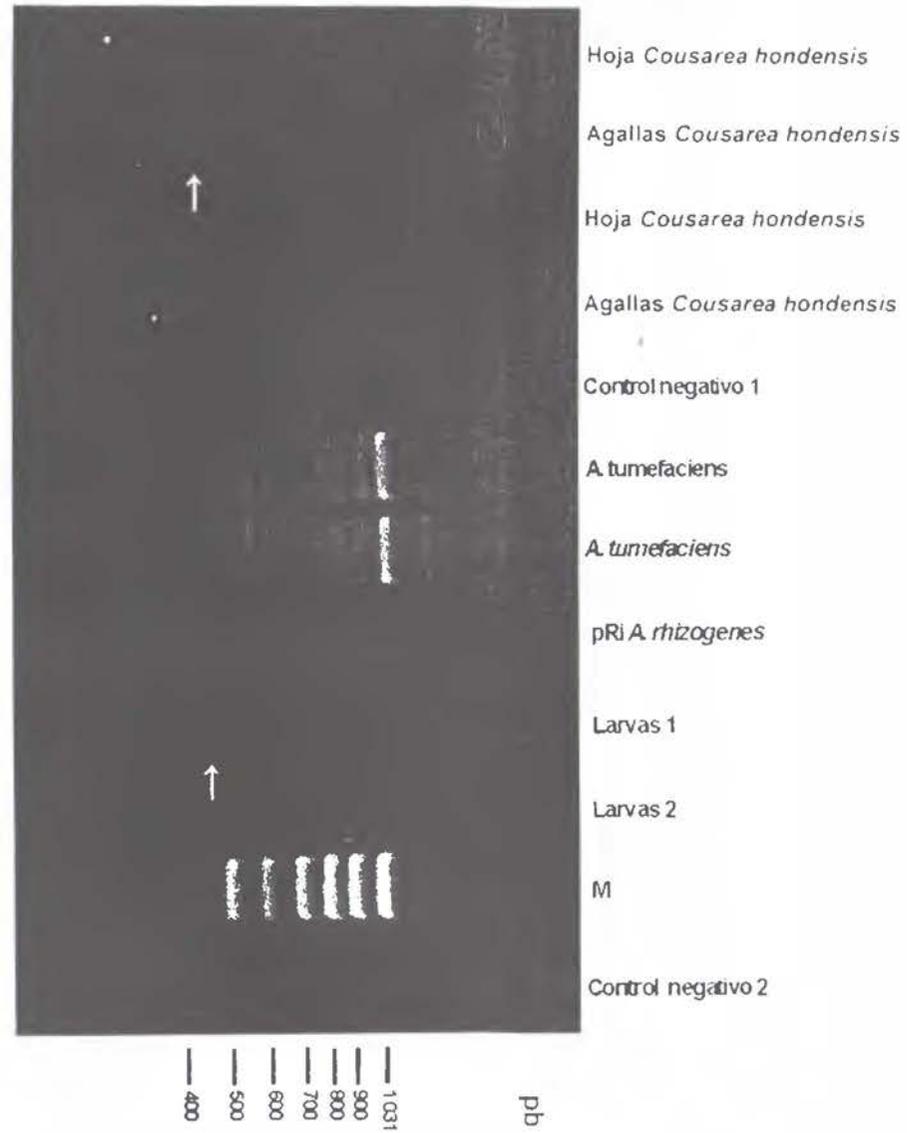


Figura 18. Alineamiento de las secuencias 5,6 y 7 amplificadas de forma específica a partir del ADN extraído de las muestras de agallas 38, 39 y 40 respectivamente, y de la secuencia amplificada diferencialmente por RAPD en la muestra de agalla 11. Se muestra la secuencia de nucleótidos consenso, que corresponde a la región amplificada con los iniciadores específicos diseñados con este fin.

	10	20	30	40
sequence 3-A11 RAPD
sequence 17-A38	-----	-----	-----	-----
sequence 18-A40	-----	-----	-----	-----
sequence 19-A39	-----	-----	-----	-----
Clustal Consensus				

	50	60	70	80
sequence 3-A11 RAPD
sequence 17-A38	-----	-----	-----	-----
sequence 18-A40	-----	-----	-----	-----
sequence 19-A39	-----	-----	-----	-----
Clustal Consensus				

	90	100	110	120
sequence 3-A11 RAPD
sequence 17-A38	-----	-----	-----	-----
sequence 18-A40	-----	-----	-----	-----
sequence 19-A39	-----	-----	-----	-----
Clustal Consensus				

	130	140	150	160
sequence 3-A11 RAPD
sequence 17-A38	-----	-----	-----	-----
sequence 18-A40	-----	-----	-----	-----
sequence 19-A39	-----	-----	-----	-----
Clustal Consensus				

	170	180	190	200
sequence 3-A11 RAPD
sequence 17-A38	-----	-----	-----	-----
sequence 18-A40	-----	-----	-----	-----
sequence 19-A39	-----	-----	-----	-----
Clustal Consensus	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *

	210	220	230	240
sequence 3-A11 RAPD
sequence 17-A38	-----	-----	-----	-----
sequence 18-A40	-----	-----	-----	-----
sequence 19-A39	-----	-----	-----	-----
Clustal Consensus	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *

	250	260	270	280
sequence 3-A11 RAPD
sequence 17-A38	-----	-----	-----	-----
sequence 18-A40	-----	-----	-----	-----
sequence 19-A39	-----	-----	-----	-----
Clustal Consensus	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *

	290	300	310	320

sequence 3-A11 RAPD	AGCACTCAAG	CCTTACGTCT	GCGACAACCC	ACTGTGCCTT
sequence 17-A38	AGCACTCAAG	CCTTACGTCT	GCGACAACCC	ACTGTGCCTT
sequence 18-A40	AGCACTCAAG	CCTTACGTCT	GCGACAACCC	ACTGTGCCTT
sequence 19-A39	AGCACTCAAG	CCTTACGTCT	GCGACAACCC	ACTGTGCCTT
Clustal Consensus	*****	*****	*****	*****

	330	340	350	360

sequence 3-A11 RAPD	TACCAGTACA	TGAGTCTCGG	TTTCGGTCCA	AGCATTGATC
sequence 17-A38	TACCAGTACA	TGAGTCTCGG	TTTCGGTCCA	AGCATTAA--
sequence 18-A40	TACCAGTACA	TGAGTCTCGG	TTTCGGTCCA	AGCATTAA--
sequence 19-A39	TACCAGTACA	TGAGTCTCGG	TTTCGGTCCA	AGCATTAA--
Clustal Consensus	*****	*****	*****	***** *

	370	380	390	400

sequence 3-A11 RAPD	ATGGAGATCAT	CACTAAACCA	CTGGTCATCG	ATCTGTCTCAT
sequence 17-A38	---ENCNCT	CTNNCNCCTC	TCCCTCNCCT	TTCCNCCATC
sequence 18-A40	---IANNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN
sequence 19-A39	---IANNNNN	NNNNNNNNNN	CNCNENNCCT	ANCITNNCCN
Clustal Consensus	*			

	410	420	430	440

sequence 3-A11 RAPD	CTCATCTGC	TACAGCAGTG	CTGGGAATGG	CATTCTCAAG
sequence 17-A38	CCCNCCTCCNC	CTTTCNCNA	CCTCCTTATN	CNNTCC----
sequence 18-A40	NNNCNNNNCN	NNNNNNNNNN	NNNNNNCCTN	NC-----
sequence 19-A39	NNNCNNNNCN	NNNNNNNNNN	NCNNCNNNC-	-----
Clustal Consensus				

	450	460	470	480

sequence 3-A11 RAPD	GACTTTCCTG	TGGGATTGGC	GATCACAGTA	CCACGCTCGT
sequence 17-A38	-----	-----	-----	-----
sequence 18-A40	-----	-----	-----	-----
sequence 19-A39	-----	-----	-----	-----
Clustal Consensus				

	490	500	510	
	
sequence 3-A11 RAPD	TCACCGGAAN	NNCCTGNCAA	ACTNATNANC	N
sequence 17-A38	-----	-----	-----	-
sequence 18-A40	-----	-----	-----	-
sequence 19-A39	-----	-----	-----	-
Clustal Consensus				

Figura 19. Posible Modelo de inducción, formación y acción "In Situ" para explicar la formación de las agallas. **A)** Oviposición y proceso de inducción inicial. **B)** Hiperplasia e hipertrofia del tejido preacondicionado. **C)** Regulación y modulación del proceso de morfogénesis, por medio de la secreción de Factores Químicos Reguladores (FQRs) por el insecto.

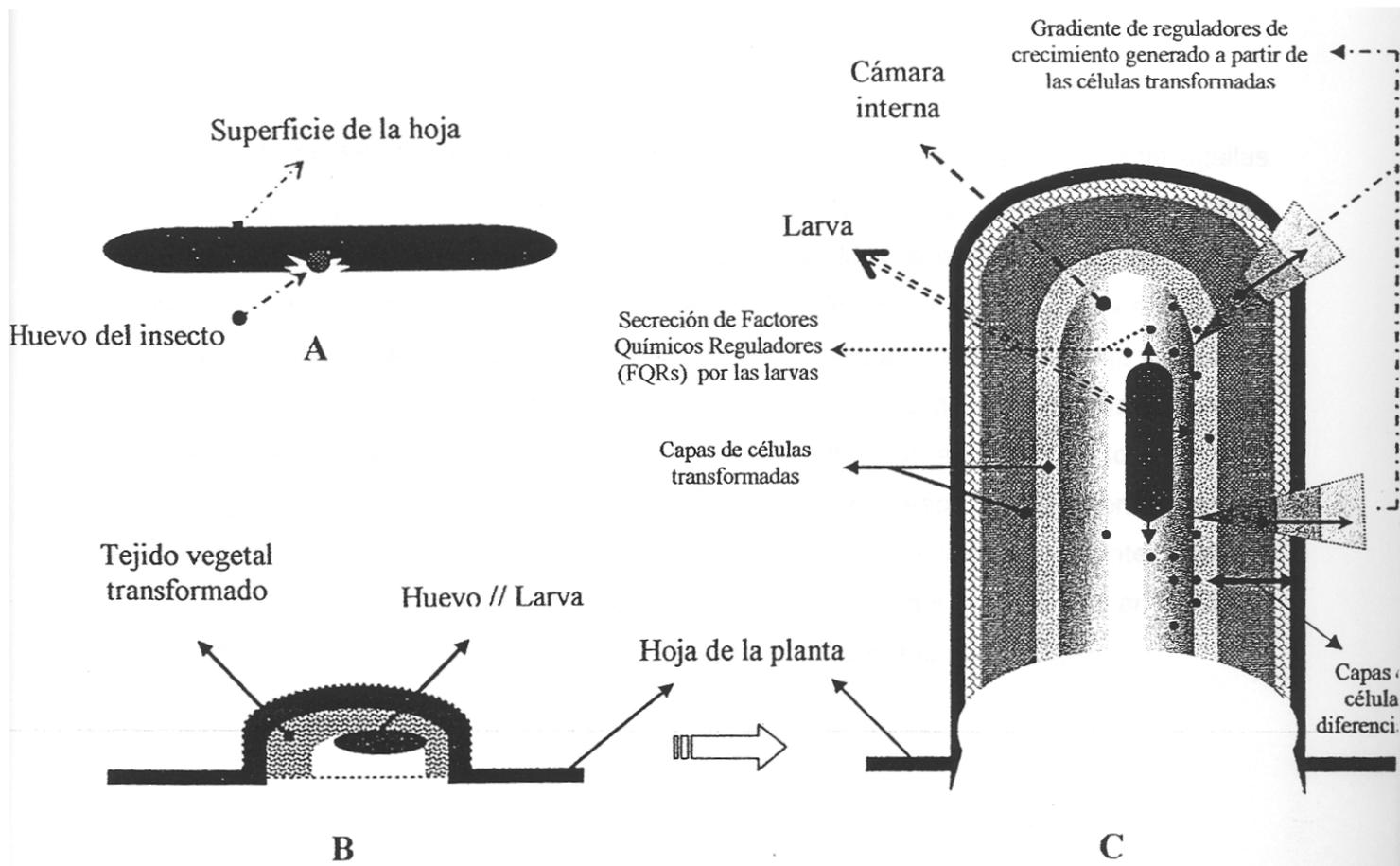
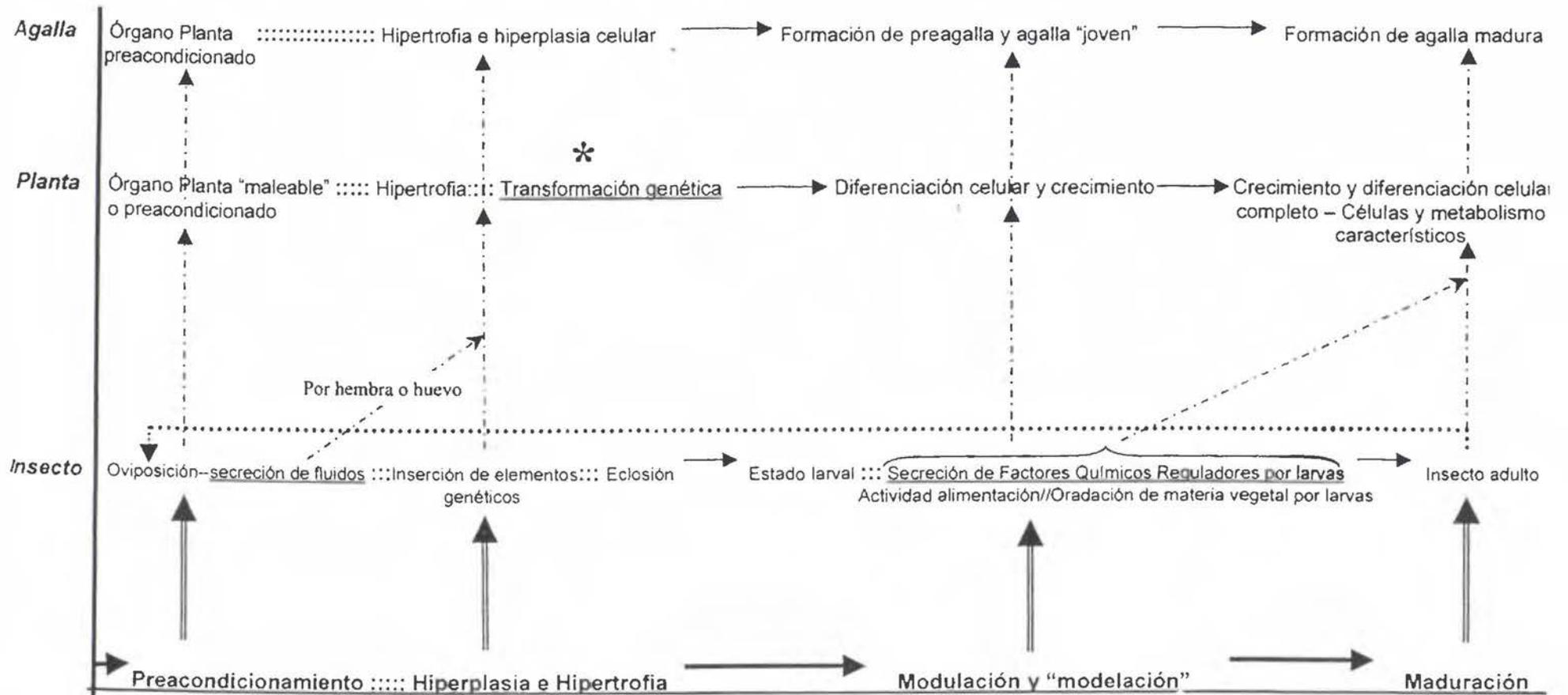


Figura 20. Modelo bidimensional causa – efecto, para explicar la formación de agallas de plantas inducidas por insectos. En el eje horizontal se representan los principales procesos y acontecimientos que estarían ocurriendo durante el proceso de inducción y formación de las agallas. Los procesos que ocurren de forma consecutiva y simultánea se indican mediante la unión de dos líneas de puntos consecutivos. En el eje vertical se indican los principales acontecimientos que ocurren en cada uno de los diferentes escenarios; esto es, en el insecto, la agalla y la planta. Los acontecimientos descritos en el eje vertical están directamente en función de los procesos descritos en la primera línea del eje horizontal. Al integrar y relacionar los procesos y acontecimientos siguiendo las flechas como un diagrama de flujo, se pueden integrar estos en términos de una relación causa- efecto, para cada uno de los diferentes escenarios.

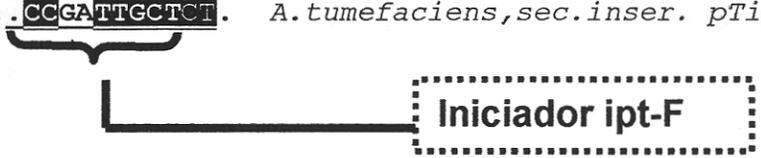


ANEXOS

970	980	990	1000	
.....				
.....CTTGACTTGAATGCGCCTTCGTGGTGA.AAATTG				<i>Erwinia herbicola, ipt5-1.seq.</i>
.TAATC..GATTTGA.....CCGTCAAT.....				<i>A. tumefaciens, plásmido Ti.</i>
CTTATTTTGACTTAAAGGCGCCTGCGTGGTIGACAAATTG				<i>A. vitis, plásmido pTiS4.</i>
.....ATTG				<i>A. vitis, ipt4-1.sec.</i>
				<i>A. tumefaciens, sec.inser. pTi.</i>

1010	1020	1030	1040	
.....				
TTTTCAAAGA.....GTTAT.....TTTA.....				<i>Erwinia herbicola, ipt5-1.seq.</i>
TTTTCAAGGAGACAGCCATGGCCACACTTTTGTGAAATA				<i>A. tumefaciens, plásmido Ti.</i>
.....CAGTTATA..CTGATGTTACCATATGA				<i>A. vitis, plásmido pTiS4.</i>
CTTCAAGGAAACAGCCGCGCCACACTTTTGTGAAATA				<i>A. vitis, ipt4-1.sec.</i>
.....GCTGAAAGG				<i>A. tumefaciens, sec.inser. pTi.</i>

1050	1060	1070	1080	
.....				
.....GCTGA.GTCACTTGCT...				<i>Erwinia herbicola ipt5-1.seq</i>
CAAGTTGCCCTTGGGAGACGCTAAGGCCACTTGCTCTA				<i>A. tumefaciens, plásmido Ti.</i>
GATATCGCTCTATAAA.....TTG..GCCATTT....TG				<i>A. vitis, plásmido pTiS4.</i>
CAAGTTGCCCTTGGGAGACGCTAAGGCCATTTGCTCTT				<i>A. vitis, ipt4-1.sec.</i>
GAAGCTTCCCTT.....CCGATTGCTCT.				<i>A. tumefaciens, sec.inser. pTi.</i>



1090	1100	1110	1120	
.....				
.....TATGA.....				<i>Erwinia herbicola (ipt5-1.seq.)</i>
CAATAAGTAACCCGGAGGAAGACAATATAACAGGCTCTGG				<i>A. tumefaciens, plásmido Ti.</i>
CAA.....ATC.....CAAACCCAAG				<i>A. vitis, plásmido pTiS4.</i>
CAATAAGGAATCTCGAGGAAGACAATATAACAGCCTGTGA				<i>A. vitis. (ipt4-1.sec.)</i>
.....TGGCAGG.....				<i>A. tumefaciens, sec.inser. pTi.</i>

Anexo 1: Alineamiento de los genes *ipt* de *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia herbicola* y *Agrobacterium vitis*, en donde se muestran las regiones consenso y la secuencia consenso de nucleótidos a partir de la cual se sintetizó el iniciador *ipt-F*. El alineamiento mostrado corresponde únicamente a las regiones aledañas a la secuencia consenso del iniciador *ipt-F*.

VIII) BIBLIOGRAFIA:

1. Alberts B., Jonson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Walter P. 2002. Molecular Biology of The Cell. Garland Science, New York, United States of America.
2. Ananthkrishnan T. N. 1998. Insect gall systems: Patterns, processes y adaptive diversity. Current Science, 75 (7): 672 - 676.
3. Anollés C. y Gresshoff P. 1997. DNA Markers. WILEY - VCH . New York: 4 - 13.
4. Ashen J. y Goff L. 1998. Galls in the marine alga *Prionitis lanceolata* (Halymeniaceae): Specific induction y subsequent development of an alga - bacterial symbiosis. American Journal of Botany, 85 (12): 1710 - 1721.
5. Ausubel Frederick M., Brent R., Kingston R., Moore D., Seidman J., Smith J. y Struhl K. 1994. Current Protocols In Molecular Biology. Massachusetts General Hospital. Harvard Medical School. USA. John Wiley & Sons, Inc. Printed in United States of America. New York.
6. Bauer D., Warthoe P., Rohde M. y Strauss M. 1994. Detection y Differential Display of Expressed Genes by DDRT – PCR. PCR Methods y Applications, 4: 97 – 108.
7. Bright S.1998. Plant Biotechnology. Current Opinion In Plant Biology, 1: 159 - 160.
8. Birch R. G. 1997. Plant transformation: problems y strategies for practical application. Annual Reviews In Plant Physiology y Plant Molecular Biology, 48: 297 - 326.

9. Cooper L. D., Doos R. P., Price R., Peterson K. y Oliver J. E. 2005. Application of Bruchin B to pea pods results in the up- regulation of CYP93C18, a putative isoflavone synthase gene, and an increase in the level of pisatin, an isoflavone phytoalexin. *Journal of Experimental Botany*, 56 (414): 1229- 1237.
10. Davey M.R., Curtis I., Gartland K. y Power J. B. 1994. *Agrobacterium* –Induced crown gall and hairy rot diseases: their biology and application to plant genetics engineering (ed. Williams M.). In *Plant Galls: Organisms, Interactions, Populations*, pp. 283-299. The Systematics Association. Special Volume No. 49. By Clarendon Press, Oxford. London, UK.
11. De la Cruz F. y Davies J. 2000. Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends in Microbiology*, 8: 128-133.
12. Dellaporta S. L., Wood J. y Hicks J. B. 1983. A Plant DNA Miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology, Reporter* 1 (14): 19- 21.
13. Doss R., Oliver J., Proebsting W., Potter S., Kuy S., Clement S., Willianson T., Carney J. y De Vilbiss D. 2000. Bruchins: Insect – derived plant regulators that stimulate neoplasm formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97 (11): 6218- 6223.
14. Fujioka S. y Yokota T. 2003. Biosynthesis and metabolism of Brassinosteroids. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 54: 137-156.
15. Fukuda H. 2004. Signals that control plant vascular cell differentiation. *Molecular Cell Biology- Nature Reviews*, 5: 379- 391.
16. Galindo J., Poirier M., Guo H., Huvar A., Waganan P., Zhu J., Tench J., Wan J. y Erlander M. 1997; In *DNA Markers: Protocols, Applications y Overviews*. Caetano-Anollés G. y Gresshoff P. (eds.). 1997. Wiley - VCH. New York.

17. Gámez R. 1999. La biodiversidad costarricense y su papel en el desarrollo del país. Memoria del Simposio sobre Desarrollo Sostenible: la opción para Costa Rica. Academia Nacional de Ciencias. San José, Costa Rica.
18. Hall T. 2000. BioEdit version 4.8.10.1. North Carolina State University. Carolina, USA.
19. Hartley S. E. 1997. The chemical composition of plant galls: are the levels of nutrients y secondary compounds controlled by the gall - former. *Oecology*, 113: 492 - 501.
20. Hartnett D. y Abrahamson W. 1979. The effects of stem gall insects on life history patterns in *Solidago canadensis*. *Ecology*, 60 (5) : 910 – 917.
21. Hentschel U., Steinert M. y Hacker J. 2000. Common Molecular mechanism of symbiosis and pathogenesis. *Trends In Microbiology*, 8 (5): 226 – 231
22. Hess J., Laumen H. y Wirth T. 1998. Application of differential cDNA screening techniques to the identification of unique gene expression in tumours y lymphocytes. *Current Opinion in Immunology*, 10: 125 - 130.
23. Hori K. 1992. Insect Secretion y Their Effect on Plant Growth, with Special Reference to Hemipterans. In *Biology of Insect - Induced Galls*. Shorthouse J. y Rohfritsch O. (eds). Oxford University Press. New York, USA.
24. Ishida Y., Saito H., Ohta S., Hiei y., Komari T.. y Kumashiro T. 1996. High efficiency transformation of maize (*Zea mays*) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnology*, 14: 745 - 750.
25. Kraus C. y Spiteller G. 1997. Comparison of phenolic compound from galls and shoots of *Picea glauca*. *Phytochemistry*, 44 (1): 59 – 67.

26. Leitch I. J. 1994. Induction and development of the bean gall caused by *Pontania proxima* (Williams M.). In Plant Galls: Organisms, Interactions, Populations. The Systematics Association. Special Volume No. 49. By Clarendon Press, Oxford. London, UK :283-299.
27. Lichter A., Barash I., Valinsky L., y Manulis S. 1995. The genes involved in cytokinin biosynthesis in *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae*: Characterization and role in gall formation. *Journal of Bacteriology*, 177 (15).
28. Lorne T. Kirby L. 1990. An Introduction to DNA Fingerprinting. Stockton Press. Printed in United States of America, 110 - 115.
29. Mani M. S. 1992. Introduction to Cecidology. In Biology of Insect - Induced Galls. Rohfritsch O. y Shorthouse J.(eds). 1992. Oxford University Press. New York:3 - 6.
30. Maniattis T., Sambrook J. y Fritsch E. F. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
31. McCalla D., Genthe M., y Hovanitz W. 1961. Chemical nature of an insect gall growth - factor. *Plant Physiology*, 37: 98 - 103.
32. Micheli M. R. y Bova R. 1997. Fingerprinting methods based on arbitrarily primed PCR. Springer - Verlag. Berlin - Germany.
33. Miles P. W. 1968. Insect secretions in plants. *Phytopathology*, 6: 137 - 164.
34. Montaldo A. 1977. Cultivo de Raíces y Tubérculos Tropicales. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA. Lima, Perú. P: 110.
35. Müssig C. y Altmann T. 2000. Brassinosteroids signaling in plants. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 12 (9): 398- 402.

36. Nieves- Aldrey J. L. 1998. Insectos que inducen la formación de agallas en las plantas: una fascinante interacción ecológica y evolutiva. *Boletín SEA*, 23: 3-12.
37. Nyman T. y Julkunen T. 2000. Manipulation of phenolic chemistry of willows by gall – inducing sawflies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97: 13184 – 13187.
38. Nyman T., Widmer A. y Roininen H. 2000. Evolution of gall morphology and host-plant relationships in Willow- feeding sawflies (Hymenoptera: Tenthredinidae). *Evolution Int. J. Org. Evolution*, 54 (2): 526-533.
39. Pinkwart W., Diettrich B. y Luckner M. 1998. Uptake of cardenolides from phloem sap into crown galls of *Digitalis lanata*. *Phytochemistry*, 49 (1): 71 – 77.
40. Piñol M., Palazón J., Cusidó R. y Serrano M. 1996. Effects of Ri T – DNA *Agrobacterium rhizogenes* on growth y Hyoscyamine production in *Datura stramonium* roots cultures. *Botánica Acta*, 109: 133- 138.
41. Piñol M., Palazón J., Cusidó R. y Serrano M. 1996. Effects of Ri T-DNA from *Agrobacterium rhizogenes* on growth and hyoscyamine production in *Datura stramonium* root culture. *Botanica Acta*, 109 (2): 133-138.
42. Price P. W., Waring G. L. y Fernández G. W. 1986. Hypotheses on the adaptive nature of galls. *Proc. Entomol. Soc. Wash*, 88 (2):361 – 363.
43. Rohfritsch O. y Shorthouse J. D. 1982. Insect Galls. In *Molecular Biology of Plant Tumors*. Kahl G. y Schell J. S. (eds) Academic Press. New York, 131 - 152.
44. Shorthouse J. D y Rohfritsch O. 1992. *Biology of the Insect - Induced Galls*. Oxford University Press. New York, USA: 157 - 169.
45. Stone G. y Schönrogge K. 2003. The adaptive significance of insect gall morphology. *Trends in Ecology and Evolution*, 18: 512 – 522.

46. Stone G. y Cook J. 1998. The structure of cynipid oak galls: patterns in the evolution of an extended phenotype. *Science*, 265(1400): 979 - 988.
42. Temmerman W., Vereecke D., Dreesen R., Van Montagu M., Holsters M. and Goethals K. 2000. Leafy Galls formation is controlled by *fasR*, an AraC-type regulatory gene en *Rhodococcus facians*. *Journal of Bacteriology*, 182 (20): 5 832- 5 840.
43. Vereecke D., Klarskov K., Debruyne A., Vanmontagu M. y Goethals. 1997. Patterns of phenolic compound in leafy galls of tobacco. *Planta*, 210 (3): 342 – 348.
44. Watson J., Gilman M., Witkowski M. y Zoller M. 1996. *Recombinant DNA*. Second Edition. Scientific American Books. New York, 273 - 292.
45. Weber H. 2002. Fatty acid- derived signals in plants. *Trends in Plant Science*, 7 (5): 217- 224.
46. Welsh J. y McClelland M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acid Research*, 18 (24): 7213- 7218.
47. Williams J. G., Kubelik A., Livak K., Rafalski J. A. y Tingey S. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research*, 18 (22): 6531- 6535.
48. Williams M. 1994. Plant galls: a perspective. Williams M. (ed.). In *Plant Galls: Organisms, Interactions, Populations*, pp. 283-299. The Systematics Association. Special Volume No. 49. By Clarendon Press, Oxford. London, UK.

49. Yeo U., Chae Y., So S., Lee W. y Sakurai N. 1997. Developmental changes of sugar contents in the gall on the leaf of elm (*Zelkova serrata* Makino) formed by *Paracolopha morrisoni* Baker (Homoptera). *Journal of Plant Biology*, 40 (1): 67 – 71.
50. Yoshikawa Y. y Furuya T. 1987. Saponin production by cultures of *Panax ginseng* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Reports*, 6 (6): 449- 453.
51. Zeidan M. y Czosnek H. 1994. Acquisition and transmission of *Agrobacterium* by whitefly *Bemisia tabaci*. *Mol. Plant Microbe Interact*, 7(6): 792-798.