BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

Universidad de Alicante

Disección genética del desarrollo de la hoja en Arabidopsis thaliana: Estudio de ecotipos y estirpes mutantes de la colección del Arabidopsis Information Service

José Serrano Cartagena

Tesis de Doctorado

Facultad: Ciencias

Director: Dr. José Luis Micol Molina

1998

Universidad de Alicante

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

Disección genética del desarrollo de la hoja en *Arabidopsis thaliana*: Estudio de ecotipos y estirpes mutantes de la colección del *Arabidopsis* Information Service

José Serrano Cartagena

San Juan de Alicante, 1998

Disección genética del desarrollo de la hoja en *Arabidopsis thaliana*: Estudio de ecotipos y estirpes mutantes de la colección del *Arabidopsis* Information Service

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

Trabajo realizado por el Licenciado José Serrano Cartagena, en la División de Genética, Departamento de Genética y Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Alicante, y en la División de Genética, Unidad predepartamental de Genética, Nutrición y Toxicología, Universidad Miguel Hernández, para optar al Grado de Doctor en Biología.

San Juan de Alicante, 3 de junio de 1998.

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

JOSE LUIS MICOL MOLINA, Profesor Titular de Genética de la Universidad Miguel Hernández,

HAGO CONSTAR

que el presente trabajo ha sido realizado bajo mi dirección y recoge fielmente la labor realizada por el Licenciado José Serrano Cartagena para optar al Grado de Doctor en Biología. Las investigaciones reflejadas en esta memoria se han desarrollado íntegramente en la División de Genética, inicialmente en la Universidad de Alicante y, desde el 1 de octubre de 1997, en la Universidad Miguel Hernández.

San Juan de Alicante, 3 de junio de 1998.

INDICE DE MATERIAS

INDICE DE FIGURAS IV
INDICE DE TABLAS VI

I .- INTRODUCCION **1**
I.1 .- Consideraciones generales sobre la Biología del desarrollo 1
I.2 .- Singularidades del desarrollo vegetal 2
I.3 .- Validez de los sistemas modelo para el estudio del desarrollo 4
I.4 .- *Arabidopsis thaliana* como sistema modelo en el estudio del desarrollo 4
I.5 .- Biología experimental de *Arabidopsis thaliana* 7
I.5.1 .- Anatomía y expresión del genoma 9
I.5.2 .- Inducción y caracterización de mutantes 11
I.6 .- Disección genética del desarrollo en *Arabidopsis thaliana* 14
I.6.1 .- Desarrollo embrionario 14
I.6.2 .- Morfogénesis de la raíz 19
I.6.3 .- Desarrollo vegetativo 23
I.6.4 .- Ontogenia de la hoja 34
I.6.4.1 .- Análisis genético del desarrollo de la hoja 36
I.6.4.2 .- Efectos de las condiciones fisiológicas y ambientales sobre el desarrollo de la hoja 44
I.6.5 .- La transición floral 45
I.6.6 .- Morfogénesis floral 47
I.6.7 .- Fotomorfogénesis 52

II .- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS **55**

III .- MATERIALES Y METODOS **60**
III.1 .- Cultivos 60
III.1.1 .- Condiciones de cultivo de *Arabidopsis thaliana* 60
III.1.1.1 .- Cultivo de *Arabidopsis thaliana* en caja de Petri 60
III.1.1.2 .- Cultivo de *Arabidopsis thaliana* en maceta 61
III.1.2 .- Cruzamientos y recolección de semillas 62
III.1.3 .- Conservación de estirpes 63
III.1.4 .- Control y erradicación de plagas 63
III.2 .- Nomenclatura para la denominación de genes, mutaciones y fenotipos 63
III.3 .- Estirpes utilizadas en este trabajo 64
III.3.1 .- Ecotipos 64

III.3.2 .- Estirpes mutantes 64
III.4 .- Observación microscópica y microfotografía 77
III.5 .- Análisis morfométrico 77
III.6 .- Medios de cultivo 78
III.6.1 .- Medios de cultivo líquidos 78
III.6.2 .- Medios de cultivo sólidos 78
III.6.3 .- Medios de cultivo suplementados con giberelinas 79
III.7 .- Pautas que se han seguido para la redacción de esta memoria 79

IV .- RESULTADOS 81
IV.1 .- Razones para un análisis genético de variantes silvestres y mutantes en la morfología de la hoja de *Arabidopsis thaliana* 81
IV.2 .- Análisis fenotípico y genético de la variabilidad natural de la arquitectura de la hoja en *Arabidopsis thaliana* 81
IV.2.1 .- Clasificación fenotípica de los ecotipos de la colección del AIS 82
IV.2.2 .- Estudio del patrón temporal de aparición de hojas vegetativas en los ecotipos de la colección del AIS 82
IV.2.3 .- Estudio de la transmisión de las variantes en la morfología foliar observadas en los ecotipos de la colección del AIS 85
IV.3 .- Análisis morfométrico de la expansión de las hojas vegetativas del ecotipo En-2 91
IV.4 .- Clasificación fenotípica de estirpes mutantes 95
IV.5 .- Caracterización de mutantes 95
IV.5.1 .- Clase fenotípica Incurvata 97
IV.5.1.1 .- Mutantes *incurvata* de floración temprana 97
IV.5.1.1.1 .- Estudio de la relación entre los genes *INCURVATA* y *AGAMOUS* 103
IV.5.1.1.1.1 .- Análisis de las interacciones entre *ICU1* y *AG* 103
IV.5.1.1.1.2 .- Análisis de las interacciones entre *ICU2* y *AG* 113
IV.5.1.1.2 .- Complementación entre los mutantes *icu* y *pif* 116
IV.5.1.1.3 .- Modulación del fenotipo de floración temprana de los mutantes *incurvata* 116
IV.5.1.2 .- Otros mutantes *incurvata* 118
IV.5.2 .- Clase fenotípica Transcurvata 121
IV.5.3 .- Clase fenotípica Ultracurvata 123
IV.5.4 .- Clase fenotípica Tortifolia 124
IV.5.5 .- Clase fenotípica Asymmetric leaves 124
IV.5.6 .- Clase fenotípica Angusta 129
IV.5.7 .- Clase fenotípica Filiforme 131
IV.5.8 .- Clase fenotípica Exigua 132

IV.5.9 .- Clase fenotípica Calyciforme 133
IV.5.10 .- Clase fenotípica Denticulata 133
IV.5.11 .- Grupo fenotípico Compact rosette 139
IV.5.11.1 .- Clase fenotípica de los mutantes *compact rosette* arbustivos 140
IV.5.11.2 .- Clase fenotípica de los mutantes *compact rosette* no arbustivos 148
IV.6 .- Estudio de interacciones entre mutaciones de diferentes clases fenotípicas 150
IV.7 .- Asignación de denominaciones de alelo 152
IV.8 .- Análisis de ligamiento de los genes identificados en los estudios de complementación 152

V .- DISCUSION 154
V.1 .- Una aproximación genética al análisis de la morfogénesis de la hoja en *Arabidopsis thaliana* 154
V.2 .- Análisis del crecimiento de las hojas vegetativas del ecotipo Enkheim-2 155
V.3 .- Caracterización de la variabilidad natural de la morfología de la hoja en la colección de ecotipos del AIS 156
V.4 .- Análisis genético de las estirpes de la colección AIS Form Mutants 160
V.4.1 .- Consideraciones acerca de la función de los genes identificados mediante el análisis genético de los mutantes estudiados en esta Tesis 161
V.4.1.1 .- Los mutantes *incurvata* 161
V.4.1.2 .- Los mutantes *denticulata* 166
V.4.1.3 .- Los mutantes *compact rosette* 168
V.4.1.4 .- Otros mutantes 169
V.4.2 .- Recapitulación 171

VI .- RESUMEN Y CONCLUSIONES 173

VII .- BIBLIOGRAFIA 176

AGRADECIMIENTOS 192

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Algunos de los recursos relacionados con *Arabidopsis* disponibles en Internet. 6
Figura 2.- Distribución geográfica de *Arabidopsis thaliana* 7
Figura 3.- Ciclo de vida de *Arabidopsis thaliana*. 8
Figura 4.- Algunos de los cambios en la morfología del sistema del tallo que se aprecian a lo largo del ciclo de vida de *Arabidopsis thaliana*..... 9
Figura 5.- Desarrollo embrionario en *Arabidopsis thaliana*..... 15
Figura 6.- Establecimiento del plan corporal de *Arabidopsis thaliana* durante el desarrollo embrionario.. 16
Figura 7.- Morfología de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.. 20
Figura 8.- Algunas propiedades del meristemo apical del tallo..... 25
Figura 9.- Representación esquemática de los cambios que experimenta el meristemo apical vegetativo de *Arabidopsis thaliana*.. 27
Figura 10.- Anatomía de la hoja..... 35
Figura 11.- Algunos aspectos de la ontogenia de la hoja. 39
Figura 12.- Presunto papel de los productos de los genes *AN*, *ROT3* y *ACL1* en la expansión de las células de la hoja en *Arabidopsis thaliana*..... 43
Figura 13.- Modelo para el control de la transición floral en *Arabidopsis thaliana*. 46
Figura 14.- Representación de la flor silvestre de *Arabidopsis thaliana*..... 48
Figura 15.- Modelo para el control genético del tipo de órgano floral en *Arabidopsis thaliana*. 50
Figura 16.- Modelo sobre el papel de los genes *DET1* y *DET2*.. 53
Figura 17.- Tipos de hojas simples recogidos en la *Philosophia botanica* de Carolus Linnaeus. 56
Figura 18.- Clases fenotípicas de mutantes alterados en la forma de la hoja o la estructura de la roseta, definidas por Reinholz en 1947..... 74
Figura 19.- Individuos representativos de los ecotipos elegidos para el estudio del modo de herencia de la variabilidad natural en la morfología de la hoja. 87
Figura 20.- Variación con respecto al tiempo de la superficie de las hojas vegetativas de En-2..... 92
Figura 21.- Variación con respecto al tiempo del perímetro de las hojas vegetativas de En-2..... 92
Figura 22.- Variación con respecto al tiempo de la longitud de las hojas vegetativas de En-2..... 93
Figura 23.- Variación con respecto al tiempo de la anchura de las hojas vegetativas de En-2..... 93

Figura 24.- Variación con respecto al tiempo de la relación entre la longitud y la anchura en las hojas vegetativas de En-2.....94
Figura 25.- Variación con respecto al tiempo de la forma y el tamaño de las hojas vegetativas de En-2.....94
Figura 26.- Individuos representativos de la clase fenotípica Incurvata de floración temprana.....98
Figura 27.- Individuos representativos del fenotipo de los dobles mutantes *incurvata*.....102
Figura 28.- Individuos representativos de los fenotipos que indican la interacción entre las mutaciones en *ICU1* y *AG*.....112
Figura 29.- Individuos representativos de los fenotipos que indican la interacción entre las mutaciones en *ICU1* y *ER*.....118
Figura 30.- Individuos representativos de la clase fenotípica Incurvata sin alteraciones en el tiempo de floración.....120
Figura 31.- Individuos representativos de las clases fenotípica Transcurvata, Ultracurvata y Tortifolia.....122
Figura 32.- Individuos representativos de la clase fenotípica Asymmetric leaves.....125
Figura 33.- Individuos representativos de las clases fenotípicas Angusta, Filiforme, Exigua y Calyciforme.....130
Figura 34.- Individuos representativos de la clase Denticulata.....134
Figura 35.- Efecto de la giberelina sobre el mutante *serrate*.....139
Figura 36.- Individuos representativos del fenotipo Compact rosette arbustivo.....141
Figura 37.- Individuos representativos de los fenotipos a los que da lugar la serie alélica de *CRO4*.....144
Figura 38.- Individuos representativos del fenotipo Compact rosette no arbustivo.....149
Figura 39.- Individuos representativos de los fenotipos obtenidos en el estudio de las interacciones entre los mutantes *an*, *as1*, *as2* y *se*.....151

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Genes cartografiados en *Arabidopsis thaliana* 13
Tabla 2.- Algunas mutaciones que perturban el desarrollo embrionario en *Arabidopsis thaliana* 18
Tabla 3.- Algunas mutaciones que alteran el desarrollo de la raíz en *Arabidopsis thaliana* 22
Tabla 4.- Algunas mutaciones que alteran el desarrollo del meristemo caulinar en *Arabidopsis thaliana* 33
Tabla 5.- Algunas mutaciones que alteran el desarrollo de la flor en *Arabidopsis thaliana* 51
Tabla 6.- Ecotipos de *Arabidopsis thaliana* utilizados en este trabajo..... 65
Tabla 7.- Descripción de algunos de los mutantes estudiados en esta Tesis..... 66
Tabla 8.- Descripción de las estirpes de la colección AIS Form Mutants..... 67
Tabla 9.- Mutantes empleados para ensayos de alelismo e interacciones genéticas..... 75
Tabla 10.- Líneas marcadoras empleadas para la cartografía génica..... 77
Tabla 11.- Clasificación de los ecotipos de *Arabidopsis thaliana* utilizados en este trabajo, en función de la morfología foliar y la apariencia de la roseta 83
Tabla 12.- Ritmo de aparición de las hojas en ecotipos..... 84
Tabla 13.- Características del hábitat natural de ecotipos con pautas atípicas de desarrollo vegetativo 85
Tabla 14.- Ecotipos elegidos para el estudio de la base genética de la variabilidad natural en la morfología de la hoja..... 86
Tabla 15.- Estudio del modo de herencia de la longitud del peciolo en ecotipos..... 90
Tabla 16.- Estudio del modo de herencia de la estructura marginal de la hoja en ecotipos 90
Tabla 17.- Estudio del modo de herencia de la forma del limbo en ecotipos..... 90
Tabla 18.- Programación de la recolección de hojas de En-2 para su análisis morfométrico..... 91
Tabla 19.- Clasificación fenotípica de las estirpes mutantes con hojas anormales..... 96
Tabla 20.- Estudio del modo de herencia del fenotipo Incurvata de floración temprana..... 99
Tabla 21.- Complementación entre los mutantes *incurvata* de floración temprana..... 100
Tabla 22.- Segregación fenotípica en la descendencia de los cruzamientos entre mutantes *incurvata* de floración temprana..... 101
Tabla 23.- Segregación fenotípica en la descendencia F_2 de cruzamientos entre mutantes *icu1-3* y *ag-1* 104

Tabla 24.- Segregación fenotípica en las familias F_3 obtenidas a partir de cruzamientos entre mutantes *icu1-3* y *ag-1* 106
Tabla 25.- Segregación del fenotipo Incurvata en las familias F_3 obtenidas a partir de cruzamientos entre mutantes *icu1-3* y *ag-1*..... *107*
Tabla 26.- Segregación del fenotipo presuntamente doble mutante en las familias F_3 obtenidas a partir de cruzamientos entre mutantes *icu1-3* y *ag-1*..... *108*
Tabla 27.- Segregación fenotípica en las familias F_4 obtenidas a partir de cruzamientos entre mutantes *icu1-3* y *ag-1* 110
Tabla 28.- Segregación fenotípica en la descendencia F_2 de cruzamientos entre mutantes *icu1-5* y *ag-1*..... 113
Tabla 29.- Segregación fenotípica en las familias F_3 obtenidas a partir de cruzamientos entre mutantes *icu1-5* y *ag-1* 113
Tabla 30.- Segregación fenotípica en la descendencia F_2 de cruzamientos entre mutantes *icu2* y *ag-1*..... 114
Tabla 31.- Segregación fenotípica en las familias F_3 obtenidas a partir de cruzamientos entre mutantes *icu2* y *ag-1*..... 115
Tabla 32.- Complementación entre los mutantes *icu1-3*, *icu2*, *pif-1* y *pif-2*..... *116*
Tabla 33.- Segregación fenotípica en las familias F_4 obtenidas a partir de un cruzamiento entre *icu1-3* y *ag-1*..... 117
Tabla 34.- Estudio del modo de herencia del fenotipo Incurvata sin floración temprana..... 119
Tabla 35.- Complementación entre los mutantes *incurvata* 121
Tabla 36.- Estudio del modo de herencia del fenotipo Transcurvata..... 123
Tabla 37.- Estudio del modo de herencia del fenotipo Ultracurvata en CS3397..... 124
Tabla 38.- Complementación entre los mutantes *ultracurvata* e *invalida*..... *124*
Tabla 39.- Estudio del modo de herencia del fenotipo Asymmetric leaves..... 126
Tabla 40.- Complementación entre los mutantes *asymmetric leaves*..... *127*
Tabla 41.- Estudio de las interacciones entre las mutaciones *asymmetric leaves*..... *128*
Tabla 42.- Estudio de las familias F_3 obtenidas a partir del cruzamiento *as2-12/as2-12* x *as1-14/as1-14*..... 128
Tabla 43.- Estudio del modo de herencia del fenotipo Angusta..... 129
Tabla 44.- Complementación entre los mutantes *angusta* 129
Tabla 45.- Estudio del modo de herencia del fenotipo Filiforme..... 131
Tabla 46.- Estudio del modo de herencia del fenotipo Exigua..... 132
Tabla 47.- Estudio del modo de herencia del fenotipo Calyciforme..... 133
Tabla 48.- Estudio del modo de herencia del fenotipo Denticulata..... 136
Tabla 49.- Complementación entre los mutantes *denticulata*..... *136*
Tabla 50.- Efectos de la giberelina sobre la morfología de las estirpes Col-1 y CS3257 138
Tabla 51.- Estudio del modo de herencia del fenotipo Compact rosette arbustivo..... 140

Tabla 52.- Segregación de fenotipos secundarios en estirpes Compact rosette arbustivas 142
Tabla 53.- Complementación entre los mutantes *compact rosette* arbustivos..... 143
Tabla 54.- Interacciones entre algunas mutaciones *compact rosette*..... *145*
Tabla 55.- Respuesta a la luz de los mutantes *compact rosette*..... *146*
Tabla 56.- Respuesta de los mutantes *compact rosette* a la giberelina..... 147
Tabla 57.- Complementación entre las estirpes *compact rosette* y algunos mutantes con alteraciones en la respuesta fototrópica y a giberelina..... 147
Tabla 58.- Estudio del modo de herencia del fenotipo Compact rosette no arbustivo..... 148
Tabla 59.- Complementación entre los mutantes *compact rosette* no arbustivos..... 150
Tabla 60.- Equivalencias entre denominaciones de alelo y números de catálogo de los mutantes..... 152
Tabla 61.- Cruzamientos realizados para el análisis de ligamiento de los mutantes..... 153
Tabla 62.- Características diferenciales de las hojas vegetativas del ecotipo En-2..... 156

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

I.- INTRODUCCION

I.1.- Consideraciones generales sobre la Biología del desarrollo

Uno de los fenómenos biológicos que mayor interés despierta en nuestros días es el desarrollo, denominación genérica que se aplica al conjunto de los procesos que convierten al cigoto en un individuo capaz de contribuir a la perpetuación de su especie. Dos son los motivos fundamentales del relieve que ha adquirido este tema: Por un lado, el análisis causal del desarrollo constituye un reto a la inteligencia humana que muy pocos sistemas complejos pueden emular; por otro, su conocimiento permite su control en beneficio de nuestra especie, una perspectiva especialmente pertinente en un planeta cuyos recursos ganaderos y agrícolas convencionales podrían resultar insuficientes para alimentar a la humanidad dentro de pocas décadas.

El desarrollo conlleva la variación de la morfología y la fisiología de las células, los tejidos y el organismo completo a lo largo del ciclo de vida de éste, como consecuencia de la modulación de la expresión de los genes según patrones temporales y espaciales definidos. Las complejas estructuras que caracterizan la morfología de un organismo pluricelular aparecen como consecuencia de la ejecución de programas específicos de división y diferenciación celular, que están controlados genéticamente. Uno de los mayores desafíos para los biólogos del desarrollo contemporáneos es el de establecer los mecanismos por los que las células generan, perciben e interpretan los determinantes fundamentales de los programas de desarrollo: el linaje, la información posicional y la ambiental (Haughn *et al*., 1995).

Uno de los aspectos más importantes del desarrollo es la morfogénesis, la generación de la estructura corporal de un ser vivo y la de cada uno de sus órganos. Una herramienta de gran valor para la identificación de los agentes causales de la morfogénesis la constituyen los mutantes morfológicos, individuos portadores de una mutación que causa una morfología aberrante. El estudio de estos mutantes ha permitido la identificación de numerosos genes que juegan papeles cruciales en determinados programas de desarrollo. El fenotipo de tales mutantes nos provee de información sobre el papel de genes concretos, al evidenciar el efecto de la ausencia de un producto génico, de su insuficiencia o de su presencia ectópica. Merecen destacarse a este respecto los estudios a gran escala de Nüsslein-Volhard y Wieschaus (1980), en *Drosophila melanogaster*, de Jürgens *et al.* (1991), en *Arabidopsis thaliana*, y de Haffter *et al.* (1996), en *Danio rerio*.

I.2.- Singularidades del desarrollo vegetal

A lo largo de los últimos doscientos años, la mayoría de los estudios sobre fenómenos de desarrollo se han realizado en animales. Conceptos actualmente en uso tanto entre los biólogos del desarrollo animal como los del vegetal, tales como los de determinación, diferenciación, totipotencia celular y formación de patrones tienen su origen en los estudios sobre la ontogenia animal, hoy considerados clásicos, que se realizaron en torno al comienzo de nuestro siglo, mediante la manipulación quirúrgica de embriones o de adultos con capacidad de regeneración de extremidades amputadas, así como los que se llevaron a cabo más tarde, mediante la obtención y el análisis de mutantes morfológicos (Gilbert, 1994). Está fuera de duda que la Biología del desarrollo adquiere categoría de ciencia experimental de la mano de los embriólogos experimentales de finales del siglo XIX, y de los genéticos del desarrollo que les sucedieron, todos los cuales concentraban su atención en el estudio del desarrollo animal (García-Bellido, 1987). Sin embargo, no puede ignorarse que algunos de los fundamentos de la Biología del desarrollo moderna tienen su origen en estudios realizados en especies vegetales. Son ejemplos de ello la noción de homología (Goethe, 1790), la teoría celular (Schleiden, 1839), la identificación del núcleo y el protoplasma (Brown, 1831; Mohl, 1846), el reconocimiento de la alternancia de generaciones (Hofmeister, 1851) y la denominación de las etapas de la mitosis (profase, metafase, anafase y telofase; Strasburger, 1884), que nacen de aproximaciones descriptivas o experimentales al estudio del desarrollo vegetal (citados todos ellos en Meyerowitz, 1994c, quien lo hace a su vez de Sachs, 1890, y Bower, 1935). Paradójicamente, las plantas han recibido menos atención que los animales en lo relativo al análisis causal de su desarrollo. La supremacía del análisis causal sobre el meramente descriptivo se ha alcanzado en la Biología del desarrollo vegetal con más de una década de retraso con respecto a lo sucedido entre los biólogos del desarrollo animal (Meyerowitz, 1994c).

El desarrollo vegetal presenta características propias que lo distinguen del animal, como la inexistencia de migración celular, provocada por la presencia de una pared celular rígida, que fuerza a las células a permanecer junto a sus progenitoras. Este fenómeno ha facilitado el seguimiento de los linajes celulares y la constatación de la existencia de estrictos controles que operan sobre el número y el plano de las divisiones celulares, ya que la posición de una célula viene determinada por la orientación de la división que la ha generado (Fosket, 1994). Otra consecuencia de la inmovilidad de las células vegetales es que su diferenciación tiene lugar en un contexto de células vecinas con un linaje común.

Otra de las características que singularizan el desarrollo vegetal es la totipotencia, la capacidad de desdiferenciación de casi todas las células de una planta, que permite la obtención de un organismo completo a partir de cualquiera de las partes de otro. La totipotencia es la manifestación más extrema de la plasticidad inherente al desarrollo vegetal, y una prueba de que la identidad celular, una vez establecida, debe ser mantenida activamente para evitar el retorno al estado indiferenciado de los meristemos (Taylor, 1997). Para este mantenimiento de la identidad celular se han propuesto diversos mecanismos, entre ellos la existencia de determinantes que residirían en la pared celular (Pennell *et al*., 1995), de su interacción con otros ligandos y receptores específicos, situados en la pared de células adyacentes (Clark *et al*., 1997), o la transmisión simplásmica de estos determinantes a través de los plasmodesmos que unen células vecinas (Schiefelbein *et al*., 1997).

Cabe añadir a las características hasta aquí mencionadas la sencillez de la morfología de las plantas, que están constituidas por tan sólo tres tipos de órganos vegetativos (la raíz, el tallo y las hojas), tres reproductores (los pétalos, estambres y carpelos) y dos de reserva y protección (el fruto y los cotiledones). Estas estructuras están compuestas por únicamente diez tipos básicos de tejidos, que no integran más que quince tipos de células (Goldberg, 1988).

El desarrollo vegetal es fundamentalmente postembrionario, ya que durante la embriogénesis se conforma únicamente el plan básico del organismo y se definen el meristemo vegetativo y el radicular. El embrión se organiza en un rudimento de lo que será el individuo adulto, que a su vez no se estructura de forma definida hasta después de la germinación. El crecimiento meristemático de las plantas es continuo y puede mantenerse, en el caso de las especies perennes, durante toda su vida. Esta indeterminación de su desarrollo dota a las plantas de una mayor flexibilidad para integrar las decisiones sobre diferenciación y morfogénesis con los cambios ambientales. La plasticidad de su desarrollo representa una adaptación de las plantas a su vida autotrófica y sedentaria, ya que deben crecer continuamente para asegurarse un acceso permanente a las sustancias de su entorno, expandiendo las superficies corporales a través de las cuales tiene lugar la incorporación de nutrientes (Taylor, 1997).

También diferencia a los animales de las plantas el que éstas no establezcan una separación temprana entre las líneas germinal y somática. De hecho, la mayoría de las especies vegetales puede reproducirse sexual y asexualmente, produciendo en este último caso una descendencia genéticamente idéntica a su progenitor (Fosket, 1994).

I.3.- Validez de los sistemas modelo para el estudio del desarrollo

Se denomina sistema u organismo modelo a cualquiera de los organismos experimentales en cuyo estudio se concentran los esfuerzos de un grupo amplio de equipos de investigación, con el fin de obtener conclusiones que puedan ser generalizables a otras especies. La elección de sistemas modelo para el estudio del desarrollo se ha guiado por criterios diversos, dependiendo de la aproximación a emplear, siendo características comunes a la mayoría de ellos las de tratarse de organismos de pequeño tamaño, de ciclo de vida corto y de mantenimiento simple y económico en el laboratorio.

El autodenominado "grupo del fago", liderado por Max Delbrück, constituye el ejemplo más notable de la utilidad de la concentración de esfuerzos en el estudio de un sistema modelo, *Escherichia coli* y sus fagos (Varios autores, 1992). La actividad de los miembros de dicho grupo sentó las bases de la moderna Biología molecular, conduciendo en un breve espacio de tiempo a espectaculares progresos en la comprensión de los mecanismos de flujo de la información genética.

Para los abordajes genéticos a la disección del desarrollo animal se han empleado organismos con ciclo de vida corto y muy prolíficos, como *Drosophila melanogaster* (Leptin, 1994) o el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Hope, 1994). Para las manipulaciones embrionarias se han utilizado organismos con oocitos de gran tamaño, como los anfibios (Slack, 1994), o con embriones transparentes, como los equinodermos (Hardin, 1994). El criterio del interés agronómico ha sido el que se ha seguido a lo largo de nuestro siglo para la elección de especies vegetales en las que concentrar esfuerzos investigadores. Esta es la razón de que la especie mejor estudiada a nivel genético, molecular y de desarrollo sea el maíz (*Zea mays*), una planta que rebasa ampliamente los dos metros de altura, con una sola generación anual y un genoma haploide de $5{,}5 \cdot 10^9$ kb (Fosket, 1994).

I.4.- *Arabidopsis thaliana* como sistema modelo en el estudio del desarrollo

A pesar de que las virtudes de *Arabidopsis thaliana* como especie en la que el análisis genético es factible y productivo fueron ensalzadas convincentemente por Rédei en 1975, no es hasta finales de la década de los ochenta cuando esta planta se convierte en uno de los organismos experimentales de elección preferente en Biología vegetal (Meyerowitz, 1994c). *Arabidopsis thaliana* reúne una serie de características que la han convertido en el objeto de estudio por excelencia de la mayoría de los

laboratorios dedicados a la Biología experimental de las plantas. Una de ellas es su pequeño tamaño, unos 30 cm de altura, que permite siembras de hasta 10.000 plantas/m^2 (Meyerowitz, 1987). Su ciclo de vida es corto, de unas 6 semanas cuando es cultivada a 25°C bajo iluminación continua. Es una especie muy prolífica, capaz de producir hasta 10.000 semillas por planta (Meyerowitz, 1987), siendo relativamente sencilla la realización de cruzamientos. El mantenimiento de estirpes no reviste dificultad alguna, ya que la planta es autógama, autofecundándose sin necesidad de la intervención humana, y sus semillas permanecen viables durante varios años a temperatura ambiente (Gómez-Campo, 1976).

A pesar de las pequeñas dimensiones de su genoma haploide (véase el apartado I.5.1, en la página 9), unas 100 Mb (megabases), *Arabidopsis thaliana* presenta las características típicas de otras angiospermas en lo referente a morfología, anatomía, crecimiento, desarrollo y respuestas al ambiente. En consecuencia, no hay razón alguna para pensar que cuente con menos genes que cualquier otra de las 250.000 especies de plantas con flores que han aparecido en el planeta en los últimos 150 millones de años (Meyerowitz, 1994b). Los resultados de la investigación en *Arabidopsis* son, por consiguiente, potencialmente aplicables a cualquier otra planta con flores. Por sus características, es el organismo de cuyo estudio puede obtenerse un mayor número de conclusiones generalizables a la mayor parte de las especies vegetales que el hombre explota industrialmente o de las que se beneficia por su contribución a la fijación de energía y al mantenimiento del equilibrio gaseoso en la atmósfera de nuestro planeta (Meyerowitz, 1989).

Merece comentario, también, que se dispone de datos de ligamiento de más de 500 genes (véase el apartado I.5.2, en la página 11) y que existen varios procedimientos de transformación por infección con *Agrobacterium tumefaciens*, que han posibilitado la obtención de una amplia colección de mutantes señalizados, gracias a los cuales se han clonado y caracterizado más de 40 genes (Azpiroz-Leehan y Feldmann, 1997). Se han creado tres centros de conservación y distribución de estirpes y clones de ADN, uno en Europa (NASC; Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre), otro en Estados Unidos (ABRC; *Arabidopsis* Biological Resource Center) y el tercero en Japón (SENDAI *Arabidopsis* Seed Stock Center). Cabe destacar, por último, la amplitud del repertorio de recursos informáticos disponibles para quienes investigan en *Arabidopsis thaliana*, a los que se

Arabidopsis thaliana links

AGI: The *Arabidopsis* Genome Initiative

- **AtDB's AGI general information**
- **The SPP Consortium (Chromosome 1).** Stanford DNA Sequence & Technology Center, Stanford University. The *Arabidopsis thaliana* Genome Center (ATGC), the University of Pennsylvania. Plant Gene Expression Center, University of California, Berkeley
- **The TIGR *Arabidopsis thaliana* Database (Chromosome 2 and BAC ends).** The Institute for Genomic Research (TIGR)
- **KAOS: The Kazusa *Arabidopsis* data Opening Site (Chromosome 3 and 5).** Kazusa DNA Research Institute
- **Centre National de Sequencage (French genome center; BAC ends)**
- **ESSA *Arabidopsis thaliana* genome project (Chromosomes 4 and 5).** John Innes Centre (JIC). Munich Information Centre for Protein Sequences (MIPS)
- **CSHL - Wash.U - ABI (Chromosomes 4 and 5).** Lita Annenberg Hazen Genome Center, Cold Spring Harbor Laboratory (CSHL). Washington University School of Medicine Genome Sequencing Center

Genome Research Project

- **Multinational Coordinated *Arabidopsis thaliana* Genome Research Project: Year Five**

Information Center

- **AtDB: *Arabidopsis thaliana* Database**
- **Arabinet Mass. Gen. Hospital**

Stock Center

- **AIMS: *Arabidopsis* Information Management System**
- **NASC: Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre**

cDNA/EST project

- **cDNA Sequence Analysis Project**
- **The TIGR *Arabidopsis thaliana* EST Assembly Database**

Protein Coding Region / Splice Site Finding

- **Multiple Gene Modeling Software is under construction** (Univ. of Tokyo and Kazusa)
- **Genefinder**
- **GeneMark**
- **GenLang**
- **Grail**
- **GENSCAN**
- **NetPlantGene server**
- **AraClean v1.1** (cleaning the GenBank *Arabidopsis thaliana* data set)

On-line Journal

- **Weeds World:** The International Electronic Arabidopsis Newsletter

Other Resources

- **LEHLE SEEDS Home Page**
- **ATCG**
- ***Arabidopsis thaliana* Codon usage table**

Figura 1.- Algunos de los recursos relacionados con *Arabidopsis* disponibles en Internet. Se reproduce la versión de 11 de diciembre de 1997 de la página de World Wide Web de KAOS (Kazusa *Arabidopsis* data Opening Site), una institución financiada por el gobierno japonés (http://www.kasuza.or.jp/arabi/atlinks.html).

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

puede acceder a través de Internet (Figura 1), entre los que se cuenta un boletín de noticias (*newsgroup*) en soporte electrónico, que permite el intercambio rápido de información entre los miembros de la comunidad de investigadores en *Arabidopsis*, el *Arabidopsis Newsgroup* (bionet.genome.arabidopsis en servidores de noticias de Internet), y desde 1994, la revista electrónica *Weeds World*, accesible a través de la World Wide Web (http://nasc.nott.ac.uk:8300/home.html).

I.5.- Biología experimental de *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana (L.) Heinh. es una planta vascular, una angiosperma que pertenece a la clase de las Dicotiledóneas, a la subclase de las Dilénidas, al orden de las Caparales y a la familia de las Brasicáceas o Crucíferas (Strasburger *et al*., 1994). Son también miembros de esta familia algunas plantas de importancia económica, entre ellas algunas verduras y plantas forrajeras, como el rábano (*Raphanus sativus*), el nabo (*Brassica napus*) y las diversas formas de la col (*Brassica oleracea*), plantas oleaginosas como la colza (*Brassica napus*, variedad *arvensis*), especias como las mostazas blanca (*Sinapis alba*) y negra (*Brassica nigra*) y ornamentales como el alhelí (*Matthiola incana*). Se ha descrito su presencia en casi todo el planeta, con la excepción de Sudamérica. La Figura 2 recoge su distribución geográfica, indicándose los puntos en los que se han aislado especímenes de esta planta, mientras que la representa su ciclo de vida.

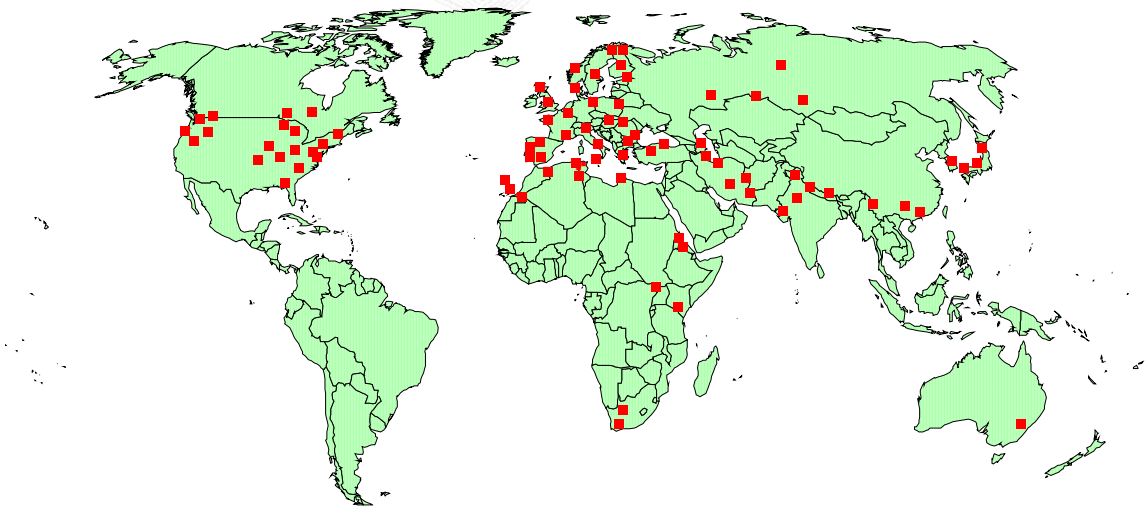
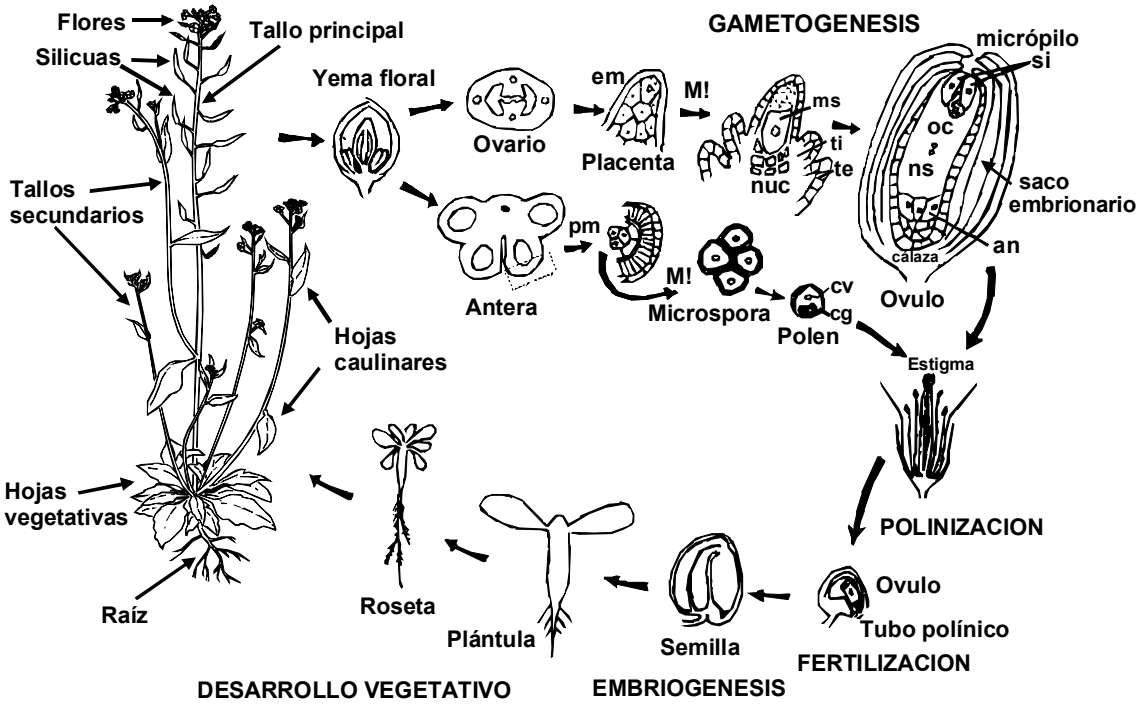


Figura 2.- Distribución geográfica de *Arabidopsis thaliana*. Los puntos destacados en rojo indican lugares donde se ha aislado plantas de esta especie. Reproducido, con pequeñas modificaciones, del mapa que puede hallarse en http://genome-www.stanford.edu/Arabidopsis/geo_dist_map.html, que incluye pequeñas modificaciones a otro previo, de Rédei, 1970.



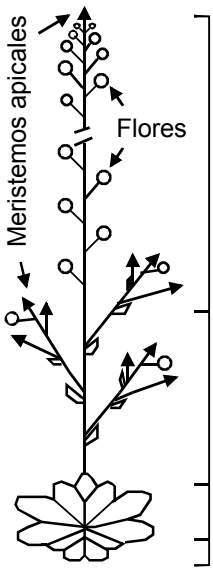
BIBLIOTECA VIRTUAL

Figura 3.- Ciclo de vida de *Arabidopsis thaliana*. El significado de las abreviaturas es el siguiente: em, célula madre del saco embrionario; pm, célula madre del polen; ms, saco embrionario; ti, tegumento interno del saco embrionario; te, tegumento externo del saco embrionario; nuc, nucela; si, células sinérgidas; oc, ovocélula; ns, núcleo secundario; an, células antípodas; cv, célula vegetativa del polen; cg, célula generativa del polen; M!, meiosis. Reproducido, con pequeñas modificaciones, a partir de Jürgens y Mayer, 1994, excepto la planta adulta representada a la izquierda, que se ha tomado de Estelle y Somerville, 1986.

El desarrollo vegetativo comienza con la germinación, en la que la cubierta de la semilla se rompe, produciéndose la emisión de la radícula, la elongación del hipocotilo y el desarrollo de las hojas, y finaliza con la aparición de las flores. La duración de esta fase depende considerablemente de las condiciones ambientales y de las características genéticas de cada estirpe, pudiendo limitarse a unas dos semanas o prolongarse durante varios meses. El meristemo radicular da origen a toda la raíz mientras que el tallo es generado por el meristemo caulinar, mediante la producción reiterada de unidades llamadas fitómeros (Evans y Grover, 1940; citado en Tsukaya, 1995). Cada uno de ellos consta de una hoja, un nudo o engrosamiento del tallo del que aquélla emerge, una yema lateral y un entrenudo.

Las estructuras aéreas de *Arabidopsis thaliana* son de varios tipos, cada uno de los cuales se origina en una etapa distinta del ciclo de vida. En las fases iniciales del crecimiento de la planta las hojas vegetativas forman una estructura en roseta, originada por la elongación casi nula de los entrenudos. Posteriormente (véase el apartado I.6.5,

en la página 45), los entrenudos se elongan, dando lugar a la inflorescencia. Pueden distinguirse la roseta temprana y la adulta, en función de la forma de las hojas que se generan (Martínez-Zapater *et al*., 1994; ver Figura 4). También para la inflorescencia se consideran dos fases, una de ellas temprana, en la que aparecen hojas caulinares o brácteas, con inflorescencias laterales en sus axilas. La inflorescencia tardía, por su parte, se caracteriza por la aparición de flores laterales, que no están acompañadas de hojas caulinares (Haughn *et al*., 1995; ver Figuras 3 y 4).



Fase	Tipo de fitómero	Entrenudo	Tipo de hoja	Filotaxia
Roseta juvenil	Hoja con yema lateral	Corto	Redonda, pequeña y entera	Decusada
Roseta adulta	Hoja con yema lateral	Corto	Grandes, espatuladas y aserradas	Espiral
Inflorescencia temprana	Hoja con yema lateral	Largo	Lanceoladas y sin peciolo	Espiral
Inflorescencia tardía	Flor	Largo	No se generan hojas	Espiral

Figura 4.- Algunos de los cambios en la morfología del sistema del tallo que se aprecian a lo largo del ciclo de vida de *Arabidopsis thaliana*. A la izquierda se indican las diferentes fases en las que suele dividirse el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. Tomado de Haughn *et al*., 1995.

I.5.1.- Anatomía y expresión del genoma

El número haploide de cromosomas de *Arabidopsis thaliana* es cinco (Laibach, 1907). Su genoma es uno de los más pequeños descritos en el reino vegetal, muy similar en tamaño a los de *Drosophila melanogaster* (140 Mb; Hodgkin *et al*., 1995) y *Caenorhabditis elegans* (100 Mb; Miklos y Rubin, 1996). Se acepta generalmente que el genoma haploide de *Arabidopsis thaliana* alcanza las 100 Mb (Meyerowitz, 1994b). Este es un valor de compromiso entre las diferentes estimaciones realizadas hasta ahora, que oscilan entre 50 y 145 Mb, obtenidas mediante métodos que incluyen la microespectrofotometría de núcleos teñidos (Bennett y Smith, 1976; 1991), la reasociación de ADN (Leutwiler *et al*., 1984), la hibridación cuantitativa a membranas (Francis *et al*., 1990), la estimación del volumen cromosómico mediante microscopía

electrónica (Heslop-Harrison y Schwarzacher, 1990), y la citometría de flujo (Arumuganathan y Earle, 1991; Galbraith *et al.*, 1991).

Las estimaciones del número total de transcritos (*transcripts*) distintos en una planta oscilan entre los 15.000 del perejil (*Petroselinum crispum*; Flavell, 1980) y los 60.000 del tabaco (*Nicotiana tabacum*; Kamalay y Goldberg, 1980), en ambos casos con un tamaño medio de 1,2 kb. En el supuesto razonable de que el número de moléculas diferentes de ARNm en *Arabidopsis thaliana* se halle dentro del rango definido por el perejil y el tabaco, entre el 25 y el 75% de su genoma nuclear se transcribiría, existiendo un gen cada 2-7 kb (Meyerowitz, 1994b). Mediante estudios de cinética de reasociación de ADN, se ha estimado en un 20% el ADN repetitivo presente en el genoma de *Arabidopsis thaliana* (Leutwiler *et al*., 1984; Pruitt y Meyerowitz, 1986), correspondiente fundamentalmente a repeticiones en tándem ubicadas en la heterocromatina centromérica, las regiones teloméricas y las de ADN ribosómico. En función de lo anterior, asumiendo que *Arabidopsis thaliana* cuenta con unas 80 Mb de ADN que pudiera contener genes representados por una o pocas copias, y que el número de éstos es de unos 15.000, como en el perejil, debe existir al menos un gen en cada 5 kb.

Los gametofitos de *Arabidopsis thaliana* son haploides (C) y los cigotos, diploides (2C), excepto cuando se induce y mantiene experimentalmente la poliploidía (Koornneef, 1994). Sin embargo, los niveles de ploidía en otras células de esta planta varían considerablemente según el tejido y el estado de desarrollo: las células de la epidermis de las hojas de la roseta basal alcanzan niveles de ploidía 16C, habiéndose encontrado células 8C en el tallo, y tricomas de hasta 64C (Melaragno *et al.*, 1993).

Se dispone de una considerable cantidad de información acerca de la secuencia del genoma de *Arabidopsis thaliana,* que tiene su origen en la clonación y caracterización de numerosos genes, así como en la existencia de un proyecto de secuenciación completa del genoma, desarrollado con financiación de la Unión Europea (http://www.uea.ac.uk/nrp/jic/mbanctop.html) y los gobiernos de Estados Unidos (http://pgec-genome.pw.usda.gov/spp.html; Kaiser, 1996; Kramer, 1996) y Japón (http://www.kasuza.or.jp/arabi). De hecho, *Arabidopsis thaliana* es el cuarto organismo en cuanto a número de secuencias depositadas en las bases de datos de ácidos nucleicos norteamericana (GenBank, mantenida por el *National Center for Biotechnology Information*, una institución dependiente de los *National Institutes of Health* de Estados Unidos) y europea (EMBL, *European Molecular Biology Laboratory*, dependiente de la EMBO, *European Molecular Biology Organization*). Con 56.022 secuencias depositadas a 17 de diciembre de 1997, *Arabidopsis thaliana* era superada únicamente por las

especies *Homo sapiens* (1.000.100 secuencias), *Mus musculus* (258.686) y *Caenorhabditis elegans* (75.972). También se han desarrollado iniciativas de secuenciación masiva de moléculas de ADNc (ADN complementario; *complementary DNA*), las denominadas EST (*Expressed Sequence Tags*), habiéndose obtenido 36.173, recogidas en la base de datos que puede consultarse en http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST_summary.html (Newman *et al.*, 1994; Swope *et al.*, 1995).

Se han descrito varias parejas de especies vegetales muy relacionadas filogenéticamente que difieren considerablemente en el tamaño de sus genomas (Bennet y Smith, 1991; Bennetzen y Freeling, 1993). Pueden citarse como ejemplos el maíz (*Zea mays*), que tiene 3,5 veces más ADN por núcleo que el sorgo (*Sorghum halepense*), y *Brassica oleracea,* cuyo genoma haploide es 10 veces mayor que el de *Arabidopsis thaliana*. Las diferencias entre el sorgo y el maíz corresponden casi exclusivamente a la presencia de ADN repetitivo, observándose un alto grado de conservación entre los segmentos de secuencia única, que parecen no haber experimentado grandes cambios en los últimos 20 millones de años, el periodo que separa a ambas especies de su ancestro común (Meyerowitz, 1994b). Resultados similares se han obtenido con el arroz (*Oryza sativa*) y el trigo (*Triticum aestivum*), cuyos genomas difieren unas 35 veces en tamaño, habiéndose producido su divergencia hace unos 65 millones de años (Meyerowitz, 1994b). Por último, es común observar hibridación cruzada entre los genes identificados en *Arabidopsis* y los de prácticamente cualquier otra planta, incluidas las monocotiledóneas como el maíz (Chang y Meyerowitz, 1986). Todo lo anterior sugiere que no ha habido grandes cambios en el complemento genético básico de las plantas con flores a lo largo de sus 120 millones de años de presencia en el planeta. Si las grandes diferencias en el tamaño de los genomas de distintas especies de plantas con flores corresponden fundamentalmente a variaciones en las secuencias intergénicas de ADN repetitivo, la utilidad de un sistema como *Arabidopsis* resulta evidente: cualquier gen puede ser aislado en primer lugar en esta especie, para después ser empleado como sonda en la búsqueda de sus homólogos en otras con genomas de mayor tamaño.

I.5.2.- Inducción y caracterización de mutantes

Fruto de la atención de numerosos investigadores a lo largo de medio siglo, el mapa genético de *Arabidopsis* incluye más de 500 genes, que han sido cartografiados con respecto a marcadores genéticos clásicos, correspondientes a fenotipos visibles, o a marcadores moleculares (Tabla 1). Se han obtenido varias estirpes portadoras de

múltiples marcadores, útiles como herramientas para el análisis genético (Koornneef *et al*., 1987), estando en continuo crecimiento el catálogo de marcadores de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*; polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción; Chang *et al*., 1988; Nam *et al*., 1989), RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*; ADN polimórfico amplificado aleatoriamente; Williams *et al*., 1990; Reiter *et al*., 1992), CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequences*; secuencias polimórficas amplificadas y partidas; Konieczny y Ausubel, 1993) y de SSLP (*Simple Sequence Lenght Polymorphisms*; polimorfismos en la longitud de secuencias simples; Bell y Ecker, 1994).

Para la inducción de mutaciones en *Arabidopsis thaliana* se han empleado los métodos de mutagénesis física, química e insercional, denominándose M_1 a los individuos expuestos a los efectos del mutágeno y M_2 a los de su primera generación filial. Aunque la semilla de *Arabidopsis thaliana* contiene unas 15.000-20.000 células (Jürgens, 1994), se ha estimado que sólo 2-3 de ellas contribuyen finalmente a la generación de gametos, un valor que recibe la denominación de número de células genéticamente efectivas (Müller, 1965; Li y Rédei, 1969; Grinikh *et al*., 1974; Grinikh y Shevchenko, 1976). Una lesión recesiva se presentará en homocigosis en el 25% de la descendencia M_2 producida por cualquier flor desarrollada a partir de una célula genéticamente efectiva que haya sufrido la mutación, ya que *Arabidopsis thaliana* es una planta autógama en la que la fecundación cruzada ocurre con una frecuencia muy baja en condiciones de laboratorio (Rédei y Koncz, 1992).

Entre los procedimientos de mutagénesis física empleados en *Arabidopsis* cabe mencionar la exposición a rayos X y el bombardeo con neutrones rápidos, que suelen producir roturas cromosómicas, deleciones o reorganizaciones, que corresponden con frecuencia a alelos nulos, mientras que los obtenidos tras mutagénesis química suelen ser hipomorfos. El mutágeno químico más efectivo y de uso más frecuente en *Arabidopsis* es el metanosulfonato de etilo (EMS), aunque también se ha empleado la metilnitrosourea (MNU). El EMS es un agente alquilante, que causa mutaciones puntuales y pequeñas deleciones con una elevada eficacia y que parece acceder sin trabas a la totalidad de las regiones del genoma de la planta, razones por las que constituye la mejor elección para una mutagénesis de saturación (Feldmann *et al*., 1994).

Tabla 1.- Genes cartografiados en *Arabidopsis thaliana*

Cromosoma 1				Cromosoma 2		Cromosoma 3		Cromosoma 4		Cromosoma 5			
cM	Locus	cM	Locus	cM	Locus	cM	Locus	cM	Locus	cM	Locus	cM	Locus
0	*SUS1*	87	*CAR1*	0	*EMB91*	0	*EMB145*	0	*FRI*	0	*CTR1*	65	*VAR1*
0	*AN*	88	*SAB*	4	*EMB34*	1	*ILR1*	5	*GA1*	1	*PTL*	68	*ALF3*
1	*RGN*	88	*FAS1*	8	*STI*	2	*QRT2*	9	*EMBRG*	1	*EIN2*	69	*EMF2*
1	*CER1*	88	*FT*	11	*EMB93*	3	*EMB52*	10	*HY4*	1	*EMB24*	69	*TT10*
3	*EMB233*	89	*WAM*	15	*EMB62*	4	*DOC1*	11	*CSI*	2	*TFL1*	70	*EIR1*
4	*FUS5*	89	*BUM*	17	*EMB239*	4	*PDS2*	15	*BP1*	5	*EMB166*	71	*GR2*
6	*EMB173*	89	*CLV2*	18	*EMB58*	5	*EMB1*	18	*EMB132*	6	*EMB256*	71	*EMB64*
9	*POM1*	90	*DOC3*	20	*EMB146*	6	*EMB286*	20	*DET1*	6	*TT7*	72	*LIT*
10	*ABA3*	92	*EMB41*	22	*EMB57*	7	*RPM1*	21	*EMB160*	6	*EMB175*	74	*BIO1*
11	*AXR3*	92	*SMA4*	28	*TAG1*	8	*FAD7*	22	*FUR1*	8	*HY5*	77	*TZ*
11	*RPS5*	93	*ETR*	29	*IAE1*	11	*DGD1*	22	*TT8*	8	*CHP7*	79	*EMB67*
11	*EMB176*	95	*NIM1*	32	*FVE*	12	*HY2*	27	*EMB171*	8	*FLC*	79	*TOC1*
12	*EMB142*	96	*CER6*	35	*PHYB*	12	*SPY*	27	*EMB148*	9	*EMB163*	80	*COB*
12	*FHA*	97	*EMBRG*	35	*SUR*	13	*COP10*	28	*CP1*	9	*EMB68*	82	*CER3*
12	*DET3*	99	*EMB179*	36	*CHL2*	14	*EMB51*	29	*COP9*	9	*HXC1*	82	*LFY*
12	*ALB1*	99	*AP1*	38	*CP2*	16	*FAD5*	31	*CN*	10	*LU*	82	*EMB209*
12	*AXR1*	100	*CRC*	46	*GUN1*	16	*FUS9*	32	*FCA*	10	*TRP5*	83	*ETO1*
13	*SEX1*	100	*EMB25*	47	*CLV3*	17	*EMB153*	33	*EMB236*	11	*AMT1*	85	*EMB87*
14	*KEU*	102	*EMBRG*	47	*ELF3*	17	*OMR1*	34	*TH3*	12	*EMF1*	85	*YI*
14	*CHL1*	103	*PIN*	48	*ER*	17	*VRN1*	34	*EMB137*	12	*FY*	85	*EMB15*
16	*PHYA*	105	*IAR1*	48	*HY1*	19	*MTO1*	37	*ARA1*	12	*LAD*	85	*REV*
19	*DIS1*	110	*EMB54*	49	*POM2*	20	*FAD2*	37	*RPP5*	13	*CBB3*	86	*PRC1*
19	*TWN2*	110	*CLV1*	50	*FUS12*	23	*EMB201*	38	*RPP4*	13	*TT4*	90	*MIN*
21	*EMB30*	113	*EMB17*	50	*RTN*	24	*EMB29*	39	*EMB81*	13	*CO*	90	*EMB16*
22	*MP*	113	*EMB120*	51	*EMB152*	24	*EMB95*	39	*EMB109*	15	*TFL2*	92	*EMB246*
22	*GA4*	114	*ADH*	53	*ABI5*	26	*DWF1*	40	*ALB4*	15	*ALF4*	98	*ABA1*
22	*GAI*	115	*BOT1*	53	*PY*	27	*PHO1*	41	*EMB230*	15	*ANL1*		
23	*DW1*	115	*EMB156*	54	*LAN*	27	*MS2*	42	*AG*	15	*ALB2*		
26	*PDS1*	116	*NIA1*	58	*EMB53*	28	*EMB90*	44	*CH42*	16	*EMB262*		
26	*EMB43*	116	*SUS2*	58	*FAD3*	30	*EMB224*	44	*EMB181*	20	*FUS11*		
27	*EMB232*	118	*GL2*	60	*RXC1*	32	*CHM*	45	*RPP2*	20	*TSL*		
27	*EMB10*	119	*GA2*	60	*COP1*	33	*AXR2*	46	*EMB130*	20	*EMB213*		
29	*EMB131*	122	*FE*	62	*PID*	35	*SUP*	47	*EMB257*	21	*PI*		
29	*EMB127*			63	*RE*	35	*EMB125*	48	*IM*	22	*CHL6*		
29	*LEC1*			64	*DET2*	38	*ABI3*	50	*EMBRG*	23	*ADD1*		
32	*PFL*			64	*GRL*	41	*FUS3*	50	*RML1*	23	*MS1*		
33	*CHS1*			64	*AS1*	46	*GL1*	52	*EMB140*	23	*FS1*		
33	*TH1*			65	*EMB18*	52	*RPP1*	52	*CER2*	23	*EMB86*		
33	*GI*			65	*EMB101*	53	*UVR1*	53	*GA5*	27	*EMB2*		
34	*EMB260*			66	*AUX1*	56	*RPP13*	54	*FAD6*	28	*TTG*		
35	*ACT1*			66	*ABI4*	59	*VAL1*	54	*FWA*	30	*EMB108*		
35	*TRP4*			67	*BIO2*	60	*EMB65*	55	*ABI1*	31	*EMB222*		
42	*EMB88*			67	*EMB225*	61	*NPH1*	55	*RPS2*	33	*GA3*		
45	*DIS2*			68	*EMB111*	62	*RPT*	55	*ACL1*	35	*SU*		
45	*TED2*			70	*EMB38*	63	*EMB167*	55	*EMB106*	36	*DOC2*		
46	*UFO*			71	*FIL*	64	*RPP11*	56	*EMB20*	38	*EMB269*		
46	*CAL*			74	*SUL*	68	*ACD1*	56	*DRG*	39	*EMB161*		
49	*EMB126*			75	*VAR2*	70	*CSR1*	57	*EMB56*	40	*EMB215*		
51	*RAC1*			76	*CER8*	73	*EMB69*	58	*TOR1*	40	*TNY*		
55	*TT1*			77	*CPC*	74	*EMB172*	58	*EMB35*	43	*CH5*		
56	*CHL3*			77	*EMB39*	75	*EMB149*	58	*EMB28*	43	*CUE1*		
58	*CH1*			87	*FPA*	77	*FK*	59	*EMB77*	44	*TT2*		
62	*AXR4*					81	*TT5*	60	*EMB42*	47	*TH2*		
62	*EMB22*					81	*AP3*	60	*RSS16*	48	*HCF109*		
66	*LE*					84	*CHS*	61	*CER4*	50	*BEL1*		
66	*EMB27*					84	*EMB117*	61	*EMB70*	51	*EMB139*		
69	*RPP7*					85	*EMB133*	62	*EMB107*	53	*GL3*		
69	*EMB118*					85	*EMB154*	63	*EMB104*	56	*FAS2*		
70	*ABA2*					87	*TIR1*	63	*ELG*	56	*EMB141*		
70	*AIN1*					87	*FUS6*	64	*EMB202*	57	*CAD1*		
70	*CER5*					88	*CER7*	64	*FD*	57	*TT3*		
71	*EMB244*					90	*TRP3*	66	*CUD*	58	*RPP8*		
75	*STM*					96	*TT6*	68	*AP2*	59	*EMB9*		
76	*EMB80*							68	*ACD2*	60	*EMB170*		
76	*EMB128*							68	*SPT*	62	*ALS1*		
83	*ACL2*							69	*FAD4*	62	*FUS4*		
84	*EMB71*							73	*CP3*	63	*PGM*		
85	*AS2*							76	*CER9*	64	*ATS*		
86	*SUS3*							76	*CBB2*	64	*FUS8*		

Se indica la denominación de cada gen y su posición en el mapa, expresada en centimorgans (cM). Los datos de esta Tabla se han obtenido del servidor de *World Wide Web* del laboratorio de Hans Meinke (http://mutant.lse.okstate.edu/genepage/query_symbol_list.asp), a 8 de junio de 1998.

Cabe destacar, por último, que se han desarrollado varios vectores portadores de marcadores selectivos, de resistencia a antibióticos o herbicidas, que permiten la selección de aquellas plantas transformantes en cuyo genoma se ha integrado el ADN transferente o ADN-T (*transfer DNA*; *T-DNA*), un segmento del plásmido Ti (*tumor inducer*; inductor de tumores) de *Agrobacterium tumefaciens*. Las primeras transformaciones por infección se llevaron a cabo mezclando cultivos líquidos de esta bacteria con explantes (*explants*) de raíces de *Arabidopsis thaliana*, a los que a continuación se inducía a regenerar plantas completas (Valvekens *et al*., 1988). Posteriormente se pasó a inducir la germinación de semillas embebidas en una suspensión de *Agrobacterium tumefaciens* (Feldmann y Marks, 1987). El método más extendido en la actualidad consiste en la inmersión de plantas adultas en un cultivo de la bacteria, dentro de un recipiente sometido a vacío parcial (Bechtold *et al*., 1993). Se han empleado como mutágenos insercionales alternativos los del sistema Ac/Ds del maíz, aunque no se ha conseguido una gran movilidad de estos transposones en *Arabidopsis thaliana* (Altmann *et al*., 1995). Se conocen elementos genéticos transponibles endógenos al genoma de *Arabidopsis thaliana,* como *Tat1* (Peleman *et al*., 1991) y *Tag1* (Tsay *et al*., 1993), cuya eventual utilidad como mutágenos no se ha establecido.

I.6.- Disección genética del desarrollo en *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana se ha convertido en una de las pocas especies vegetales en las que pueden conjugarse las técnicas clásicas de análisis genético con las de la Ingeniería genética, a un nivel alcanzado hasta ahora únicamente en *Caenorhabditis elegans* y en *Drosophila melanogaster*. La utilización de este sistema modelo se ha revelado fructífera en la disección genética y molecular de varios aspectos del desarrollo vegetal, como el embrionario (Jürgens *et al.*, 1994), el de la flor (Weigel y Meyerowitz, 1994), la raíz (Benfey *et al.*, 1993; Dolan *et al.*, 1993) y los tricomas (Hülskamp *et al.*, 1994). Se comentan a continuación las aproximaciones experimentales que se han seguido en el estudio de algunos de estos fenómenos.

I.6.1.- Desarrollo embrionario

La embriogénesis es la transición del huevo fertilizado a una nueva generación multicelular, el embrión. Los diferentes estadios que se distinguen en la embriogénesis de *Arabidopsis thaliana* se representan en la Figura 5. El plan básico de la organización corporal del individuo adulto se manifiesta en el embrión (Figura 6), en el que se distingue un patrón apical-basal, a lo largo del eje embrionario principal, al que se

superpone un patrón radial, que resulta claramente patente en la ordenación concéntrica de los tejidos primarios: la epidermis en la periferia y los tejidos central y conductor en el centro (Laux y Jürgens, 1997).

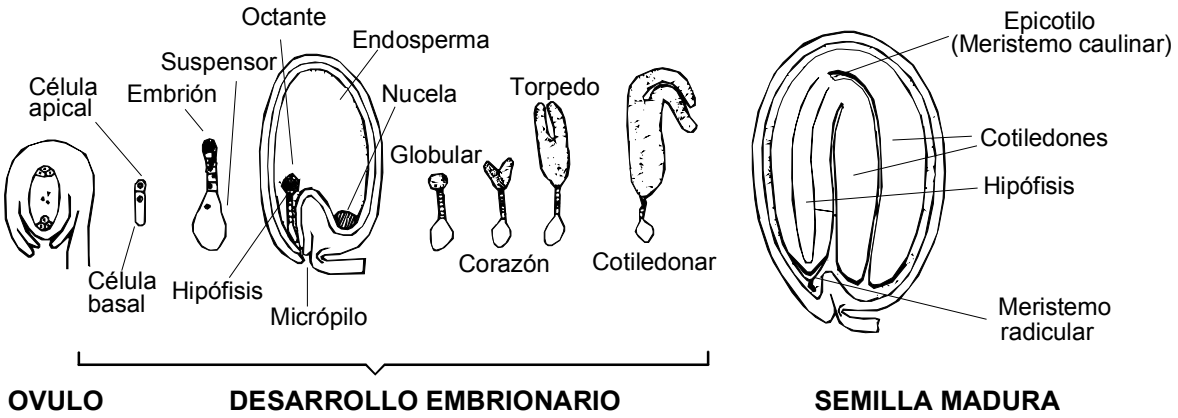


Figura 5.- Desarrollo embrionario en *Arabidopsis thaliana*. Se representan esquemáticamente, de izquierda a derecha, los diferentes estadios que atraviesa el embrión. La figura recoge estructuras completas únicamente en tres casos (el óvulo, el estado de octante y la semilla madura), limitándose los restantes esquemas a representar la forma del embrión, con omisión de sus envueltas. Tomado, con pequeñas modificaciones de Meinke, 1994.

La primera división del cigoto en *Arabidopsis thaliana* es asimétrica, dando lugar a dos células hijas de diferente tamaño y destino (Figuras 5 y 6). Mientras que la célula apical, más pequeña, da lugar a la mayor parte del embrión, la célula basal contribuye a la raíz de éste y al suspensor, tejido que canaliza el aporte de nutrientes. Aunque se desconoce cómo se determinan los destinos de las células basal y apical, se han obtenido alelos mutantes del gen *GNOM* (*GN*) que causan una elongación insuficiente del cigoto y la división casi simétrica de éste (Mayer *et al.,* 1993). En estos mutantes, sin embargo, la célula basal sigue generando un suspensor, aunque de tamaño inferior al normal, y la apical, un embrión en el que se aprecian divisiones irregulares. El gen *GN* se expresa también en etapas posteriores del desarrollo, mostrando su producto proteico semejanza con proteínas de *Saccharomyces cerevisiae* implicadas en el transporte de vesículas entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi (Shevell *et al.,* 1994). Se ha propuesto la participación de la proteína GN en la estabilización del eje apical-basal del embrión, mediante su intervención en un hipotético transporte direccional de vesículas.

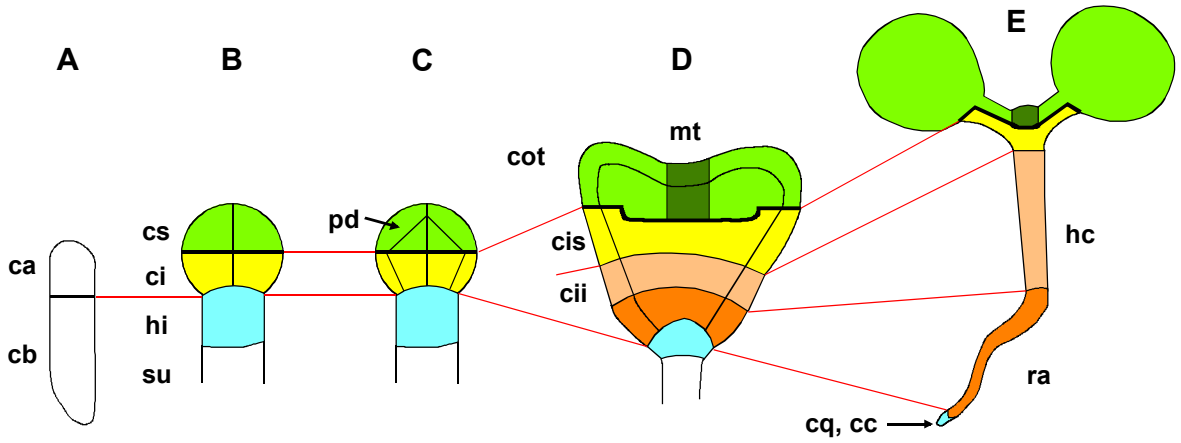


Figura 6.- Establecimiento del plan corporal de *Arabidopsis thaliana* durante el desarrollo embrionario. Se indica el estado de desarrollo al que corresponde cada esquema. Los estadios representados son las siguientes: (A) Estado de dos células (ca: célula apical; cb: célula basal). (B) Estado de octante (cs: capa superior; ci: capa inferior; hi: hipófisis; su: suspensor). (C) Estado de dermatógeno (pd: protodermo). (D) Estado de corazón (cot: cotiledón; mt: meristemo del tallo; cis: capa inferior superior; cii: capa inferior inferior). (E) Plántula (hc: hipocotilo; ra: raíz; cc: caliptra central; cq: centro quiescente). Las relaciones de linaje entre regiones del embrión en desarrollo y las de la plántula se acotan mediante líneas rojas. Se representan células individuales en los tres esquemas de la izquierda (A-C) y grupos de células en los dos restantes (D y E). El plano de división horizontal en el estado de octante y el límite correspondiente a este plano en estadios posteriores se destacan mediante líneas gruesas. Los dibujos no están a escala. Tomado, con pequeñas modificaciones, de Laux y Jürgens, 1997.

El eje apical-basal del embrión está integrado por cinco elementos, que se manifiestan progresivamente: el meristemo apical caulinar, los cotiledones, el hipocotilo, la raíz y el meristemo radicular (Figura 6E). En primer lugar, las divisiones transversales que ocurren en el embrión de cuatro células producen dos capas (*tiers*), la superior y la inferior, cada una de ellas con cuatro células (Figura 6B). Mientras que la capa superior da lugar al dominio apical, que comprende el meristemo apical y la mayor parte de los cotiledones, la inferior origina el dominio central, al que pertenecen la base de los cotiledones, el hipocotilo, la raíz y las células iniciales proximales del meristemo radicular. El resto del meristemo radicular, el centro quiescente y las células iniciales de la caliptra, derivan de la hipófisis, que tiene su origen en la célula basal de la primera división cigótica (Figura 6A; Scheres *et al.,* 1994). La existencia de los dominios mencionados se ha comprobado mediante el aislamiento y estudio de los mutantes *gurke* (*gk*), en los que parece estar afectado específicamente el dominio apical, observándose la ausencia de los cotiledones y el meristemo apical (Torres-Ruiz *et al.,*

1996). Por otra parte, la función del gen *MONOPTEROS* (*MP*) parece requerirse en un dominio complementario al de *GURKE*, ya que los alelos mutantes *mp* causan la desaparición de la raíz y el hipocotilo, así como defectos en la vascularización de los cotiledones (Berleth y Jürgens, 1993).

Los meristemos primarios del tallo y la raíz se establecen en polos opuestos del eje apical-basal del embrión. El meristemo caulinar comienza a distinguirse histológicamente respecto de los tejidos circundantes que originarán los primordios de los cotiledones en el estado de torpedo (Figura 5; Barton y Poethig, 1993). Su desarrollo se ve perturbado por mutaciones como *wuschel* (*wus*; Laux *et al.,* 1996), *zwille* (*zll*; Jürgens *et al.,* 1994; Endrizzi *et al.,* 1996) y *pinhead* (*pnh*; McConnel y Barton, 1995). En estos mutantes los cotiledones son normales, lo que indica la existencia de controles genéticos independientes para el desarrollo de estos órganos y el meristemo caulinar.

Los primeros indicios de la formación del cotiledón, algunas divisiones localizadas en los flancos del dominio apical, se aprecian en el estadio globular tardío (Jürgens y Mayer, 1994). De hecho, la partición del dominio apical en una zona central, que formará el meristemo apical, y una zona circundante, que dará lugar a los cotiledones, se puede visualizar en el estadio globular gracias a los patrones de expresión complementarios de los genes *SHOOT MERISTEMLESS* (*STM*) y *AINTEGUMENTA* (*ANT*). El gen *ANT* se expresa en las regiones en las que aparecerán los cotiledones (Elliot *et al.,* 1996), mientras que *STM* lo hace en la zona en la que aquéllos convergen, permaneciendo activo en el meristemo a lo largo de todo el ciclo de vida de la planta (Long *et al*., 1993).

Antes de que el embrión se deseque, iniciando la dormancia, el meristemo caulinar produce los dos primeros primordios foliares, que se disponen perpendicularmente a los cotiledones. Se supone que estos últimos constituyen un centro de referencia para establecer el patrón según el cual se dispondrán las hojas de la planta. Un indicio a favor de esta hipótesis lo constituyen las alteraciones en el número de los cotiledones y en la filotaxia (la disposición de las hojas sobre el tallo) que manifiestan los mutantes *altered meristem program* (*amp*; Chaudhury *et al.,* 1993), *häuptling* (*hpt*; Jürgens *et al.,* 1991) y *fass* (Torres-Ruiz y Jürgens, 1994), en los que los primordios de las primeras hojas aparecen entre dos cotiledones adyacentes, independientemente del número de éstos (véase el apartado I.6.3, en la página 23).

El meristemo de la raíz (véase el apartado I.6.2, en la página 19 y siguientes) consta de dos capas de células iniciales que aparecen rodeando al centro quiescente (Figura 6E; Dolan *et al*., 1993). Las situadas sobre el centro quiescente y bajo éste se

dividen contribuyendo a la formación de los tejidos de la raíz y la caliptra central, respectivamente. Así, el centro quiescente y las células iniciales de la caliptra central derivan de la hipófisis, en el dominio basal del embrión. En cambio, las células iniciales para el resto de los tejidos de la raíz proceden de la capa inferior del dominio central, que tiene su origen en la célula apical del cigoto.

Otro de los ejes que aparecen durante el desarrollo embrionario es el radial, que se manifiesta en la existencia de capas concéntricas de tejido. La primera etapa de la formación de este eje es la división tangencial que ocurre en el estadio de octante, que separa la capa externa o protodermo de las células internas. El protodermo dará lugar a la epidermis mediante divisiones anticlinales (con el plano de división perpendicular a la superficie), mientras que las células internas generarán el tejido fundamental y los elementos vasculares (Laux y Jürgens, 1997). Se conocen varias mutaciones que alteran el patrón radial del embrión y afectan al dominio central, que se comentan más adelante (véase a continuación el apartado I.6.2).

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

Tabla 2.- Algunas mutaciones que perturban el desarrollo embrionario en *Arabidopsis thaliana*

Gen	Fenotipo mutante	Referencia
GNOM/EMB30 (*GN*)	El cigoto no se elonga. Se observan divisiones irregulares en el embrión.	Mayer *et al.*, 1993.
GURKE (*GK*)	Carencia de estructuras apicales (cotiledones y meristemo apical).	Torres-Ruiz *et al.,* 1996.
MONOPTEROS (*MP*)	Carencia de estructuras basales (la raíz, el hipocotilo y la parte basal del cotiledón).	Berleth y Jürgens, 1993.
FACKEL (*FK*)	Carencia de hipocotilo.	Mayer *et al.,* 1991.
WUSCHEL (*WUS*) *ZWILLE* (*ZLL*) *SHOOT MERISTEMLESS* (*STM*) *PINHEAD* (*PNH*)	Alteración del desarrollo del meristemo caulinar.	Véase la Tabla 4, en la página 33.
ALTERED MERISTEM PROGRAM (*AMP*) *HÄUPTLING* (*HPT*) *FASS* (*FS*)	Incremento en el número de cotiledones y perturbación de la filotaxia.	Chaudhury *et al.,* 1993. Jürgens *et al.,* 1991. Torres-Ruiz y Jürgens, 1994.
DOPPELWURZEL	Transformación de la parte apical en parte basal.	Jürgens *et al*., 1991.
EMBRYONIC (EMB; unos 240 genes)	Letales embrionarios.	Meinke, 1994.
KEULE (KEU)	Epidermis alterada, con células hinchadas e irregulares.	Jürgens *et al*., 1991.
KNOLLE (KN)	Carecen de epidermis. No existe polaridad apical-basal.	Mayer *et al*., 1991.
KNOPF (KNF)	Plántula pequeña y redondeada.	Mayer *et al*., 1991.
LEAFY COTYLEDON (LEC)	Cotiledones con características de hojas.	Meinke, 1992.
MICKEY (MIC)	Cotiledones gruesos y en forma de disco.	Mayer *et al*., 1991.
TORO	Transformación de los cotiledones en estructuras apicales.	Jürgens *et al*., 1991.

Se conocen varias decenas de genes cuyas mutaciones alteran otros aspectos del desarrollo embrionario, algunos de los cuales se recogen en la Tabla 2. La descripción detallada de cada uno de ellos excede el propósito de esta Tesis, aunque pueden citarse al respecto las revisiones de Bowman, 1994; Jürgens, 1994; Meinke, 1994; Laux y Jürgens, 1997.

I.6.2.- Morfogénesis de la raíz

La raíz es un órgano adaptado a la obtención de agua y nutrientes del ambiente, que posee muchas características que hacen de él un sistema adecuado para el estudio experimental de la organogénesis vegetal. Cabe destacar que sus tejidos y tipos celulares surgen de un meristemo apical relativamente simple en estructura, y que su morfogénesis no se ve complicada por la formación de apéndices laterales en el ápice. La disposición regular de sus tejidos y células permite predecir adecuadamente la historia (el linaje) y el destino de cada una de sus partes, en base a su posición, y la convierten en un modelo simple para el análisis de la formación de patrones. En el caso de *Arabidopsis thaliana*, los estudios celulares pueden llevarse a cabo sin grandes complicaciones, dada la transparencia del órgano (Schiefelbein *et al*., 1997).

En la mayoría de las raíces, los linajes celulares son fácilmente identificables, ya que se estructuran en columnas de células alineadas con el eje principal del órgano, como resultado de las continuas divisiones transversales en la región meristemática (Schiefelbein *et al.,* 1997). Uno de los rasgos básicos de la raíz es su patrón radial, constituido por anillos o capas concéntricas de tejidos de tres tipos fundamentales: la epidermis, el córtex y el tejido vascular (Figura 7). La raíz de *Arabidopsis thaliana* manifiesta una organización radial de una sencillez y regularidad sorprendentes. En un corte transversal de la raíz madura se aprecian, de dentro afuera: el cilindro vascular (protoxilema), el periciclo, la endodermis, el córtex y la epidermis. A lo largo de su eje apical-basal se distinguen cuatro regiones. En el ápice se localiza la zona meristemática, integrada por células pequeñas y redondeadas, en donde tienen lugar los procesos de división celular. En el núcleo de esta región aparece el centro quiescente, compuesto por las células iniciales y las centrales, que se comporta como promeristemo (Dolan *et al.,* 1993; Scheres *et al.,* 1994). A la zona meristemática le sigue la de elongación o expansión celular, de aproximadamente 1 mm de longitud, en la que no se observa división celular, sino alargamiento de las células a lo largo del eje apical-basal. Aparece a continuación la zona de especialización o diferenciación, en la que determinadas células epidérmicas se diferencian formando pelos radiculares. Por último, se distingue

una zona de formación de raíces laterales, en la que se generan nuevos meristemos (Dolan *et al.*, 1993).

El meristemo radicular se forma durante la embriogénesis (véase el apartado I.6.1, en la página 14 y siguientes). Se han descrito mutaciones en varios genes, como *hobbit* y *bombadil*, ambas letales recesivas, cuya manifestación más temprana es la carencia de un meristemo funcional (Scheres *et al.,* 1996). Otras mutaciones, como *root meristemless* (Cheng *et al.,* 1995) y *stump* (Berleth *et al.,* 1996) no afectan al meristemo radicular del embrión, aunque inhiben la proliferación de los meristemos primario y lateral durante el desarrollo postembrionario.

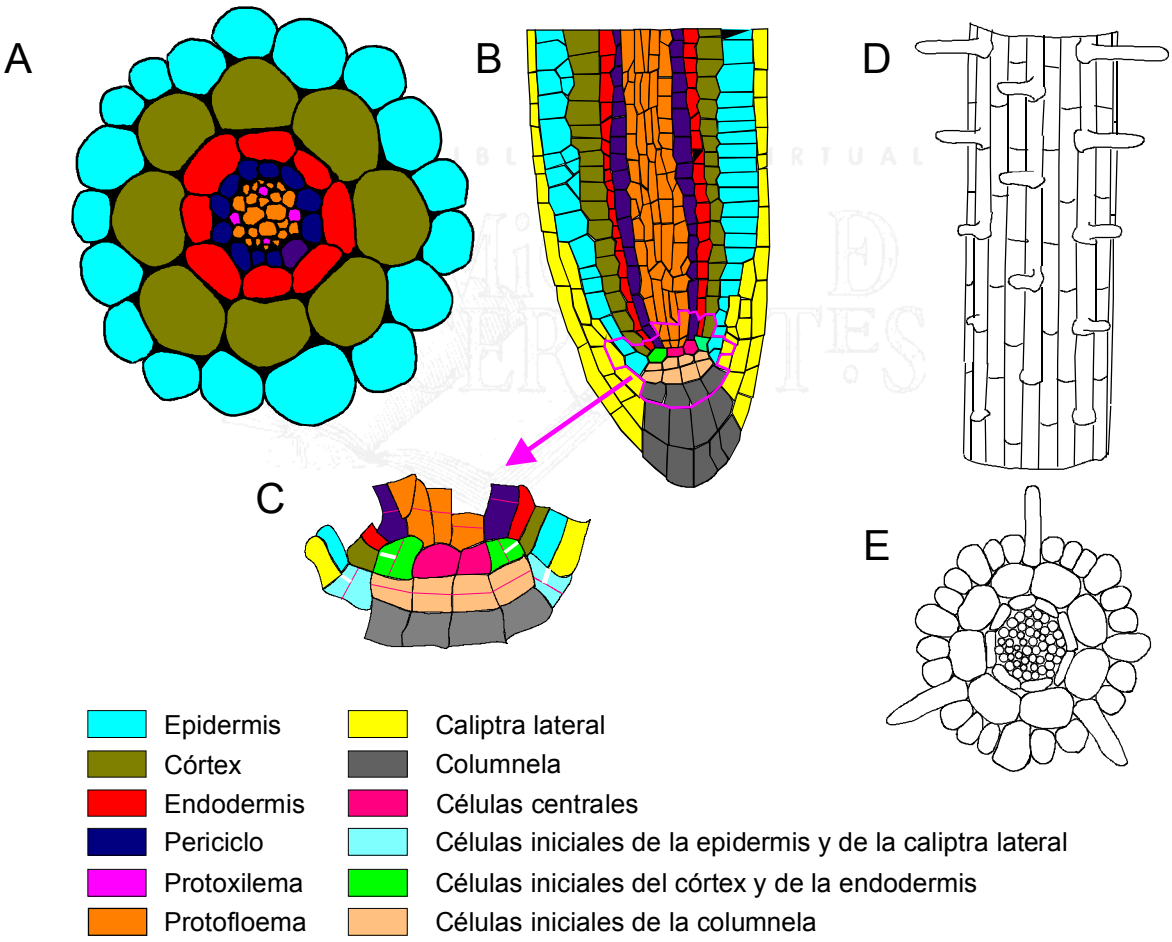


Figura 7.- Morfología de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. Se representa la sección transversal (A) y longitudinal (B) de la raíz, destacándose el meristemo radicular (C). La localización de los pelos radiculares se indica en una vista longitudinal (D) y un corte transversal (E) de la raíz. Tomado con pequeñas modificaciones de Dolan *et al*., 1993 (A y B), y de Schiefelbein *et al*., 1997 (C, D y E).

La propuesta del concepto clásico de histógeno se relaciona con el hecho de que cada tejido radicular surge a partir de un grupo específico de células iniciales. En efecto, cada grupo de células meristemáticas iniciales parece estar programado para formar un solo tipo de tejido (Hanstein, 1870; citado en Schiefelbein *et al.,* 1997). Una visión alternativa a ésta es que la información posicional determina tanto las características de las células iniciales como el destino de sus descendientes, un modelo congruente con los resultados del estudio de desarrollo del tallo (Poethig, 1987). Se han obtenido resultados que apoyan esta segunda alternativa, a partir de estudios de ablación celular con láser y de marcaje con sondas específicas de tejido (van den Berg *et al.,* 1995). Así, la eliminación de algunas células iniciales induce la división de algunas de las restantes, que reemplazan al linaje de las eliminadas. Por otra parte, las células iniciales en división requieren la vecindad de células maduras para definir su destino de desarrollo, lo que indica la existencia de algún tipo de transferencia de información desde los tejidos maduros hacia el meristemo, para mantener los patrones previamente establecidos (van den Berg *et al.,* 1995). La posición de una célula o tejido parece, en consecuencia, más importante que su historia en lo relativo a la determinación de su destino en el desarrollo.

Se han obtenido en *Arabidopsis thaliana* varios mutantes afectados en el patrón radial de la raíz (Benfey *et al.,* 1993; Torres-Ruiz y Jürgens, 1994; Scheres *et al.,* 1995). El mutante *shortroot* (*shr*) carece de tejido endodérmico, *pinocchio* (*pic*) carece de córtex, *scarecrow* (*scr*) posee una sola capa de tejido central con características endodérmicas y corticales, mientras que *wooden leg* (*wol*) muestra alteraciones en la organización del tejido vascular, y en *gollum* (*glm*) aparecen modificaciones en el periciclo y el tejido vascular. Los resultados del estudio de estos mutantes, individualmente y en combinaciones genéticas, indican que la función del gen *SHR* se requiere para especificar la identidad de la endodermis (Scheres *et al.,* 1995). Por el contrario, la expresión del gen *SCR*, cuyo producto proteico es un factor de transcripción (Di Laurenzio *et al.,* 1996), es necesaria para generar dos capas internas diferentes o determinar la asimetría de la división de la célula inicial endodérmica/cortical.

En *Arabidopsis thaliana*, como en la mayoría de las especies vegetales, existen dos tipos de células epidérmicas en la raíz, las que presentan un pelo epidérmico, derivadas de los tricoblastos, y las que no lo poseen, de los atricoblastos. Su diferenciación es dependiente de su posición, ya que los tricoblastos se forman en la hendidura entre dos células corticales subyacentes, mientras que los atricoblastos lo hacen sobre una célula cortical (Figura 7D,E; Dolan *et al.,* 1994). Se han identificado

mutaciones que alteran este patrón, como *transparent testa glabra* (*ttg*) y *glabra2* (*gl2*), que, al contrario que en la epidermis del tallo, en donde no se forman tricomas, presentan pelos en prácticamente todas las células epidérmicas. Esta observación puede interpretarse en el sentido de que los genes *TTG* y *GL2* promueven la diferenciación de células sin pelos, o en el de que reprimen la diferenciación de las células con pelo (Galway *et al.,* 1994; Masucci *et al*., 1996). El gen *GL2* codifica para un proteína con homeodominio (Rerie *et al*., 1994) mientras que *TTG* no ha sido clonado, aunque se ha establecido que sus alelos mutantes pueden ser complementados funcionalmente mediante la expresión del gen R del maíz, cuyo producto es un factor de transcripción (Ludwig *et al.,* 1989).

Tabla 3.- Algunas mutaciones que alteran el desarrollo de la raíz en *Arabidopsis thaliana*

Gen	Fenotipo mutante	Referencia
SHORT-ROOT (*SHR*)	Raíz de crecimiento determinado, a causa de la pérdida del meristemo, y sin capa endodérmica.	Benfey *et al.,* 1993.
SCARECROW (*SCR*) *PINOCCHIO* (*PIC*)	Raíz carente de la capa cortical.	Scheres *et al.,* 1995.
GOLLUM (*GLM*)	Capa de periciclo incompleta y ordenación anormal de los elementos del xilema y el floema	Scheres *et al.,* 1995.
WODEN LEG (*WOL*)	Sistema vascular con un número reducido de células y sin diferenciación de floema.	Scheres *et al.,* 1995.
HOBBIT (*HBT*) *BOMBADIL* (*BBL*)	Letales tempranos. Carecen de meristemo radicular.	Scheres *et al.,* 1996.
ROOT MERISTEMLESS1 (*RML1*) *ROOT MERISTEMLESSS2* (*RML2*)	Raíces muy cortas como consecuencia de la incapacidad de crecimiento del meristemo radicular.	Cheng *et al.,* 1995.
SABRE (*SAB*)	Engrosamiento de la raíz por expansión excesiva del córtex.	Benfey *et al.,* 1993.
POM-POM (*POM*)	Engrosamiento de la raíz por expansión excesiva de la epidermis y el córtex.	Benfey y Schiefelbein, 1994.
LION´S TAIL (*LIT*)	Engrosamiento de la raíz por expansión excesiva de la estela.	Benfey *et al.,* 1993.
COBRA (*COB*) *ROOT EPIDERMAL BLEBBING* (*REB*)	Engrosamiento de la raíz por expansión excesiva de la epidermis	Benfey *et al.,* 1993. Hauser *et al*., 1995.
TRANSPARENT TESTA GLABRA (*TTG*) *GLABRA2* (*GL2*)	Presencia de pelos en casi todas las células epidérmicas de la raíz.	Galway *et al*., 1994. Masucci *et al*., 1996.

El estudio de otros mutantes de *Arabidopsis thaliana* ha permitido relacionar la formación del pelo radicular con algunas fitohormonas, particularmente el etileno y las auxinas. Los alelos mutantes del gen *CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE1* (*CTR1*), cuyo producto es una quinasa de tipo Raf, que regula negativamente la transducción de

la señal del etileno (Kieber *et al.,* 1993), causan la formación de pelos radiculares en células en las que éstos normalmente no aparecen (Dolan *et al.,* 1994). Por su parte, el fenotipo de las mutaciones *dwarf, auxin resistant1* (*dwf1*) y *auxin resistant2* (*axr2*), que determinan la ausencia de pelos radiculares, indica claramente la implicación de las auxinas en la regulación de la formación de los pelos radiculares (Mirza *et al.,* 1984; Wilson *et al.,* 1990).

Se han aislado otros mutantes morfológicos con anormalidades en la raíz, causadas por la expansión excesiva de un tejido particular, o en la forma de los pelos radiculares (Schiefelbein y Somerville, 1990; Schiefelbein *et al*., 1993). Así, entre los primeros, *cobra* y *root epidermal blebbing* manifiestan un engrosamiento de la epidermis, y *sabre,* la expansión del córtex, mientras que en *pom-pom* son la epidermis y el córtex los tejidos engrosados, y la estela en *lion´s tail* (Baskin *et al.,* 1992; Benfey *et al.,* 1993; Benfey y Schiefelbein, 1994; Hauser *et al.,* 1995). El análisis comparativo de estos mutantes permite afirmar que la morfogénesis radicular no está, probablemente, gobernada por un mecanismo único, sino que obedece a controles independientes para definir la orientación y la expansión de los diferentes tejidos que componen la raíz (Schiefelbein *et al*., 1997).

I.6.3.- Desarrollo vegetativo

Un tema de gran importancia en la biología del desarrollo vegetal es el estudio de los meristemos (Figura 8), grupos indiferenciados de células que se establecen durante la embriogénesis, a partir de los cuales se originan los órganos postembrionarios (raíces, hojas, flores y meristemos axilares; Clark *et al*., 1995). Los meristemos apicales, tanto el caulinar como el radicular, son estructuras capaces de autoperpetuarse, ya que además de producir órganos se regeneran a sí mismos continuamente. Esto es así ya que las células meristemáticas conocidas como células apicales iniciales conservan la capacidad de dividirse a lo largo de todo el ciclo de vida del organismo. Cuando una de las células iniciales se divide, una de sus hijas hereda las características indiferencidas de la madre y la otra entra en un camino de desarrollo (Fosket, 1994).

Se distinguen en el meristemo apical del tallo o caulinar dos regiones: la túnica y el corpus (Figura 8C; Satina *et al*., 1940). En *Arabidopsis thaliana*, el meristemo consta de dos capas externas de túnica que recubren al corpus. Esta organización se debe a las diferencias en la orientación de sus divisiones celulares, que en la túnica son casi exclusivamente anticlinales, lo que mantiene la estructura en capas. Como consecuencia de este patrón de división, las células de la túnica mantienen un linaje

separado de las situadas bajo ellas. Por el contrario, las células del corpus se dividen anticlinal, periclinal (con el plano de división paralelo a la superficie) u oblicuamente, produciendo así un ordenamiento celular complejo (Barton y Poethig, 1993). Se ha demostrado, mediante análisis clonal, que la organización en capas del meristemo tiende a mantenerse en el tallo y en los órganos laterales, aunque se produce ocasionalmente la invasión de células de una capa en la adyacente. La capa más externa, la denominada L1, da lugar a la epidermis, mientras que las más internas, la L2 y la L3, generan los tejidos centrales de la hoja y el tallo (Steward y Dermen, 1975). Aunque la estructura estratificada del meristemo caulinar debiera permitir predecir el destino de sus células, los estudios de análisis clonal realizados con el fin de obtener mapas de destino del meristemo apical del tallo de *Arabidopsis thaliana* han demostrado que existen muy pocas restricciones en cuanto al destino de las células dentro de las capas del meristemo en la semilla. Los datos disponibles sugieren que el destino final de las células está determinado mucho más por su posición en el meristemo que por su linaje (Furner y Pumfrey, 1992; Irish y Sussex, 1992).

En el meristemo caulinar mitóticamente activo se observan tres zonas citológicamente distinguibles, superpuestas a la estructura en capas de la túnica y el corpus (Figura 8C): (a) una zona central (ZC), con grandes células que se dividen lentamente, (b) la zona periférica o morfogenética (ZP), que rodea a la anterior, en la que las células son más pequeñas y se dividen rápidamente, y en la que se producen las primeras divisiones celulares que darán lugar a los órganos laterales, y (c) la zona medular o meristemo medular (ZM), debajo de la anterior, cuyas células se dividen rápidamente, formando los tejidos del tallo (Leyser y Furner, 1992). El ápice del tallo se compone de las tres zonas del meristemo apical y de una zona subapical de maduración, en donde se engrosa, expandiéndose rápidamente los primordios (Kerstetter y Hake, 1997).

El meristemo del tallo es una estructura muy dinámica, que experimenta constantemente crecimiento, división celular y formación de órganos. Así, aunque su estructura se mantiene prácticamente constante a través del desarrollo vegetativo de la planta, la posición de las células derivadas del meristemo cambia a lo largo del tiempo. Las células de la zona central dan lugar a otras de la zona central y la periférica, mientras que estas últimas, a su vez, se incorporan a los órganos laterales en formación (Figura 8D-F; Clark, 1997).

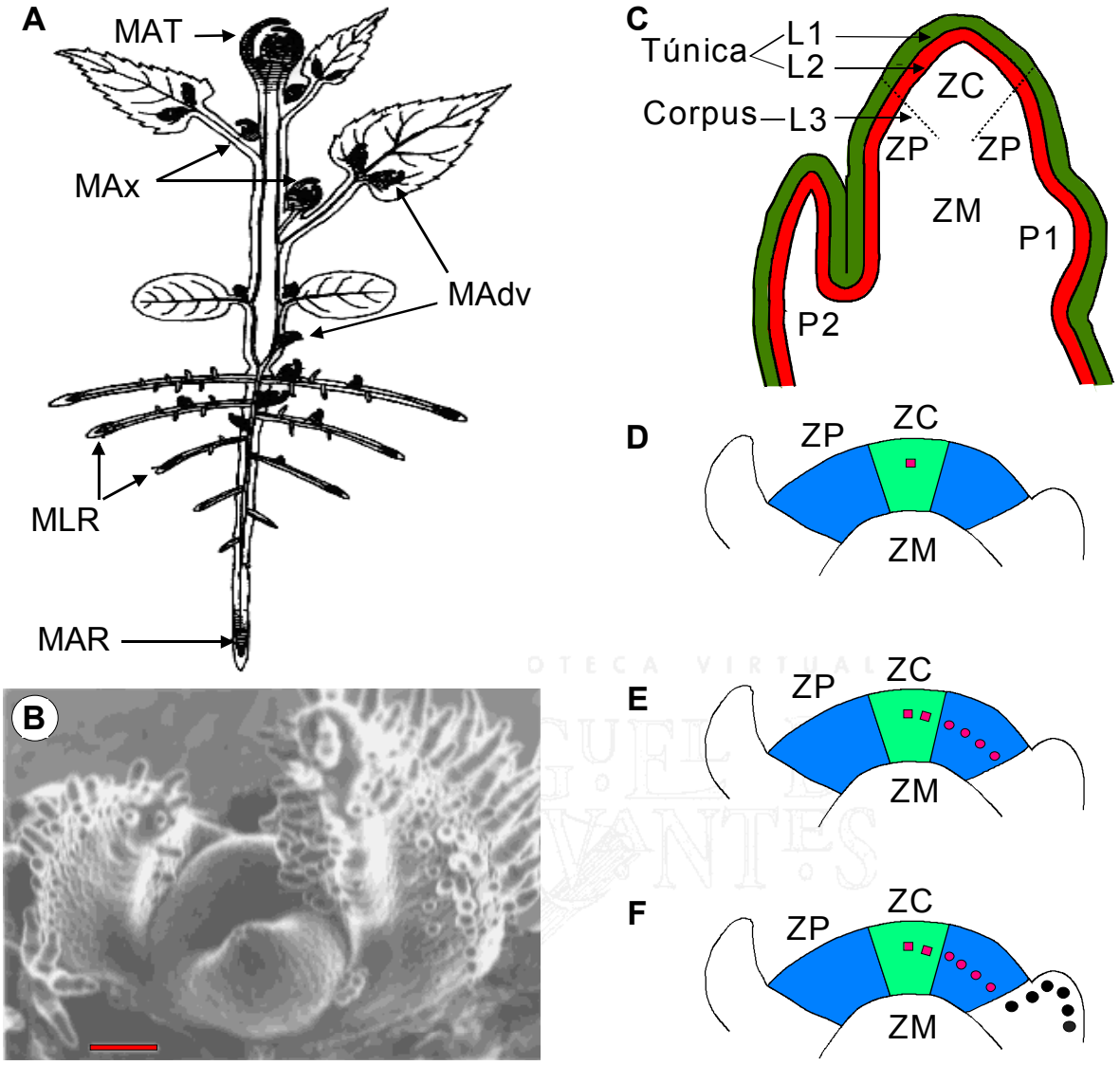


Figura 8.- Algunas propiedades del meristemo apical del tallo. (A) Representación de una planta típica, con indicación de la situación de los meristemos apicales. MAR: Meristemo apical radicular; MLR: Meristemo lateral radicular; MAT: Meristemo apical del tallo; MAx: Meristemo axilar; MAdv: Meristemo adventicio. (B) Micrografía de barrido del ápice del tallo de una planta de tabaco, en la que se aprecian los primordios foliares (a los lados) que emergen del meristemo. La barra de escala indica 100 µm. (C) Representación esquemática de la estructura del meristemo del ápice caulinar de *Arabidopsis thaliana*. Se destacan la túnica y el corpus, así como las distintas zonas organogénicas (ZC: Zona central; ZP: Zona periférica; ZM: Zona medular). P1 y P2 indican el primordio foliar más joven y el inmediatamente anterior en el tiempo, respectivamente. (D-F) Dinámica del desarrollo del meristemo apical del tallo. El cuadrado rojo (D) representa una célula indiferenciada de la zona central (ZC), cuya progenie, indicada mediante círculos rojos (E), se sitúa en la zona periférica (ZP). Las células inicialmente ubicadas en la zona periférica se dividen (círculos negros) contribuyendo al crecimiento del primordio del órgano (F). Tomado, con algunas modificaciones, de Kerstetter y Hake, 1997 (A y C), Poethig, 1997 (B), y Clark, 1997 (D-F).

El meristemo apical del tallo se forma tanto durante la embriogénesis (el denominado meristemo primario) como en las axilas de las hojas, a partir de aquél (meristemo lateral), aunque también puede hacerlo de forma adventicia en condiciones anormales, como en la formación de callos (McConnell y Barton, 1995). El meristemo caulinar primario en *Arabidopsis thaliana* se manifiesta por primera vez en el estadio de torpedo, y se estructura en tres capas celulares que se denominan epidérmica, hipodérmica superior e hipodérmica inferior. En esta etapa, el meristemo es fácilmente discernible del resto del embrión, ya que sus células carecen de gránulos de reserva. La estructura estratificada del meristemo se mantiene a lo largo de toda la vida de la planta, ya que en las capas epidérmica e hipodérmica superior sólo ocurren divisiones anticlinales, siendo éstas por tanto las precursoras de la túnica, mientras que las de la hipodérmica inferior, por divisiones anticlinales, periclinales y oblicuas, conformarán el corpus. El meristemo así formado tiene en *Arabidopsis thaliana* un tamaño de 35 x 55 μm, mostrando un aspecto rectangular y plano (estadio juvenil). Tras la germinación, aparecen las hojas y las estípulas, engrosamientos en los flancos de la base del peciolo. A continuación, el meristemo cambia de forma y tamaño, incluyendo en esta estapa entre 80 y 450 células, con un grosor de 70 μm. Se manifiesta de este modo el meristemo adulto, de forma convexa y radialmente simétrico, aspecto que conservarán sus estadios posteriores, los de meristemo inflorescente y floral (Figura 9; Medford *et al*., 1992).

El desarrollo vegetativo de las plantas puede subdividirse, en términos generales, en dos fases, la juvenil y la adulta, cada una de las cuales posee características morfológicas y fisiológicas propias (Conway y Poethig, 1993). La transición entre ambas fases se conoce como cambio de fase (*phase change*) y es a menudo gradual. En *Arabidopsis thaliana*, durante la fase juvenil aparecen hojas pequeñas, redondeadas, enteras y de filotaxia decusada (con ángulos de 180° entre los puntos de inserción de las dos hojas de un mismo nudo, y de 90° entre las de un nudo y el siguiente). Estas hojas juveniles presentan pocos tricomas en su cara adaxial (la del haz) y ninguno en la abaxial (la del envés). En la fase adulta la filotaxia es espiral, las hojas son más espatuladas y aserradas, la posición de la parte más ancha del limbo se desplaza distalmente, y la demarcación entre peciolo y limbo se suaviza, a la vez que comienzan a aparecer tricomas en el envés y se incrementa su densidad en el haz (Figura 4; Medford *et al.,* 1992).

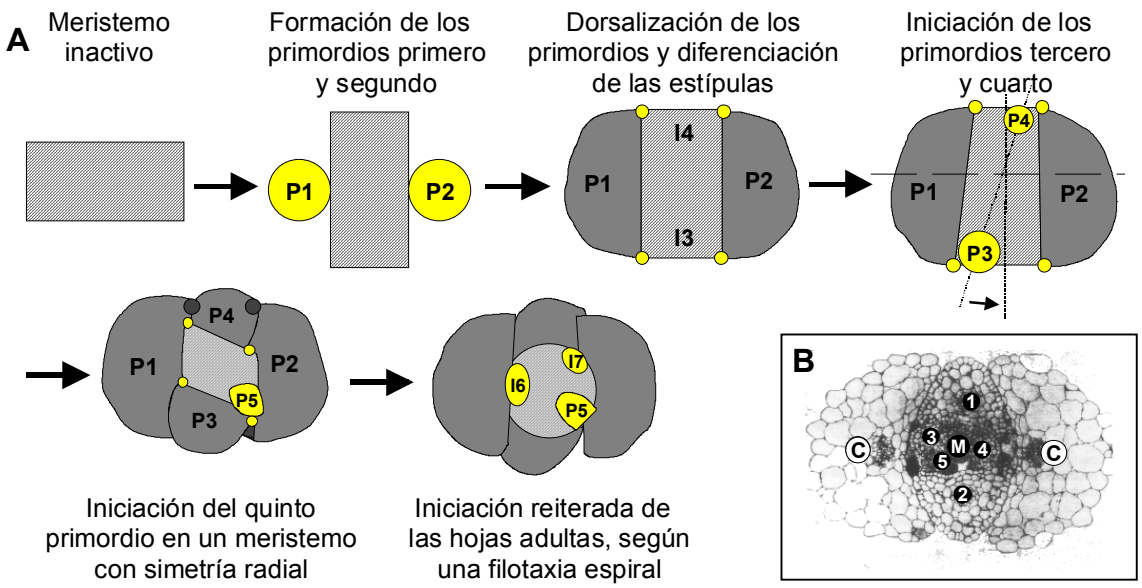


Figura 9.- Representación esquemática de los cambios que experimenta el meristemo apical vegetativo de *Arabidopsis thaliana*. (A) En el meristemo juvenil, rectangular y con simetría bilateral, aparece el primer par de primordios foliares (P1 y P2), que se inician en lados opuestos del meristemo y manifiestan simetría radial. Dos días después de su aparición, estos primordios desarrollan una simetría dorsoventral, formándose un par de estípulas en su base. El meristemo se alarga por uno de sus extremos y adquiere una forma trapezoidal, conservando la simetría bilateral, a la vez que aparecen en su periferia las células iniciales del segundo par de primordios foliares (I3 e I4). El tercer primordio (P3) se genera en el extremo ancho del trapezoide y el cuarto (P4) en la posición contraria. Siete días después de su aparición, el meristemo vegetativo experimenta un cambio drástico y adquiere forma de cúpula, con simetría radial. El quinto primordio foliar (P5) se origina entre el segundo y el tercero, y los siguientes se inician sucesivamente, según una filotaxia espiral. Redibujado, con pequeñas modificaciones de Medford *et al.*, 1992. (B) Sección transversal del ápice caulinar de *Arabidopsis thaliana*, siete días después de la germinación. Los primordios de las hojas se numeran desde el más viejo (1) al más joven (5). C: Cotiledón; M: Meristemo. Tomado, con pequeñas modificaciones, de Medford *et al.*, 1992.

Utilizando la aparición de tricomas abaxiales como marcador de cambio de fase en *Arabidopsis*, se ha establecido que este fenómeno se hace patente en diferentes hojas según la estirpe silvestre (ecotipo; *ecotype*) estudiada. Así, en cultivos mantenidos bajo iluminación continua, la primera hoja con tricomas abaxiales es la tercera en el ecotipo Wassilewskija (Ws-2), la tercera o la cuarta en Landsberg *erecta* (L*er*) y la quinta o la sexta en Columbia (Col). Sin embargo, no se ha observado diferencia alguna entre estos ecotipos en cuanto al ritmo de iniciación de sus hojas (Telfer *et al.*, 1997). Otra evidencia de la existencia de controles temporales que operan sobre el desarrollo de los

tricomas se obtiene del estudio de mutantes en los que se retrasa la aparición de las hojas, como *paused* (*psd*), o en los que se adelanta, como *altered meristem programming* (*amp1*; Chaudhury *et al*., 1993). En tales mutantes, la primera hoja con tricomas abaxiales aparece al mismo tiempo que en los ecotipos de los que derivan, independientemente del número total de hojas alcanzado en ese momento (Telfer *et al*., 1997).

Es poco lo que se sabe acerca de la identidad de los genes que controlan la transición entre las fases juvenil y adulta del desarrollo vegetativo (revisado en Lawson y Poethig, 1995). En el maíz, las mutaciones semidominantes *Teopod1* (*Tp1*), *Teopod2* (*Tp2*), *Teopod3* (*Tp3*) y *Corngrass* (*Cg*) prolongan el período de expresión de las características propias de la etapa juvenil del desarrollo, que no desaparecen en los fitómeros adultos (Poethig, 1988). Por el contrario, las mutaciones recesivas en el gen *GLOSSY15* causan la aparición prematura de determinados rasgos de la fase adulta, principalmente a nivel epidérmico (Evans *et al.,* 1994). En *Arabidopsis*, tanto los cultivos de estirpes silvestres bajo fotoperiodo corto como las mutaciones que provocan floración tardía determinan un incremento en el número de hojas de la roseta, prolongando también la fase juvenil, a juzgar por la forma de la hoja, la densidad de los tricomas adaxiales (Martínez-Zapater *et al*., 1995) y la aparición más tardía de los tricomas abaxiales (Telfer *et al*., 1997).

Se han publicado resultados que indican la actuación de las giberelinas como señales de cambio de fase, aunque de modos distintos en diferentes especies. En *Arabidopsis thaliana* y en el maíz, la aplicación de giberelinas promueve el cambio de fase y la floración. Así, se ha observado que la administración de giberelinas promueve la aparición temprana de tricomas abaxiales, aunque nunca en las dos primeras hojas. Por otro lado, el mutante *spindly* (*spy*; Jacobsen y Olszewski, 1993) de *Arabidopsis thaliana*, que muestra una respuesta constitutiva a las giberelinas, presenta floración temprana y mayor densidad de tricomas abaxiales en las hojas tempranas, aunque no en las dos primeras, como en los casos antes comentados (Telfer *et al*., 1997). Además, los mutantes deficientes en giberelinas de *Arabidopsis thaliana* y el maíz producen más hojas y florecen más tarde que sus tipos silvestres. En los mutantes de *Arabidopsis thaliana* con fenotipos más extremos no se observan tricomas abaxiales en ninguna hoja, fenotipo que se normaliza tras tratamiento con giberelina exógena (Telfer *et al*., 1997). Sin embargo, en *Hedera helix*, la aplicación de giberelinas inhibe la floración y promueve la aparición de rasgos juveniles. Puede concluirse, en síntesis, que la

manifestación de las características juveniles y adultas está sujeta a influencias tanto genéticas como hormonales (Lawson y Poethig, 1995).

Al finalizar el desarrollo vegetativo, el meristemo inflorescente sustituye al vegetativo y los entrenudos se alargan, apareciendo el tallo inflorescente, en el que se forman las hojas caulinares, que carecen de peciolo, siendo las tardías menores, más estrechas y con menos tricomas adaxiales que las tempranas (Telfer y Poethig, 1996).

Se conocen diferentes tipos de mutaciones que perturban el desarrollo del meristemo apical del tallo en *Arabidopsis thaliana*. Las mutaciones en el gen *SHOOT MERISTEMLESS* (*STM*; Barton y Poethig, 1993) impiden la formación del meristemo caulinar, tanto del primario durante la embriogénesis como de los adventicios en experimentos de regeneración de callos. El efecto fenotípico de estas mutaciones parece restringirse al meristemo caulinar, ya que los individuos mutantes muestran un crecimiento normal de la raíz (Barton y Poethig, 1993; Clark *et al*., 1996). A partir del estudio de mutantes portadores de un alelo débil, *stm-2*, que son capaces de formar tallos postembrionariamente, aunque finalizan su crecimiento prematuramente, se ha propuesto que la función del gen *STM* se requiere además para el mantenimiento del propio meristemo caulinar (Clark *et al*., 1996). El gen *SHOOT MERISTEMLESS* ha sido clonado, comprobándose que su producto proteico contiene un homeodominio (Long *et al*., 1996). *STM* muestra un elevado grado de semejanza con el gen *KNOTTED1* (*KN1*) del maíz (Vollbrecht *et al*., 1991) y sus homólogos *KNAT1* y *KNAT2* de *Arabidopsis thaliana* (Lincon *et al*., 1994). La expresión de *STM* comienza a detectarse en el estadio globular medio, en las células que darán lugar al meristemo caulinar (Barton y Poethig, 1993) y persiste tras la germinación en las cuatro variantes meristemáticas que se suceden en el tallo (meristemo vegetativo, axilar, inflorescente y floral). Estas observaciones apoyan la hipótesis de que la actividad de *STM* es necesaria tanto para la formación como para el mantenimiento del meristemo. Curiosamente, este gen no se expresa apreciablemente en las regiones del meristemo en las que comienzan a manifestarse los primordios foliares, por lo que se ha apuntado la posibilidad de que su inactivación constituya un paso previo a la especificación de las hojas (Long *et al*., 1996).

Otro gen necesario para el desarrollo normal del meristemo apical del tallo, a nivel de desarrollo embrionario y vegetativo, es *WUSCHEL* (*WUS*; Laux *et al.,* 1996), del que se ha propuesto que juega un importante papel en el mantenimiento estructural y funcional del meristemo, y que se requiere para dotar de identidad a la región central de este último. Las mutaciones recesivas en el locus *PINHEAD* (*PNH*) impiden la formación

de un meristemo caulinar funcional, tanto durante la embriogénesis como en los meristemos laterales que surgen en las axilas de las hojas. Sin embargo, no interfieren con la formación de meristemos adventicios (McConnel y Barton,1995). El estudio de las interacciones entre los genes *STM* y *PNH* ha permitido establecer, en dobles mutantes *stm pnh*, que el primero es epistático sobre el segundo, así como proponer un modelo para la generación del meristemo apical, en dos etapas. La primera de ellas sería la formación del primordio del meristemo, mostrando la organización túnica-corpus aunque aún sin primordios foliares, que requeriría únicamente la actividad del gen *STM*. En la etapa siguiente el meristemo adquiriría la capacidad de iniciar las hojas, para lo que sería necesaria la expresión de *STM* y *PNH*, el segundo de los cuales mantendría activo al primero (McConnel y Barton,1995).

Otro grupo de mutaciones que afectan el desarrollo del meristemo apical del tallo en *Arabidopsis thaliana* son las que producen fasciación (*fasciation*) del tallo. Este término es usado para describir un conjunto de alteraciones en el desarrollo del tallo que incluyen su ensanchamiento, aplastamiento e incluso bifurcación, así como distorsiones en la filotaxia (Worsdell, 1905; citado en Leyser y Furner, 1992). Entre estas mutaciones podemos citar *fasciated1* (*fas1*; Reinholz, 1966), *fasciated2* (*fas2*; Leyser y Furner, 1992), varios alelos del locus *CLAVATA1* (*CLV1*; McKelvie, 1962; Koornneef *et al*., 1983; Leyser y Furner, 1992; Clark *et al*., 1993), *clavata2* (*clv2*) y *clavata3* (*clv3*; Koornneef *et al*., 1983; Clark *et al*., 1995), y *fully fasciated* (*fuf*; Medford *et al*., 1992). Además de la fasciación del tallo característica de estos mutantes, producto en todos ellos de un agrandamiento del meristemo apical, se observa un aumento en el número de hojas en la roseta basal y alteraciones en la filotaxia (Reinholz, 1966; Krickhahn y Napp-Zinn, 1975; Leyser y Furner, 1992; Medford *et al*., 1992; Clark *et al*., 1993). Las mutaciones *fasciated* provocan además una disminución en el tamaño de la raíz y alteraciones en la morfología de las hojas, que suelen ser más estrechas y dentadas. En cuanto al meristemo, es más plano que el del tipo silvestre y manifiesta alteraciones tanto en la zona central como la periférica (Leyser y Furner, 1992). Por el contrario, las mutaciones *clavata* y *fully fasciated* no perturban la forma de la hoja o la raíz, modificando únicamente la zona central del meristemo, lo que indica que la expresión de los correspondientes genes está restringida al desarrollo del meristemo caulinar (Medford *et al*., 1992; Clark *et al*., 1993; Clark *et al*., 1995).

El estudio de los fenotipos de los individuos dobles mutantes *clv1*/*clv1*;*clv3*/*clv3* y los dobles heterocigotos *clv1*/*CLV1*;*clv3/CLV3* ha puesto de manifiesto la existencia de interacciones entre los genes *CLV1* y *CLV3*. Se ha propuesto que actúan conjuntamente

restringiendo las células en estado indiferenciado a la zona central del meristemo y/o promoviendo la entrada de las células periféricas en vías específicas de desarrollo. Sus mutaciones provocarían la extensión de la zona ocupada por el tejido indiferenciado, ensanchando así el meristemo (Clark *et al*., 1995). El análisis de la secuencia de *CLV1* (Clark *et al*., 1997) indica que su producto proteico podría actuar como receptor para la transmisión de información posicional a células específicas del meristemo del tallo. Así, CLV1 podría percibir información posicional de la zona periférica para dirigir la diferenciación o limitar la proliferación de las células centrales del meristemo (Clark, 1997).

El papel de *STM* parece ser antagónico de los de *CLV1* y *CLV3* en el desarrollo de los meristemos caulinar y floral, ya que el primero promueve su formación y mantenimiento mientras que los segundos reprimen su proliferación. El estudio de las interacciones entre los alelos *stm* y *clv1* o *clv3* ha demostrado que el fenotipo mutante causado por una de estas mutaciones es corregido por la presencia de la otra (Clark *et al*., 1996) de forma dominante, a pesar del carácter recesivo de todas ellas. En efecto, los individuos *stm*/*stm*;*clv*/*CLV* muestran un meristemo caulinar formado postembrionariamente, que aparece entre los haces vasculares de los cotiledones, lo que sugiere que ambos genes pueden regular el mismo proceso. Además, el hecho de que los dobles mutantes *stm clv* presenten aditivamente los fenotipos propios de cada una de estas mutaciones (carencia de meristemo caulinar embrionario y fasciación del tallo), indica que ninguno de los dos genes requiere al otro para ser activo. Se ha propuesto que los genes *CLV* actúan en la zona periférica, limitando a la zona central la función de las actividades promotoras de meristemo, y que *STM* actúa en la zona central, como factor regulador positivo de dichas actividades. Otra posibilidad es que todos actúen en la zona central, compitiendo entre sí, dada la naturaleza presuntamente antagónica de sus funciones (Clark *et al*., 1996).

Otra mutación que afecta el desarrollo del meristemo apical del tallo es *embryonic flower1* (*emf1*; Sung *et al*., 1992). Las plantas homocigóticas para esta mutación no forman una roseta de hojas vegetativas, sino hojas caulinares y un gran número de yemas florales, que dan lugar a flores anormales e incompletas. Presentan cotiledones ovales y sin peciolo y la elongación de los entrenudos ocurre inmediatamente después de la germinación. El fenotipo de estos mutantes indica su incapacidad para llevar a cabo la fase vegetativa del desarrollo, pasando directamente de la germinación a la fase inflorescente. La observación microscópica de estos mutantes evidencia alteraciones en la estructura de su meristemo caulinar y en la forma

y el tamaño de las células que lo integran, apreciables desde el estadio embrionario de corazón, que se manifiestan de forma más clara tras la germinación (Sung *et al*., 1992; Bai y Sung, 1995). Se supone que el gen *EMF1* está implicado en la especificación del destino vegetativo, ya que sus mutaciones no tienen consecuencias en los patrones de división embrionarios de tejidos y órganos como la raíz.

Medford *et al*. (1992) seleccionaron un grupo de mutantes afectados en el desarrollo del ápice caulinar a partir de una mutagénesis a gran escala con ADN-T (Feldman, 1991). Uno de ellos, *curly* (*crl*), presenta una expansión anormal de sus cotiledones y hojas, así como de todos los órganos formados a partir del meristemo apical. Sin embargo, el estudio microscópico del meristemo del mutante no permite constatar anomalía estructural alguna, lo que sugiere que la mutación altera procesos posteriores a la iniciación de los órganos, e indica claramente que no todas las alteraciones del ápice del tallo son atribuibles a daños en el meristemo. Por el contrario, otros mutantes obtenidos en la misma búsqueda, *forever young* (*fey*), *disrupted* (*dip*), *schizoid* (*shz*) y *finger leaf* (*fil*), muestran alteraciones en la estructura del meristemo apical. Las plantas mutantes *fey* y *dip* presentan raíz, hipocotilo y cotiledones normales. El primero de estos mutantes, *fey*, produce entre 2 y 7 primordios foliares anormales, que son iniciados por un número de células superior al normal y mueren prematuramente, presentando asimismo un meristemo apical más aplastado que el silvestre, con células desorganizadas. Los mutantes *dip* presentan un meristemo apical deforme, con hojas de formas variables: arrugadas, elongadas y estrechas, y sin simetría dorsoventral, entre otras. Estas mutaciones parecen perturbar alguna función común al meristemo y a los primordios foliares o a la comunicación entre ambos, aunque también puede considerarse la hipótesis de que afecten únicamente al meristemo y que las alteraciones del ápice sean un reflejo de dicho daño (Medford *et al*., 1992). La clonación del gen *FEY* ha permitido establecer que codifica para una oxidorreductasa (Callos *et al*., 1994). La mutación *schizoid* (*sch*) determina la aparición de ápices vegetativos múltiples con una alteración en la zona del meristemo central que se hace patente por la necrosis de las células del tallo principal, degeneración que no se observa, sin embargo, en los tallos axilares. Por su parte, la mutación *finger leaf* (*fil*) hace que los dos primeros primordios foliares no se expandan lateralmente, obteniéndose hojas semejantes a dedos, carentes de dorsoventralidad y de tricomas. El tallo de los mutantes *fil* presenta algunas características foliares, y surgen de él estructuras semejantes a hojas, muy heterogéneas en su forma (Bowman, 1994).

Tabla 4.- Algunas mutaciones que alteran el desarrollo del meristemo caulinar en *Arabidopsis thaliana*

Gen	Fenotipo mutante	Referencia
SHOOT MERISTEMLESS (*STM*)	Carencia de meristemo caulinar.	Barton y Poethig, 1993.
WUSCHEL (*WUS*)	Carencia de meristemo caulinar embrionario.	Laux *et al.,* 1996.
PINHEAD (*PNH*)	Carencia de meristemo caulinar primario y axilar.	McConnel y Barton,1995.
FASCIATED1 (*FAS1*) *FASCIATED2* (*FAS2*)	Tallo fasciado, hojas estrechas y dentadas, y meristemo más plano de lo normal.	Leyser y Furner, 1992.
CLAVATA1 (*CLV1*) *CLAVATA2* (*CLV2*) *CLAVATA3* (*CLV3*)	Tallo fasciado, aunque con hojas normales.	Leyser y Furner, 1992; Koornneef *et al*., 1983; Clark *et al*., 1995.
FULLY FASCIATED (*FUF*)	Tallo fasciado, aunque con hojas normales.	Medford *et al*., 1992.
EMBRYONIC FLOWER (*EMF*)	Ausencia de roseta. Aparición de hojas caulinares y yemas florales inmediatamente después de la germinación.	Sung *et al*., 1992.
CURLY (*CRL*)	Expansión anormal de todos los órganos que surgen a partir del meristemo (cotiledones y hojas).	Medford *et al*., 1992.
FOREVER YOUNG (*FEY*)	Primordios foliares anormales.	Medford *et al*., 1992.
DISRUPTED (*DIP*)	Meristemo apical y hojas deformes.	Medford *et al*., 1992.
SCHIZOID (*SHZ*)	Numerosos ápices vegetativos.	Medford *et al*., 1992.
FINGER LEAF (*FIL*)	Los primeros primordios foliares no se expanden lateralmente.	Medford *et al*., 1992.
PIN-FORMED (*PIN*)	Meristemo caulinar alterado.	Goto *et al*., 1987.
PINOID (*PID*)	Meristemo caulinar alterado.	Bennet *et al*., 1995.
REVOLUTA (*REV*)	Hojas muy grandes y reducción en el número de tallos y flores axilares.	Talbert *et al.,* 1995.

Las mutaciones en los genes *PIN-FORMED* (*PIN*; Goto *et al*., 1987) y *PINOID* (*PID*; Bennet *et al*., 1995) provocan alteraciones en el desarrollo del meristemo apical caulinar que se manifiestan en los órganos que de aquél derivan: los cotiledones, las hojas y las flores. Ambas mutaciones perturban el transporte polar de auxinas, causando alteraciones semejantes en la inflorescencia y las flores (Goto *et al*., 1987; Bennet *et al*., 1995), pero difieren en sus efectos sobre el desarrollo vegetativo. Las plantas *pin* presentan frecuentemente un solo cotiledón, que en ocasiones es discoidal o con forma de copa, así como una disminución importante en el número de hojas de la roseta y caulinares, además de modificaciones en la filotaxia. Sin embargo, entre las plantas *pid* es frecuente hallar algunas con tres cotiledones, que pueden ser pequeños y lobulados, así como un pequeño aumento en el número de hojas de la roseta. Solo aparecen alteraciones en la filotaxia de las plantas con tres cotiledones, pues las primeras hojas,

en vez de iniciarse opuestas, aparecen entre los cotiledones, lo que sugiere que la posición de éstos es importante para la localización de los primeros primordios foliares (Bennet *et al*., 1995), tal como se comentó en el apartado I.6.1, en la página 17.

Las mutaciones *pinhead* y *revoluta* de *Arabidopsis thaliana* producen alteraciones en la formación de los meristemos axilares. Mientras que las lesiones en el gen *PINHEAD* reducen el número de yemas iniciadas en las axilas de las hojas (McConnell y Barton, 1995), la mutación *revoluta* produce hojas inusualmente grandes y una reducción en el número de tallos y flores axilares (Talbert *et al.,* 1995). La terminación prematura del meristemo apical y la aparición de hojas o estructuras filamentosas en lugar de tallos axilares en estos mutantes indican que el gen *REVOLUTA* puede jugar algún papel en el mantenimiento del meristemo. Puede especularse, alternativamente, que la hoja crece excesivamente a expensas del desarrollo del meristemo axilar (Talbert *et al.,* 1995).

Se conocen otros genes cuyas mutaciones alteran algún aspecto del desarrollo del meristemo caulinar, algunos de los cuales se recogen en la Tabla 4, junto a los comentados hasta aquí.

I.6.4.- Ontogenia de la hoja

La hoja es uno de los principales órganos de las plantas, el que en mayor medida contribuye a la fotosíntesis, proceso del que depende la práctica totalidad de la vida en el planeta. Además, supone el mayor aporte de biomasa de muchas plantas herbáceas, constituyendo el motivo del interés comercial de muchos vegetales. Dado que los órganos florales no son más que hojas modificadas, el estudio de la morfogénesis de la hoja es fundamental para la comprensión de la morfogénesis del sistema del tallo.

A pesar de que la hoja es, a primera vista, una estructura simple (Figura 10), su organogénesis dista de ser sencilla, fundamentalmente por la coexistencia de dos procesos, la división y la expansión celular, que contribuyen a la arquitectura final del órgano y se simultanean durante el crecimiento de éste. Desde el punto de vista de la Biología del desarrollo, las hojas son interesantes porque poseen una gran variación en su forma, que está regulada genéticamente, y porque su accesibilidad las convierte en un sistema ideal para el análisis de aspectos capitales de la ontogenia vegetal. Cara a la resolución de los problemas a los que se han enfrentado tradicionalmente quienes han intentado acometer el estudio de su desarrollo, la hoja de *Arabidopsis thaliana* presenta dos ventajas fundamentales, su sencilla estructura y su pequeño tamaño, que permite el análisis microscópico de la hoja entera en todos sus estadios (Telfer y Poethig, 1994).

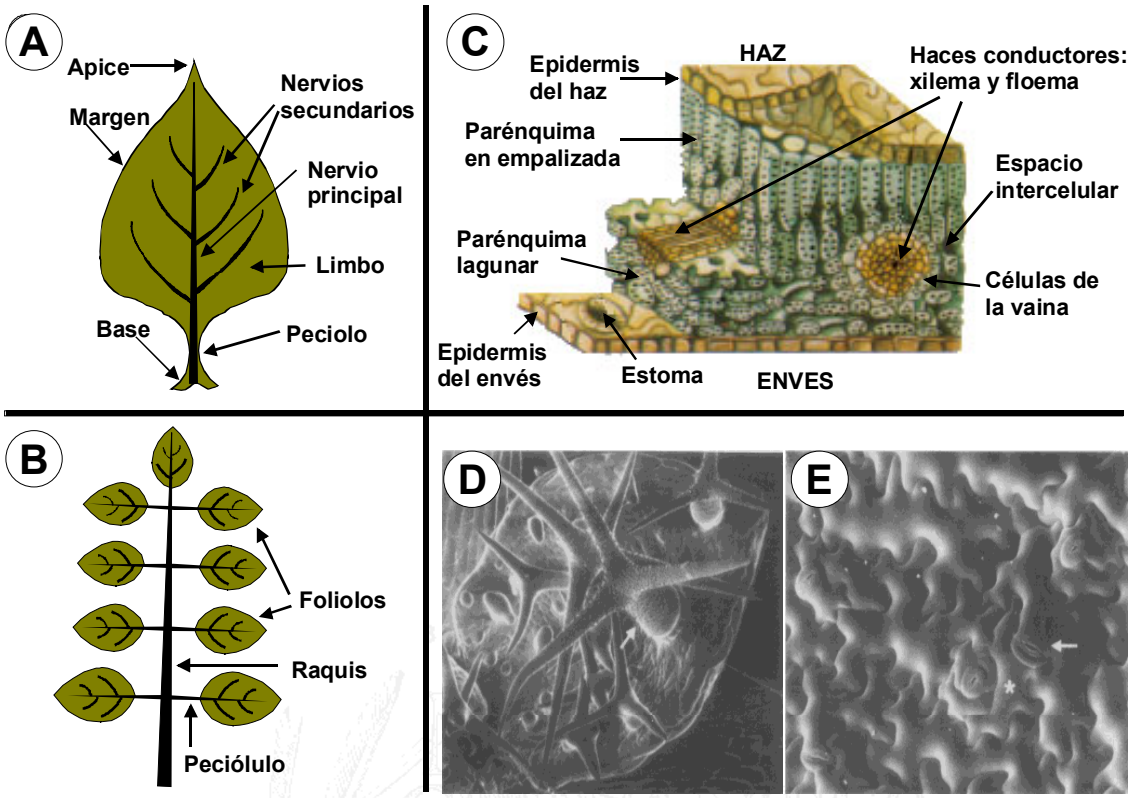


Figura 10.- Anatomía de la hoja. Se representan esquemáticamente las partes de una hoja simple (A) y una compuesta (B), así como la estructura interna de una hoja C3 (C). Las micrografías recogidas en (D) y (E) muestran detalles de la superficie de una hoja, que corresponden a los tricomas y las células de la epidermis, respectivamente. Las figuras se han tomado de Poethig, 1997 (A y B), de Haro, 1964 (C), y Bowman, 1994 (D y E).

Una hoja puede definirse como un órgano lateral determinado, es decir, de crecimiento limitado, que se desarrolla a partir de un tallo, posee dorsoventralidad, no está acompañado por ningún otro órgano en su cara abaxial y presenta habitualmente una yema lateral en la base de su cara adaxial (Tsukaya, 1995). Existe cierta controversia acerca de si puede afirmarse que los cotiledones son un tipo de hoja. A pesar de que la anterior definición de la hoja se ajusta a las características de un cotiledón, el origen de este último es distinto, ya que no procede del meristemo caulinar, sino de los tejidos embrionarios. De hecho, en los individuos mutantes *shoot meristemless*, en los que no aparece el meristemo apical del tallo, los cotiledones son normales (Barton y Poethig, 1993). No obstante, las hojas y los cotiledones comparten

algunos sistemas reguladores básicos, como lo demuestra la existencia de mutaciones que afectan por igual a hojas y cotiledones, como *angustifolia*, que causa que ambos órganos sean más estrechos de lo habitual (Tsukaya, 1995). Otras mutaciones, como *leafy cotyledons* (*lec*), provocan la aparición de rasgos foliares en los cotiledones, como la ausencia de proteínas de reserva, la diferenciación de tricomas y la intolerancia a la desecación (Meinke, 1992).

La mayoría de las hojas constan de tres partes más o menos diferenciadas (Figura 10): la base foliar, que en algunas especies envaina al tallo, un pie basal, conocido como peciolo o raquis, y la porción distal, el limbo, que es usualmente verde y plano. Existen dos tipos principales de hojas, las simples, en las que el limbo es una estructura unitaria, y las compuestas, en las que el peciolo se une a varios foliolos, denominados pinnas. Una característica importante de las hojas es su asimetría dorsoventral, siendo morfológica y anatómicamente diferentes sus caras dorsal o adaxial y ventral o abaxial. La hoja de *Arabidopsis thaliana* está compuesta por una epidermis superior (adaxial) y otra inferior (abaxial), y cinco capas de tejido interno. Estas últimas incluyen una capa de mesófilo en empalizada, situada bajo la epidermis del haz, que consta de células alargadas, alineadas con respecto al eje dorsoventral. Entre éstas y la epidermis inferior se localizan unas cuatro capas de mesófilo lagunar o esponjoso, compuesto por células irregulares y pequeñas, con grandes espacios de aire entre ellas. Los tejidos vasculares se sitúan dentro del mesófilo esponjoso (Figura 10C; Telfer y Poethig, 1994).

I.6.4.1.- Análisis genético del desarrollo de la hoja

Con el fin de estudiar el desarrollo de la hoja, es útil dividirlo en varias etapas (Sylvester *et al.,* 1996). En la primera de ellas, el primordio foliar es iniciado y adquiere su identidad como hoja. En la segunda, la mayor parte de la hoja comienza a determinarse y adquiere su forma básica, completándose la histogénesis en la fase final. Las hojas surgen a intervalos regulares de tiempo, denominados plastocronos, unidades que se definen como el tiempo transcurrido entre la iniciación de primordios sucesivos. Las hojas aparecen en posiciones predecibles y regularmente espaciadas, en la periferia del meristemo apical del tallo, generando un patrón de órganos laterales conocido como filotaxia (Steeves y Sussex, 1989). El papel del meristemo apical en la iniciación foliar no está claramente establecido. En efecto, la formación de hojas en ausencia de meristemo apical es una observación frecuente en cultivos de tejidos (Sattler y Maier, 1977; Selker y Lyndon, 1996). Este hecho puede interpretarse en el sentido de que la iniciación foliar

es facilitada por la fisiología o la estructura del meristemo caulinar, aunque éste no dirige activamente el proceso sino que representa meramente una región en la que las hojas pueden autoorganizarse espontáneamente (Poethig, 1997).

La primera evidencia morfológica de la iniciación foliar es un cambio en la orientación de las divisiones celulares en la epidermis y en las capas internas del meristemo caulinar (Figura 11A; Steeves y Sussex, 1989). Usualmente, la primera indicación de que un nuevo primordio foliar se está formando es una división periclinal en las capas L1 y/o L2 de la túnica. A nivel molecular, el primer signo de la iniciación foliar es el cambio de los niveles de actividad de los genes relacionados con *KNOTTED1* (Jackson *et al.,* 1994; Lincoln *et al.,* 1994; Long *et al.,* 1996) conocidos como genes *knox de clase 1* (Kerstetter *et al.,* 1994), que se expresan en todo el meristemo excepto en el primordio foliar, habiéndose propuesto que se requiere su inactividad para una adecuada iniciación de la hoja (Hake *et al.,* 1995).

Se han propuesto dos modelos biofísicos para la regulación de la iniciación foliar, en uno de los cuales (Green y Lang, 1981) se asume que el hecho fundamental es la generación de un campo de células en las que las microfibrillas de celulosa se disponen según una ordenación circular. Esto impediría el ensanchamiento lateral de las células, forzando la expansión del primordio hacia el exterior del meristemo. El segundo modelo (Green *et al.,* 1996) propone que cada primordio foliar nuevo se forma por el plegamiento espontáneo de las capas externas del meristemo apical, a causa del estrés generado por los primordios preexistentes.

En la iniciación de la hoja interviene un grupo de células pertenecientes a todas las capas histogénicas del meristemo apical. La obtención de quimeras periclinales, en las que una de las capas celulares presenta un genotipo diferente del resto, ha permitido establecer que el primordio foliar surge de al menos tres capas del meristemo caulinar (Figura 11B; Satina *et al.,* 1940; Steward y Dermen, 1975). La capa más externa, L1 o dermatógeno, da lugar por divisiones anticlinales a la epidermis superior y la inferior de la hoja, mientras que la capa L2 o subepidérmica genera la totalidad del mesófilo en empalizada y la parte inferior del mesófilo esponjoso en el centro de la hoja, así como todo el mesófilo en los márgenes del órgano. La capa L3 del meristemo produce las capas centrales del mesófilo esponjoso en la zona central de la hoja (Telfer y Poethig, 1994). La contribución de las capas individuales no es estrictamente dependiente de linaje, ya que si una célula de una capa invade ocasionalmente a la vecina, se diferenciará según el destino de esta última, lo que constituye otro ejemplo más de diferenciación más dependiente de la posición que del linaje (Stewart y Dermen, 1975).

Otros estudios demuestran que el tamaño del primordio foliar varía según la especie, desde 5-10 células por capa en *Arabidopsis thaliana* (Furner y Pumfrey, 1992; Irish y Sussex, 1992) hasta 50-100 en el tabaco (Poethig y Sussex, 1985b), el maíz (Poethig y Szymkowiak, 1995) y el algodón (Dolan y Poethig, 1997).

La filotaxia o patrón de iniciación foliar es otra de las características más estudiadas del desarrollo de la hoja. Se conocen varios patrones típicos de filotaxia como el dístico o alterno, en el que las hojas se inician una a una, separadas por un ángulo de 180°, el espiral si los ángulos se aproximan al de Fibonnaci (137,5°) y el verticilado cuando varias hojas se inician simultáneamente. El patrón decusado es un subtipo especial del verticilado, en el que se inicia un par de hojas simultáneamente y con un ángulo de 90° respecto del par anterior. Se han propuesto varios modelos para explicar cómo se determinan los lugares de iniciación de las hojas (revisado en Smith y Hake, 1992). Se conocen mutaciones que alteran la filotaxia, como la causante del síndrome *ABPHYLL* en el maíz, que cambia el patrón dístico del tipo silvestre por otro decusado o espiral, a la vez que determina un incremento en el tamaño del meristemo apical (Greyson y Walden, 1972). Por otra parte, las mutaciones *clavata1*, *fasciata1* y *fasciata2* en *Arabidopsis thaliana* causan una filotaxia irregular, además de la fasciación y bifurcación del tallo. También en estos casos se constata un aumento del tamaño del meristemo apical (Leyser y Furner, 1992).

La determinación de la hoja ocurre gradualmente y se completa después de que ésta emerja del ápice, según se ha demostrado mediante experimentos de microcirugía. Así, Sussex (1955), seccionando longitudinalmente primordios foliares de patata, obtuvo estructuras con simetría radial y carentes de limbo. Por su parte, Sachs (1969), cortando de igual modo primordios foliares de guisante en diferentes momentos del desarrollo, observó que dichos fragmentos perdían progresivamente la capacidad de generar una hoja entera. A lo anterior cabe añadir el fenotipo de los mutantes *phantastica* de *Anthirrinum majus* (Waites y Hudson, 1995), que presentan algunas hojas que carecen de limbo, en las que todas las células presentan características ventrales. Se ha

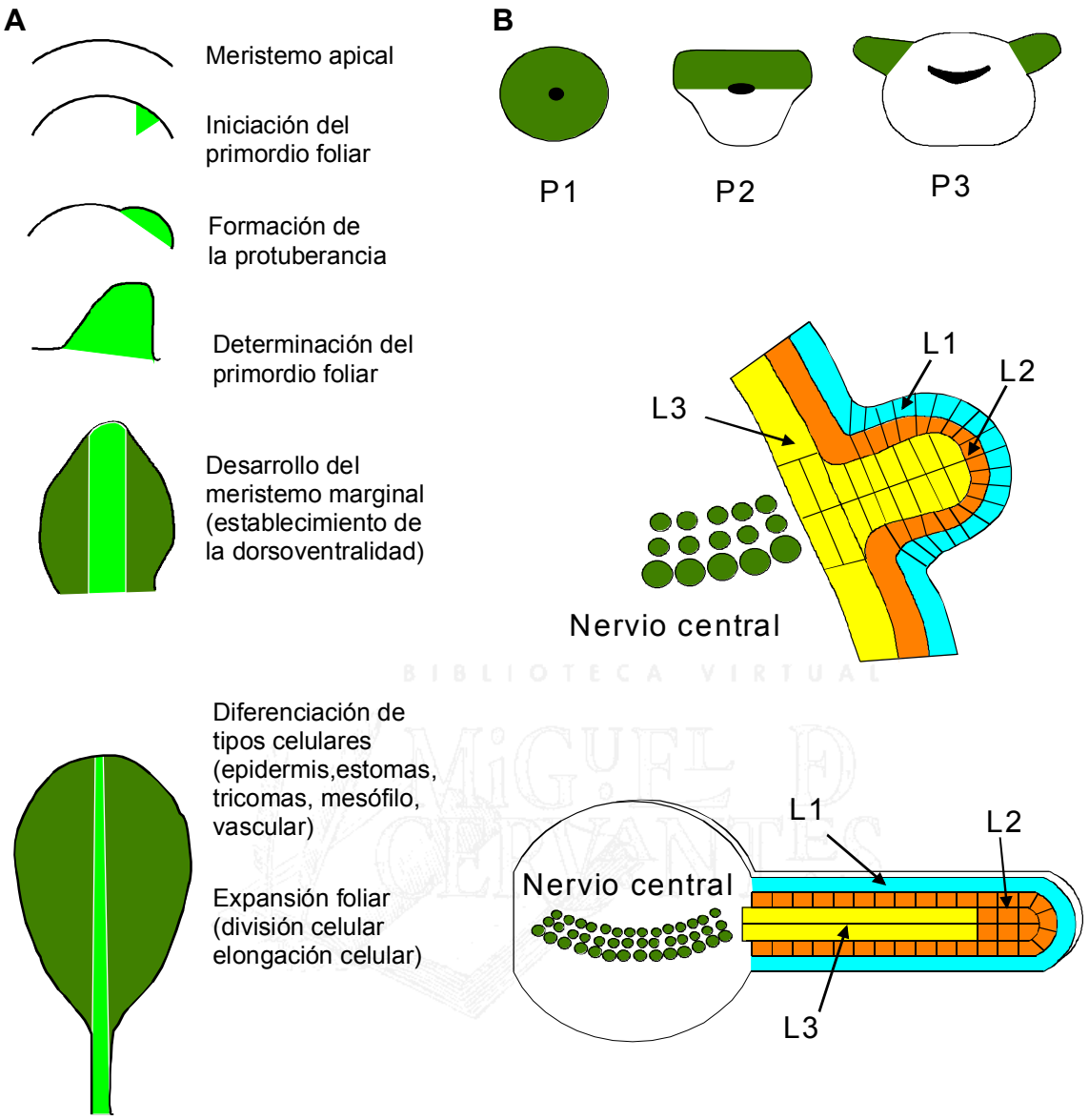


Figura 11.- Algunos aspectos de la ontogenia de la hoja. (A) Procesos morfogenéticos durante el desarrollo de la hoja en las dicotiledóneas. La progresión de estadios tempranos a tardíos se indica de arriba abajo. Se representa en color verde claro el tejido generado por la actividad del meristemo apical y en verde oscuro el que se origina a partir de los meristemos marginales, que dan lugar al limbo. (B) Iniciación y expansión del limbo en *Nicotiana sylvestris*. En la parte superior de la imagen se destaca en color verde la zona de división y expansión celular durante los primeros tres plastocronos (P1, P2 y P3). En la parte central se ilustra el lugar de iniciación del limbo, observándose que los planos de división son anticlinales en las capas L1 (en azul) y L2 (en naranja) y periclinales en L3 (en amarillo). En la parte inferior se representa el linaje de las células del limbo. Mientras que la capa L1 origina la epidermis superior y la inferior, la L2 da lugar a todo el mesófilo en el margen y sólo a la parte superior e inferior en el centro de la hoja. Por último, la capa L3 genera la parte central del mesófilo, en las proximidades del nervio central. Tomado, con pequeñas modificaciones, de Tsukaya, 1995 (A), y McHale, 1993 (B).

propuesto que la expresión del gen *PHANTASTICA* se precisa para la especificación de la identidad adaxial (dorsal) y, probablemente, que la diferenciación del limbo tiene como prerrequisito la yuxtaposición de células con características dorsales y ventrales (Waites y Hudson, 1995).

Tras su iniciación, el primordio foliar se expande lateralmente para formar el limbo. Este se inicia a partir de un grupo de células meristemáticas localizadas en los márgenes del primordio, el denominado meristemo marginal, que incluye varios grupos de células de cada una de las tres capas meristemáticas (Poethig y Sussex, 1985a). La función del gen *LAM-1* de *Nicotiana sylvestris* parece clave en este proceso, ya que sus mutaciones producen hojas sin limbo y sin diferenciación en los márgenes (McHale, 1992). En el maíz, sin embargo, el limbo surge directamente desde el meristemo y no por expansión lateral del nervio central (Poethig y Szymkowiak, 1995).

La diversidad en la forma de las hojas que se constata en la naturaleza se debe fundamentalmente a variaciones en el grado de su expansión dentro del plano del limbo (Dolan y Poethig, 1991; Tsuge *et al.,* 1996). Además, dentro de una misma planta pueden aparecer hojas de diferentes formas, fenómeno que se conoce como heteroblastia, que parece tener relación con cambios en el meristemo caulinar y con influencias hormonales, según se ha comentado acerca del cambio de fase en el apartado **I.6.3** de esta Tesis (página 26). Los diferentes modos de expansión de las hojas de distintas especies han sido tradicionalmente achacados a sus patrones de división celular, debido a que las posiciones relativas de las células no pueden modificarse, como consecuencia de la rigidez de la pared celular. Se han hallado diferencias regionales en la tasa y orientación de las divisiones celulares durante la expansión foliar, algunas de ellas correlacionadas con las diferencias en el ritmo u orientación del desarrollo (Poethig y Sussex, 1985b). Sin embargo, otros resultados, como los de experimentos en los que tras la irradiación de plantas con rayos γ se constata que la hoja se expande sin división celular, apoyan la hipótesis que dicha expansión está regulada por factores que operan de forma no autónoma, con un control a un nivel regional, con independencia de la orientación de las divisiones celulares (Haber y Foard, 1963; revisado en Smith, 1996). Esta idea es corroborada por la observación de que el mutante *tangled-1* (*tan-1*) del maíz, en el que están alterados los planos de división celular, el desarrollo de la hoja sucede de forma más lenta, obteniéndose un órgano de pequeño tamaño pero sin alteraciones en su forma (Smith *et al.,* 1996).

Meyerowitz (1996; 1997) ha afirmado que la pregunta de quién gobierna la forma final de los órganos en plantas, si un patrón de división estricto o un control más global, podría responderse si se postula la existencia de una comunicación intercelular de corto rango, que permitiera a las células vecinas reducir sus diferencias. De este modo, las variaciones en los patrones de división en algunas células podrían verse compensados por cambios complementarios en sus vecinas. La morfogénesis, pues, dependería de patrones de división celular altamente regulados, aunque variables.

Dos complicaciones adicionales en el estudio de la dinámica de crecimiento de la hoja derivan de los diferentes estados de desarrollo en los que las distintas partes del órgano en expansión pueden encontrarse, así como de que son dos los procesos responsables del crecimiento y la morfogénesis de la hoja, la división y la expansión celular. En general, las divisiones celulares cesan primero en las porciones distales del limbo mientras prosiguen en la base de la hoja. A este gradiente basipétalo se le superponen los distintos comportamientos de los diferentes tejidos de la hoja, ya que las células epidérmicas, con la excepción de las células estomáticas de guarda, dejan de dividirse antes que las del mesófilo, siendo las células en empalizada las últimas en finalizar sus divisiones. Se ha observado también un gradiente basipétalo en cuanto a la expansión y la maduración celular. Al final del desarrollo foliar, el volumen celular medio ha experimentado un aumento de 20-40 veces con respecto al inicial (Dale, 1988). En estudios del crecimiento de las dos primeras hojas del haba (*Phaseolus vulgaris*) se ha observado un crecimiento exponencial durante los 10 primeros días tras la germinación, merced a la acción combinada de la división y la expansión celular, procesos que se superponen en el tiempo (Dale, 1964).

Se ha aceptado clásicamente que las células internas de las hojas de las dicotiledóneas derivan de un pequeño grupo, las denominadas células marginales iniciales (Avery, 1933; citado en Dolan y Poethig, 1991). Sin embargo, estudios detallados de la orientación y el ritmo de las divisiones celulares, mediante análisis clonal (Poethig y Sussex, 1985; Dolan y Poethig, 1991), indican que la división celular durante el desarrollo de la hoja se produce en toda la superficie de ésta, a una tasa muy similar, sin evidencia de zonas meristemáticas.

Tsuge *et al.* (1996) han estudiado el desarrollo de las hojas del ecotipo Columbia de *Arabidopsis thaliana*, mediante cortes histológicos transversales y longitudinales, obtenidos en diferentes momentos del desarrollo foliar, comprobando que las divisiones celulares parecen ocurrir en todas las fases del crecimiento del órgano, aunque fundamentalmente en sus primeros estadios. A lo largo de la expansión de la hoja se

constata un aumento en el número de sus células, tanto en la dirección longitudinal como en la transversal, pero no en el grosor del órgano. Por otro lado, se observan fenómenos de expansión celular en las tres direcciones mencionadas, tanto más patentes cuanto más próxima a su madurez se encuentra la hoja.

Los fenotipos de las mutaciones en *ANGUSTIFOLIA* (*AN*) y *ROTUNDIFOLIA* (*ROT*) evidencian la relación de estos genes con los procesos de expansión celular antes mencionados. En efecto, la mutación *an* (Rédei, 1962; citado en Tsuge, 1996) causa la aparición de cotiledones y hojas estrechos, aunque de una longitud normal, mientras que otros órganos, como el hipocotilo y la raíz, son aparentemente normales. De hecho, los primordios foliares de los mutantes *an* muestran un aspecto semejante a los silvestres. Sin embargo, en estadios posteriores de la expansión de la hoja, se aprecia que el número de células es inferior al del tipo silvestre en el eje transversal del órgano, superior en el dorsoventral y similar en el longitudinal. En suma, el número total de células de las hojas de estos mutantes es aproximado al de sus equivalentes silvestres. En estos mutantes, además, las células se elongan menos de lo normal en la dirección transversal del órgano y más de lo normal en la dorsoventral. Por su parte, las mutaciones *rotundifolia* (*rot*; Tsuge *et al*., 1996) causan un acortamiento de la hoja, dando lugar a peciolos, hojas y órganos florales más cortos que los del tipo silvestre. También en este caso los primordios foliares de los mutantes son semejantes a los silvestres, pero su desarrollo posterior manifiesta una reducción en el tamaño de las células en la dirección longitudinal, sin modificarse el número de éstas.

Los individuos dobles mutantes *an rot3* manifiestan aditivamente los efectos fenotípicos de ambas mutaciones, siendo sus hojas más cortas, estrechas y gruesas que las silvestres, lo que indica la independencia de las funciones de los genes *AN* y *ROT3*. Su relación longitud/anchura es semejante a la del tipo silvestre, pero las hojas son más pequeñas. Las células de estos dobles mutantes se expanden más que las silvestres en la dirección dorsoventral, pero menos en la longitudinal y la transversal (Tsuge *et al*., 1996). Se ha propuesto un modelo (Figura 12), según el cual las células de la hoja se expandirían como consecuencia de la presión de turgor a la que estarían sujetas, contrarrestada por elementos de polaridad específica (microfibrillas) situadas en la pared celular. Según dicho modelo, los productos de los genes *AN* y *ROT3* actuarían como supresores de estos elementos, permitiendo la expansión celular en sentido transversal y longitudinal, respectivamente. Las mutaciones en alguno de estos dos genes tendrían como consecuencia la limitación de la expansión celular en una de las direcciones mencionadas. El incremento en el grosor de las células no sería más que un

efecto secundario de las restricciones impuestas a la expansión en las restantes direcciones (Tsuge *et al*., 1996).

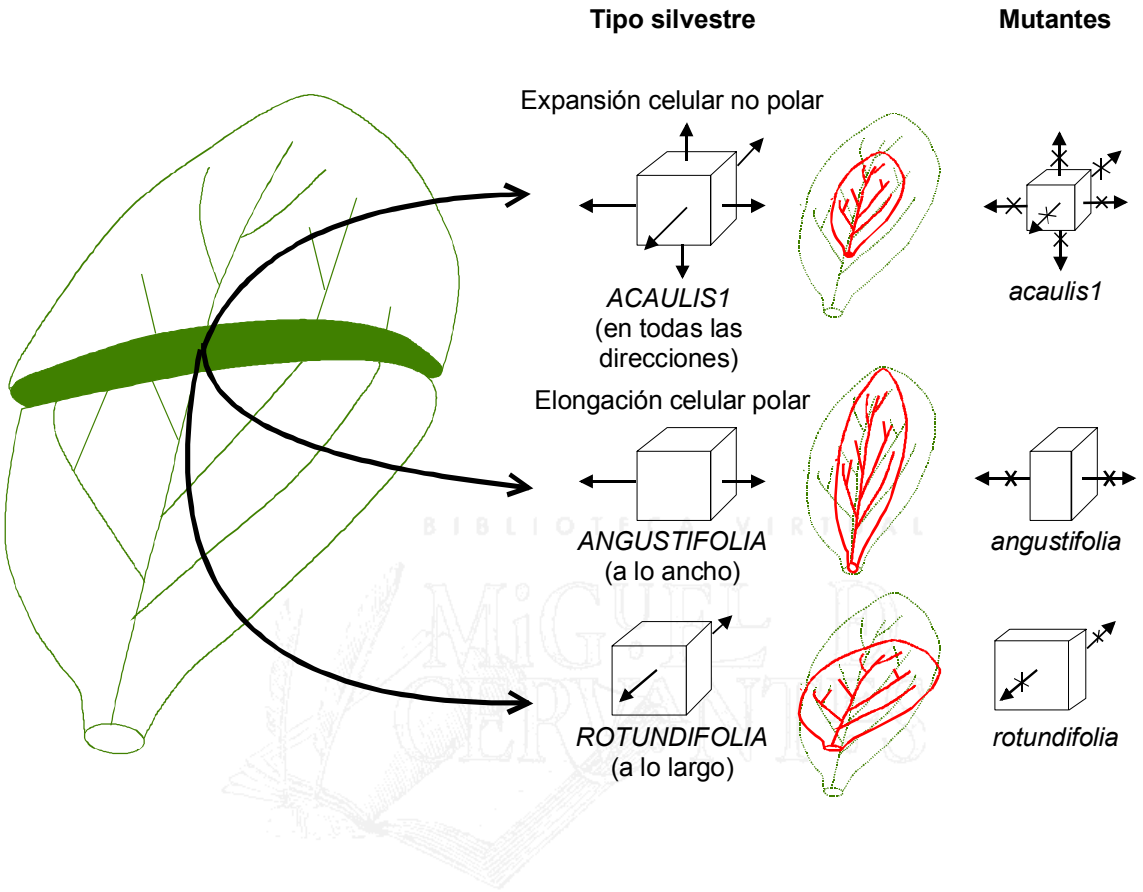


Figura 12.- Presunto papel de los productos de los genes *AN*, *ROT3* y *ACL1* en la expansión de las células de la hoja en *Arabidopsis thaliana*. Cada poliedro representa una célula, y las flechas que parten de sus caras indican direcciones en las que ocurre (⟶) o se inhibe (—✕→) la expansión celular. Los esquemas de color verde representan hojas silvestres, y los rojos, hojas mutantes. Para más aclaraciones, véase el texto. Redibujado a partir de Tsukaya, 1995, y Tsuge *et al*., 1996.

Se conocen otras mutaciones, denominadas *acaulis1* (*acl1*; Tsukaya *et al*., 1993) y *acaulis2* (*acl2*; Tsukaya *et al*., 1995) que perturban el desarrollo de las hojas y la inflorescencia. Las plantas *acl1* presentan hojas vegetativas pequeñas, retorcidas y con tendencia a curvarse hacia el suelo, lo que aparentemente se debe a una interrupción en la expansión celular en todas las direcciones, que sucede en estadios tempranos del desarrollo foliar. Como consecuencia, tanto las células como los espacios intercelulares en las hojas mutantes son menores que los del tipo silvestre. En cambio, el número de capas celulares está incrementado (Tsukaya *et al*., 1993). Los mutantes *acl2* muestran

hojas cuyo limbo es aparentemente normal, aunque su peciolo, al igual que el propio tallo de la planta, es significativamente más corto que el silvestre (Tsukaya *et al*., 1995).

Existe también un grupo de mutaciones en *Arabidopsis thaliana* que afectan a la expansión de todas las células de la planta, incluidas las de la hoja. Entre ellas merecen mención los mutantes *dwarf* (*dw*; Koornneef *et al*., 1983), *diminuto* (*dim*; Takahashi *et al*., 1995) y *sabre* (*sab*; Aeschbacher *et al*., 1995), que causan la ausencia de entrenudos y hojas y raíces de longitud reducida. Sin embargo, las hojas presentan una anchura normal, dado que los genes *DW*, *DIM* y *SAB* actúan favoreciendo la elongación celular en la dirección del eje longitudinal.

Se ha descrito un gran número de mutaciones que modifican la identidad de las diferentes partes de las hojas compuestas del tomate (*Lycopersicon esculentum*), así como su forma y tamaño (Dengler, 1984). Esta especie, junto con el guisante, constituye una excelente elección para el estudio del desarrollo de la hoja compuesta (Young, 1983; Marx, 1987). El maíz es otro sistema en el que se han realizado numerosas investigaciones en la morfogénesis de la hoja, siendo sus mutaciones mejor conocidas las del gen *KNOTTED1* (*KN1*; Gelinas *et al.,* 1969), todas ellas dominantes, que causan su expresión ectópica, alterando la morfología de la hoja (Sinha y Hake, 1990; Smith *et al.,* 1992). El gen *KN1* (Hake *et al.,* 1989), que muestra homología con los homeóticos de animales (Vollbrecht *et al.,* 1991), no se expresa en la hoja del tipo silvestre, sino en el meristemo vegetativo, con excepción de las zonas en las que se está formando un primordio foliar, por lo que se ha propuesto que su función es la de mantener el estado indiferenciado de las células meristemáticas (Smith y Hake, 1994; Jackson *et al.,* 1994). Se han aislado homólogos del gen *KN1* en varias especies vegetales, como el arroz, la soja, el nabo y *Arabidopsis thaliana* (revisado en Hake *et al.,* 1995), todos los cuales parecen actuar específicamente en el meristemo. La expresión ectópica de *KN1* o de uno de sus homólogos, *KNAT1*, causa una considerable alteración en la morfología de la hoja en el tabaco, el tomate y *Arabidopsis thaliana* (Haveren *et al.,* 1996; Lincoln, 1994).

I.6.4.2.- Efectos de las condiciones fisiológicas y ambientales sobre el desarrollo de la hoja

Uno de los rasgos que distinguen a las plantas de los animales es la plasticidad de su desarrollo en respuesta a las condiciones ambientales y fisiológicas. El estrés hídrico, el metabolismo y la disponibilidad de nutrientes pueden modificar la morfología de la hojas y otros órganos (Tsukaya, 1995). Asimismo, las mutaciones en genes de

mantenimiento celular como los de una proteína ribosómica 18S (van Lijsebettens *et al*., 1994) o una quinasa (Roe *et al*., 1993), perturban el desarrollo de la hoja en *Arabidopsis thaliana*, que adquiere una forma ligeramente apuntada o aserrada, respectivamente. También se ha observado que el tratamiento de plántulas de los ecotipos Estland y L*er* con ácido fenilbórico (300-600 ppm) provoca la formación de hojas estrechas y lanceoladas, con ápices agudos, sin afectar otros aspectos del desarrollo (Bhatia y Smith, 1966). Las fitohormonas ejercen influencias sobre la morfogénesis foliar, ya que, entre otras, las mutaciones en el gen *AUXIN RESISTANT1* (*AXR1*) provoca la aparición de hojas pequeñas y tallos cortos, rasgos debidos a una reducción del número de células (Lincoln *et al*., 1990). Estas observaciones indican la importancia de las condiciones fisiológicas en el control del desarrollo vegetal, tanto el foliar como el de cualquier otro órgano. La luz es uno de los factores ambientales que más influye y de forma más específica en la morfogénesis de la hoja, lo que probablemente se debe a su carácter de órgano fotosintético, un tema que se aborda en el apartado I.6.7 de esta Tesis.

I.6.5.- La transición floral

El desarrollo del tallo en las angiospermas puede descomponerse en dos fases, la vegetativa y la reproductiva. El paso de la primera a la segunda de estas fases, la denominada transición floral, ocurre cuando el meristemo se hace competente para responder a determinados estímulos ambientales e iniciar el desarrollo floral (Shanon y Meeks-Wagner, 1991). En *Arabidopsis thaliana*, la manifestación morfológica de la transición floral es el paso de la roseta a la inflorescencia (véase el apartado I.5 y la Figura 4, en la página 9).

La transición floral en *Arabidopsis* es facultativa, es decir, no se requieren unas condiciones determinadas para promoverla. Sin embargo, algunos factores ambientales pueden alterar significativamente el momento en el que se abre la primera flor (el así denominado “tiempo de la floración”; *flowering time*), así como el número de nudos en la roseta (el número de hojas vegetativas) y en la inflorescencia temprana (el número de hojas caulinares; Koornneef *et al.,* 1991). En efecto, la prolongación del fotoperiodo reduce el tiempo de floración, de modo que la transición floral ocurre antes si las plantas son cultivadas bajo un régimen de días largos que si se las somete a días cortos. También influye la longitud de onda de la luz incidente sobre la planta, ya que las emisiones de color azul y rojo lejano promueven una floración temprana mientras que la luz roja la retrasa (Goto *et al.,* 1991b). La vernalización, o exposición de semillas

hidratadas a temperaturas inferiores a 10°C también adelanta la floración en algunos ecotipos (Karlsson *et al.,* 1993).

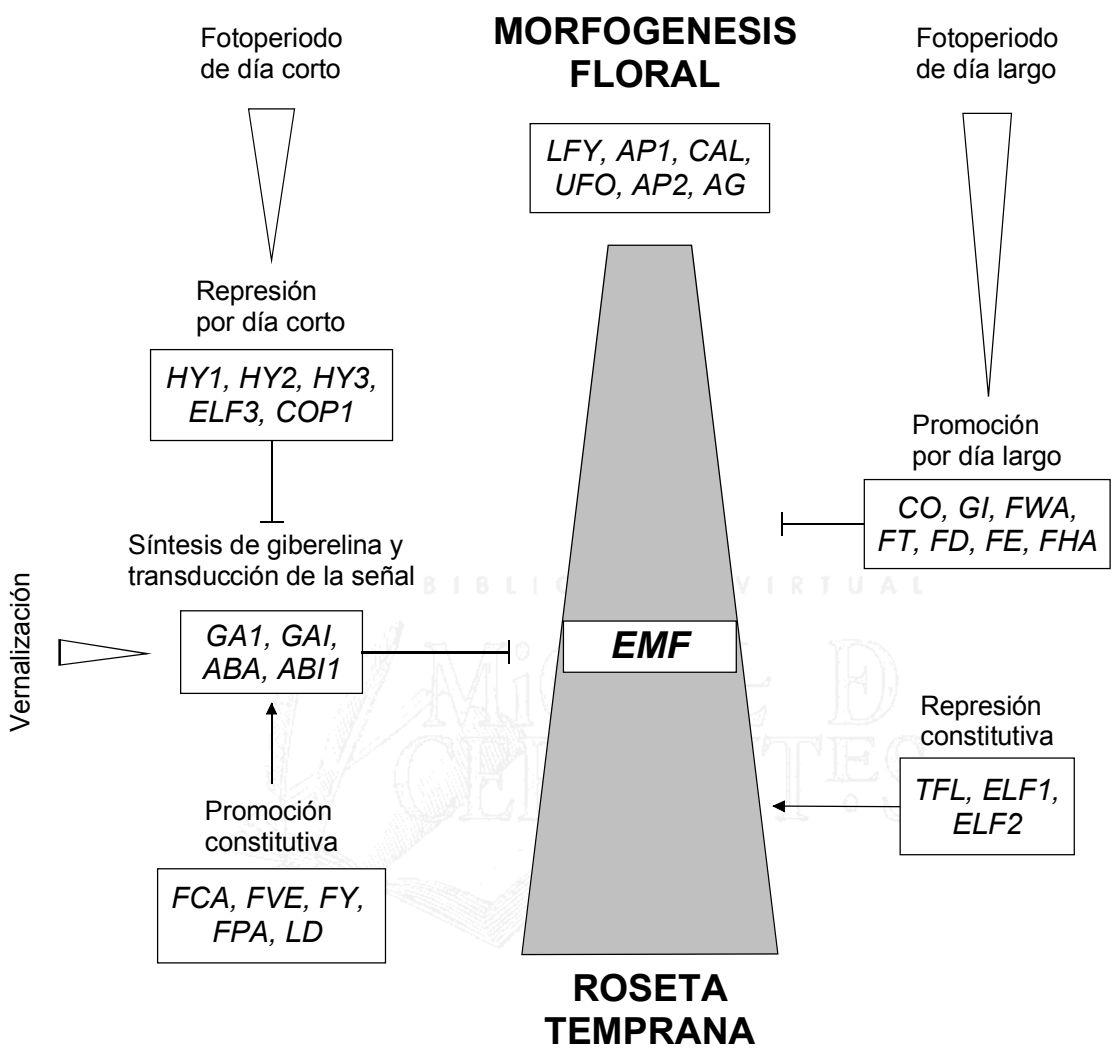


Figura 13.- Modelo para el control de la transición floral en *Arabidopsis thaliana*. La transición floral (arriba en la figura) ocurriría como consecuencia de la disminución progresiva de la expresión de *EMF* (representada mediate un trapecio), que estaría regulada tanto por los genes de floración tardía como por los de floración temprana. La actividad de este gen es modulada por programas internos o condiciones externas (los triángulos de la figura), a través de varias clases de productos génicos (agrupados en rectángulos). Los símbolos → y — indican, respectivamente, inducción e inhibición de la expresión de *EMF*, que pueden darse directamente, o indirectamente a través de los productos de otros genes. Redibujado, con pequeñas modificaciones, a partir de Haughn *et al.*, 1995.

Se han obtenido mutantes en *Arabidopsis thaliana* cuyo tiempo de floración es distinto del correspondiente a la estirpe silvestre de la que derivan. Se conocen mutantes de floración temprana y de floración tardía. Entre los primeros cabe destacar

terminal flower (*tfl*; Shannon y Meeks-Wagner, 1991), que presenta además una inflorescencia determinada, y *embryonic flower* (*emf*), que desarrolla una pequeña inflorescencia tras la germinación, independientemente de las condiciones ambientales, eludiendo por tanto la fase vegetativa (Sung *et al.,* 1992; véase el apartado **I.6.3**, en la página 23 y siguientes).

Entre los genes cuyas mutaciones retrasan la floración y determinan, por tanto, un aumento en el número de hojas de la roseta, cabe mencionar los conocidos como *late flowering genes* (*FCA, FPA, FVE, FY, FE, FT, FD, FHA y FWA*), *LUMINIDEPENDENS* (*LD*), *GIGANTEA* (*GI*) *y CONSTANTS* (*CO*), que han sido clasificados en dos grupos, en base a las respuestas de los correspondientes mutantes a la longitud del fotoperiodo o a la vernalización (Martínez-Zapater y Somerville, 1990; Koornneef *et al.,* 1991). Las secuencias que se han deducido para los productos de los genes *LD* y *CO* (Lee *et al.,* 1994; Putterill *et al.,* 1995) indican su probable actuación como factores de transcripción. Se han descrito, asimismo, otros genes cuyas mutaciones causan fenotipos aparentemente relacionados con la respuesta a las giberelinas, como *GIBBERELLIN REQUIRING* (*GA1*; Koornneef y van der Veen, 1980) y *GIBBERELLIN INSENSITIVE* (*GAI*; Koornneef *et al.,* 1985), asociados a una floración tardía.

En la Figura 13 se ilustra un modelo, que se ha propuesto para el control de la transición floral en *Arabidopsis thaliana* (Haungh *et al.,* 1995). En el modelo se asigna un papel central al gen *EMF*, cuya expresión se requiere para reprimir el desarrollo reproductivo.

I.6.6.- Morfogénesis floral

Uno de los cambios morfológicos más drásticos que tienen lugar en una planta tras la transición floral es la aparición de las flores. La flor de *Arabidopsis thaliana* ha sido descrita con gran detalle, tanto a nivel de su morfología como de su ontogenia (Bowman *et al.,* 1989). Presenta la estructura típica de las flores de las brasicáceas, regular, completa y con pedicelo. Se estructura en cuatro verticilos concéntricos, que comprenden cuatro sépalos, cuatro pétalos situados en posiciones alternas a las de los sépalos, seis estambres y un pistilo bicarpelar (Figura 14).

Es tradicional en el estudio de la morfogénesis floral dividir el proceso en dos etapas: la iniciación floral (*floral initiation*) o adquisición de la identidad floral por un primordio inflorescente, y posteriormente, la especificación de la identidad y la manifestación de las estructuras de cada uno de los órganos que componen la flor. Sin

embargo, el análisis genético del proceso ha revelado que muchos de los genes implicados actúan en ambas etapas (Haungh *et al*., 1994).

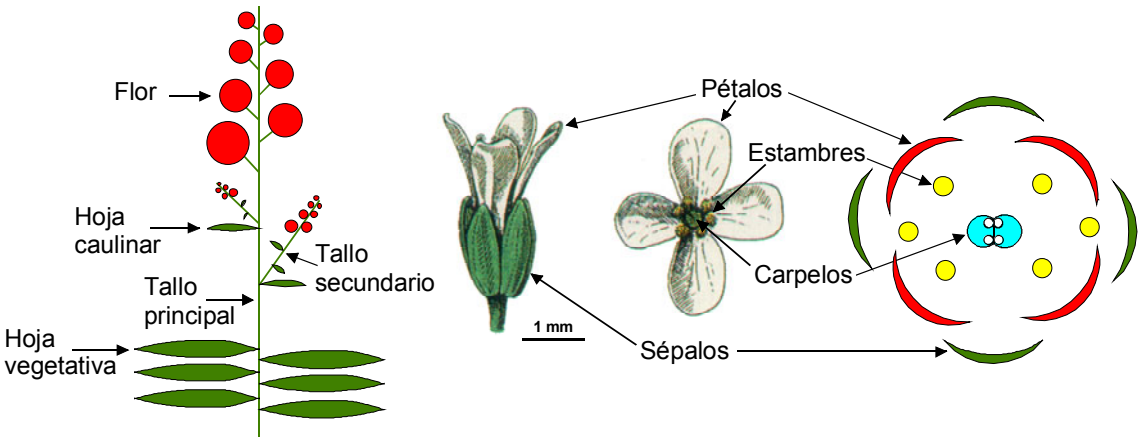


Figura 14.- Representación de la flor silvestre de *Arabidopsis thaliana*. El esquema de la izquierda indica las posiciones en las que aparecen las flores (círculos rojos). La flor se representa en el centro, en vistas lateral y superior. El esquema de la derecha corresponde a un corte transversal. Redibujado a partir de Coen y Meyerowitz, 1991.

Tras la transición de inflorescencia temprana a tardía (véase la Figura 4, en la página 9), los tallos dejan de producir hojas caulinares e inflorescencias para generar exclusivamente flores. Al menos seis genes, *LEAFY* (*LFY*), *APETALA1* (*AP1*), *APETALA2* (*AP2*), *CAULIFLOWER* (*CAL*), *UNUSUAL FLORAL ORGANS* (*UFO*) y *AGAMOUS-LIKE8* (*AGL8*) intervienen en el establecimiento de la identidad de meristemo floral (Kunst *et al.,* 1989; Irish y Sussex, 1990; Huala y Sussex, 1992; Mandel *et al.,* 1992b; Weigel *et al.,* 1992; Bowman *et al.,* 1993; Okamuro *et al.,* 1993; Haungh *et al.,* 1994; Levin y Meyerowitz, 1995; Hempel *et al*., 1997). Algunos de ellos participan también en la determinación de los órganos florales (ver más adelante). Sus mutaciones causan la aparición de tallos inflorescentes en las posiciones ocupadas normalmente por flores, fenotipo que en el caso de los alelos *cal* sólo se manifiesta en sus combinaciones dobles con las mutaciones en el gen *AP1*. Estos genes actúan de modo cooperativo y presentan una gran redundancia funcional (Bowman *et al.,* 1993). Todos ellos han sido clonados (Mandel *et al*., 1992b; Weigel *et al*., 1992; Jofuku *et al*., 1994; Kempin *et al*., 1995; Ingram *et al*., 1995; Hempel *et al*., 1997), habiéndose comprobado que los productos de *AP1*, *CAL*, *AP2* y *AGL8* son factores de transcripción, estando aún por determinar con precisión la naturaleza funcional de las proteínas LFY y UFO.

Una vez que se ha determinado la identidad floral del meristemo, deben especificarse de forma espacial y temporalmente correcta varias propiedades: el tipo, la disposición y el número de órganos, así como un crecimiento indeterminado y la elongación del entrenudo. Las mutaciones en los genes *LFY*, *AP1*, *AP2*, *APETALA3* (*AP3*), *PISTILLATA* (*PI*), *AGAMOUS* (*AG*), *FLORAL MORPHOGENESIS10* (*FLO10*, también denominado *SUPERMAN*), y *UFO* producen transformaciones homeóticas en las que al menos un tipo de órgano floral es reemplazado por otro. Cinco de estos genes, *AP2*, *AP3*, *PI*, *AG* (Bowman *et al.,* 1989) y *AP1* (Irish y Sussex, 1990) juegan un papel primario en este proceso, por lo que se les denomina genes de identidad de órgano floral. Por su parte, *FLO10* (Schultz *et al.,* 1991), *LFY* (Weigel *et al.,* 1992) y *UFO* (Levin y Meyerowitz, 1995) parecen regular la expresión de los cinco anteriores.

Se ha propuesto un modelo, ilustrado en la **Figura 15** (Bowman *et al.,* 1991), para el control de la identidad de los órganos de la flor de *Arabidopsis thaliana*, según el cual se clasifica a los genes en tres clases: genes de la clase A (*AP2* y *AP1*), que se precisan para la formación del periantio (los sépalos y pétalos), de la clase B (*PI* y *AP3*), para los pétalos y estambres, y de la clase C, a la que pertenece el gen *AG*, requerido para el desarrollo de los órganos reproductivos (los estambres y el pistilo). Este modelo es congruente con los resultados del análisis de combinaciones dobles y triples mutantes.

Los cinco genes de identidad de órgano han sido clonados (Yanofsky *et al.,* 1990; Jack *et al.,* 1992; Mandel *et al.,* 1992 Jofuku *et al.,* 1994; Goto y Meyerowitz, 1994; Levin y Meyerowitz, 1995), comprobándose que sus productos son factores de transcripción. Las secuencias de *AG*, *AP3*, *PI* y *AP1*, junto con las de *DEFICIENS* (*DEF*), *GLOBOSA* (*GLO*), *SQUAMOSA* (*SQUA*) y *PLENA* (*PLE*) de *Antirrhinum majus* (Sommer *et al.,* 1990; Huijser *et al.,* 1992; Tröbner *et al.,* 1992; Bradley *et al.,* 1993) muestran semejanza entre sí y con las de los genes de dos factores de transcripción previamente identificados, *MCM1* de levadura (Passmore *et al.,* 1988) y *SRF* de mamíferos (Norman *et al.,* 1988). La región de homología entre los productos de estos genes parece corresponder a los dominios de unión a ADN y de dimerización, y ha recibido la denominación de *MADS box* (*MCM1*, *AG*, *DEF*, *SRF*; Schwarz-Sommer *et al.,* 1990).

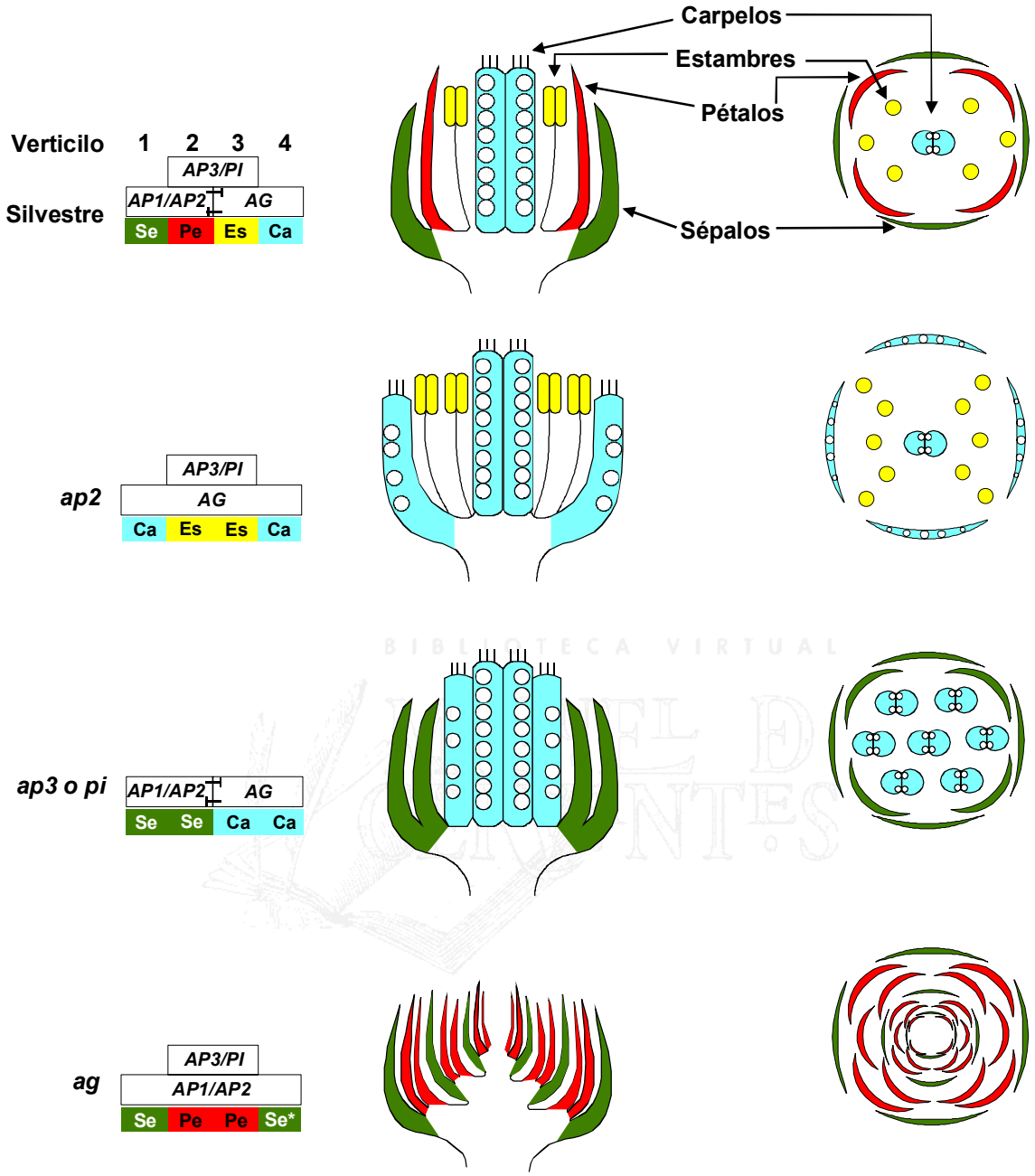


Figura 15.- Modelo para el control genético del tipo de órgano floral en *Arabidopsis thaliana.* Cada uno de los elementos rectangulares de los esquemas de la parte izquierda representa la identidad de un tipo de órgano floral (Se, sépalo; Pe, pétalo; Es, estambre; Ca, carpelo). Los rectángulos sin colorear delimitan los dominios de expresión de los genes de las clases A (*AP1* y *AP2*), B (*AP3* y *PI*) y C (*AG*). El símbolo ⊣ indica la inhibición recíproca entre los genes de las clases A y C. Los restantes esquemas representan secciones longitudinales (centro) y transversales (derecha) de la flor, usándose para cada órgano floral el mismo color distintivo que en los esquemas de la izquierda. Se representa el tipo silvestre, en la fila superior, y tres tipos de mutantes, con las funciones A, B o C alteradas, con indicación de los consiguientes cambios de identidad de los órganos florales. Los mutantes *ag* presentan flores adicionales en la posición que correspondería al cuarto verticilo, lo que se destaca con un asterisco. Reproducido, con pequeñas modificaciones, a partir de Coen y Meyerowitz, 1991.

Tabla 5.- Algunas mutaciones que alteran el desarrollo de la flor en *Arabidopsis thaliana*

Gen	Fenotipo mutante	Referencia
AGAMOUS (*AG*)	Transformación de los estambres en pétalos y del carpelo en sépalos, con aparición de una flor supernumeraria.	Bowman *et al.,* 1989.
APETALA1 (*AP1*)	Flores convertidas parcialmente en tallos inflorescentes. Transformación de los sépalos en estructuras semejantes a hojas y de los pétalos en estambres. Aparición de flores en las axilas de los sépalos.	Irish y Sussex, 1990; Mandel *et al*., 1992.
APETALA2 (*AP2*)	Los sépalos se transforman en carpelos u hojas y los pétalos en estambres.	Bowman *et al.,* 1989.
APETALA3 (*AP3*)	Transformación de los pétalos en sépalos y de los estambres en carpelos.	Bowman *et al.,* 1989.
CAULIFLOWER (*CAL*)	Transformación de los meristemos florales en inflorescencias, lo que causa una hiperplasia del meristemo, que adquiere aspecto de una coliflor. Este fenotipo se manifiesta únicamente en presencia de la mutación *ap1*.	Bowman *et al.,* 1993.
CLAVATA1 (*CLV1*) *CLAVATA3* (*CLV3*)	Tallo fasciado, filotaxia alterada y aumento en el número de órganos florales.	Leyser y Furner, 1992; Clark *et al.,* 1993.
FASCIATED1 (*FAS1*) *FASCIATED2* (*FAS2*)	Tallo fasciado y reducción en el número de órganos florales.	Leyser y Furner, 1992.
LEAFY (*LFY*)	Incremento en el número de hojas caulinares y el de meristemos laterales. Las flores se transforman en inflorescencias secundarias.	Schultz y Haughn, 1991; Huala y Sussex, 1992.
PERIANTHIA (*PAN*)	Transformación de flores tetraméricas en pentaméricas.	Running y Meyerowitz, 1996.
PINFORMED (*PIN*)	Terminación prematura del desarrollo del tallo y cambios en el número de órganos florales.	Goto *et al.,* 1991a.
PISTILLATA (*PI*)	Transformación de los pétalos en sépalos y de los estambres en carpelos.	Bowman *et al.,* 1989.
SUPERMAN (*SUP*)	Carpelos reemplazados por estambres.	Schultz *et al*., 1991.
TOUSLED (*TSL*)	Alteración de la forma de la hoja y de los órganos florales y disminución del número de éstos.	Roe *et al.,* 1994.
UNUSUAL FLORAL ORGANS (*UFO*)	Transformaciones variables en los órganos florales. Las flores se transforman en inflorescencias secundarias.	Levin y Meyerowitz, 1995; Hempel *et al*., 1997.

Otros aspectos de la morfología floral, como el número de los órganos florales o su disposición, son controlados por otros genes. Las mutaciones en *CLAVATA1* (Clark *et al.,* 1993), *CLAVATA2* (Haughn y Somerville, 1988), *PINFORMED* (Goto *et al.,* 1991a) y *PERIANTHIA* (*PAN*; Running y Meyerowitz, 1996) incrementan el número de órganos, mientras que los alelos mutantes de *FASCIATED1*, *FASCIATED2* (Leyser y Furner, 1992) y *TOUSLED* (*TSL*; Roe *et al.,* 1994) lo disminuyen. Los genes *LFY* y *AP1* parecen

ser responsables de la organización de los órganos florales en verticilos, manifiestamente distinta de la filotaxia espiral de la roseta o la inflorescencia: los alelos mutantes *ap1* y *lfy* más fuertes causan fenotipos caracterizados por la disposición espiral de los órganos florales (Schultz y Haughn, 1991; Huala y Sussex, 1992; Weigel *et al.,* 1992).

I.6.7.- Fotomorfogénesis

Las plantas carecen de movilidad, por lo que han desarrollado mecanismos de respuesta y adaptación a diferentes variables ambientales, entre los que se cuenta la modulación de sus procesos de desarrollo. La luz es uno de los factores ambientales que más poderosamente influyen en el desarrollo vegetal, no sólo porque es parte del proceso de la fotosíntesis, sino porque sirve de estímulo para procesos de desarrollo como la biogénesis de los cloroplastos, la diferenciación del meristemo foliar y la inducción floral. El conjunto de estos procesos dependientes de la luz se denomina fotomorfogénesis (Chory, 1993).

Las respuestas a la luz son mediadas por varias clases de fotorreceptores, el más estudiado de los cuales es el fitocromo (Quail, 1991; Chory *et al*., 1995), una cromoproteína que puede experimentar una fotoconversión reversible, entre dos formas bioquímica y espectralmente diferentes: la que absorbe luz en el rojo lejano o Pfr y la que absorbe en el rojo o Pr. La forma activa, Pfr, es inactivada a Pr mediante un pulso de luz de una longitud de onda correspondiente al rojo lejano (Quail, 1991). En *Arabidopsis thaliana* existen al menos cinco genes que codifican para fitocromos, conocidos como *PHYA* a *PHYE* (Chory *et al*., 1995).

El modo en que la luz regula el desarrollo vegetal se ilustra comparando la morfología de las plantas cultivadas en presencia de luz y en la oscuridad. Estas últimas, también llamadas etioladas (*etiolated*), presentan un hipocotilo alargado, cotiledones pequeños y plegados y etioplastos (Chory, 1993). Se han obtenido en *Arabidopsis thaliana* numerosos mutantes afectados en la fotomorfogénesis (Figura 16), que pueden ser clasificados en dos grandes clases, según que su respuesta a la luz sea reducida o constitutiva. El primero de estos grupos comprende mutantes que no manifiestan la inhibición de la elongación del hipocotilo que se observa en presencia de la luz en el tipo silvestre. Entre ellos cabe citar los mutantes *long hypocotyl* (*hy1*, *hy2*, *hy3*, *hy4*, *hy5*, *hy6* y *hy8*), que parecen estar alterados en diferentes aspectos de la actividad del fitocromo. Así, mientras que *hy1*, *hy2* y *hy6* son mutaciones en genes relacionados con la síntesis o la disponibilidad del cromóforo (Chory *et al*., 1989a), *hy3*,

también conocido como *phytochrome B* (*phyB*), afecta al gen del fitocromo B (Reed *et al*., 1993), *hy8* (*phyA*) al del fitocromo A (Dehesh *et al*., 1993), *hy4* a un gen que codifica para un presunto receptor de luz azul (Ahmad y Cashmore, 1993) y *hy5* a las respuestas a la luz ultravioleta, azul o roja (Chory, 1992).

El segundo grupo de mutantes fotomorfogenéticos presenta alteraciones en su desarrollo en la oscuridad. Pertenecen a este grupo mutantes como los *de-etiolated* (*det1, det2* y *det3*; Chory *et al*., 1989b; 1991; Cabrera y Poch *et al*., 1993), *constitutively photomorphogenic* (*cop*; Deng *et al*., 1991; Wei y Deng, 1992; Hou *et al*., 1993; Wei *et al*., 1994) y *fusca* (*fus*; Castle y Meinke, 1994; Miséra *et al*., 1994). Los estudios de interacciones entre alelos de este grupo y las mutaciones *long hypocotyl* indican que los productos de los genes *DET*, *COP* y *FUS* actúan después de los fotorreceptores en la cadena de transducción de las señales fotomorfogenéticas (Chory, 1992). Se ha propuesto un modelo en el que los productos de los genes *DET* y *COP* actuarían como reguladores negativos, integrando las señales luminosas recibidas por los fotorreceptores con los programas de fotomorfogénesis (Chory, 1992).

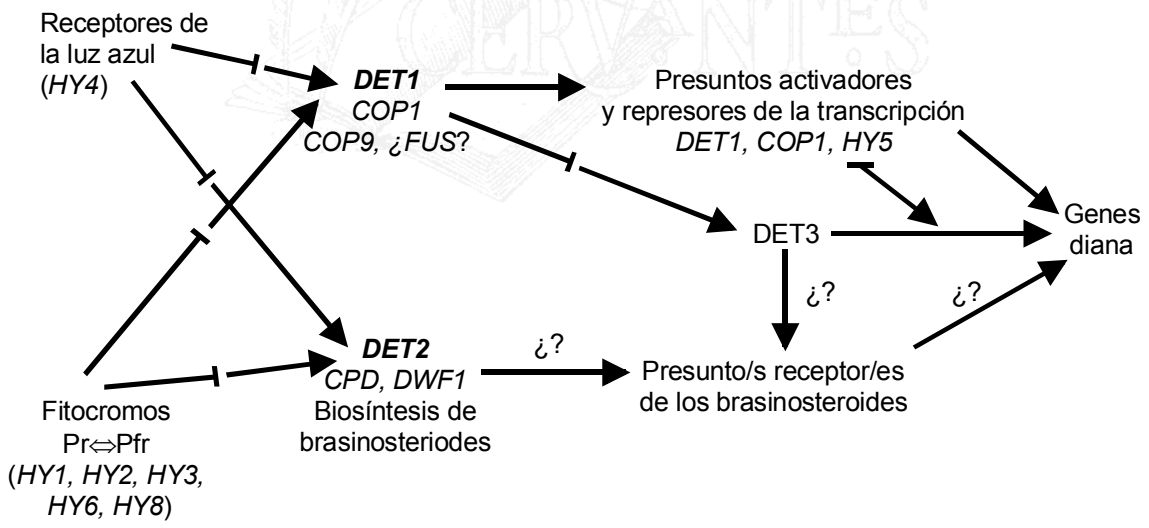


Figura 16.- Modelo sobre el papel de los genes *DET1* y *DET2*. El modelo propone que los genes *DET1*, *COP1* y *COP9* son reguladores negativos de la desetiolación, y que su actividad es reducida por las señales luminosas que activan a los fitocromos (Pr→Pfr) y/o a los receptores de la luz azul, como HY4. Las flechas interrumpidas indican regulación negativa. Tomado de Szekeres *et al*., 1996, quienes a su vez lo hacen, con modificaciones, de Chory y Susek, 1994.

Algunos de estos genes han sido clonados y se ha podido inferir la naturaleza funcional de su producto proteico. Así, tanto DET1 (Pepper *et al*., 1994) como COP1 (Deng *et al*., 1992) parecen ser factores de transcripción. Sin embargo, la secuencia de *DET2* (Li *et al*., 1996) indica que codifica para una reductasa implicada en la síntesis de brasinosteroides, un importante grupo de fitohormonas (Mitchell *et al*., 1970; Grove *et al*., 1979) implicadas en numerosos procesos como la expresión de genes fotosintéticos regulados por luz, la promoción de la elongación celular, la senescencia foliar y la inducción floral. Estas hormonas parecen estar relacionadas también con otros mutantes, que muestran un fenotipo similar al de *det2*, como *constitutive photomorphogenesis dwarf* (*cpd;* Szekeres *et al.*, 1996). En efecto, el fenotipo de *cpd*, al igual que el de *det2*, es normalizado por la adición de brasinosteroides, habiéndose determinado que el producto del gen *CPD* es un citocromo P450 (CYP90) con cierta homología con las hidroxilasas de esteroides (Szekeres *et al.*, 1996). Otro tanto puede afirmarse de los mutantes *cabbage* (*cbb;* Kauschmann *et al*., 1996), entre los que cabe destacar *cbb1*, alélico de *dwarf1*, (*dwf1*; Feldman *et al*., 1989) y de *diminuto* (*dim*; Takahashi *et al*., 1995), mientras que *cbb3* es alélico de *cpd*. Los fenotipos mutantes de *cbb1* y *cbb3* también se normalizan mediante la adición de brasinosteroides, por lo que se ha propuesto que están afectados en la síntesis de estas hormonas. Por el contrario, el mutante *cbb2*, al igual que otro semejante, *brassinosteroid insensitive* (*bri1*; Clouse *et al*., 1995) no modifica su fenotipo por la adición de brasinosteroides, suponiéndose que los genes afectados desempeñan algún papel en la percepción o en la transducción de las señales de estas hormonas (Kauschmann *et al*., 1996).

II.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Los mecanismos de control de la organogénesis y la formación de patrones permanecen aún por esclarecer en muchos sistemas biológicos, entre ellos las plantas. Aunque los avances en los últimos quince años han sido espectaculares, puede afirmarse que hoy, tras varias décadas de Genética del desarrollo, y a pesar de la revolución conceptual que la Biología molecular ha supuesto, permanecen sin responder satisfactoriamente dos importantes preguntas: En primer lugar, ¿cómo se definen las posiciones en que cada órgano o estructura, o cada una de sus partes, ha de diferenciarse? En otras palabras, ¿qué mecanismos genéticos subyacen en el establecimiento de la información posicional en un organismo en desarrollo? La segunda de estas preguntas es ¿cuáles son, y cómo operan, los elementos implicados en la comunicación entre células durante el desarrollo? Esto es, ¿cuáles son los genes cuyos productos hacen posible la coordinación entre células en proliferación, necesaria para construir un tejido adulto de gran número de células y de una topología altamente repetible de un individuo a otro de la misma especie, todo ello a partir de un primordio indiferenciado y de bajo número de células? Sólo en *Drosophila melanogaster* se dispone de respuestas parciales a estas preguntas.

La formación de los órganos del cuerpo de un animal ocurre fundamentalmente durante su desarrollo embrionario, o durante éste y el desarrollo larvario en las especies con metamorfosis. Sin embargo, la organogénesis no está restringida en las plantas al desarrollo temprano, llevándose a cabo durante todo su ciclo de vida, en el que nunca se observa migración celular (Meyerowitz, 1994c). En consecuencia, los procesos morfogenéticos en plantas no pueden explicarse, como ocurre en animales, en base a la información posicional establecida por la acción de genes maternos o a la migración de células durante el desarrollo. La comprensión de estos fenómenos es hoy mucho más incompleta en plantas que en animales. En efecto, se desconocen cuáles son los mecanismos por los que las células meristemáticas en un primordio perciben e interpretan su posición con respecto a otras células, para diferenciarse en órganos con reproducibilidad y precisión (Sachs, 1991; Fosket, 1994; Meyerowitz, 1994a; Ramachandran *et al.*, 1994). El objetivo del proyecto de investigación del que forma parte esta Tesis es abordar el estudio de una de las facetas del desarrollo de las plantas, con el fin de contribuir a la comprensión de los mecanismos genéticos responsables de la formación de órganos y patrones en los seres vivos.

A lo largo de la evolución se ha generado una gran variedad en las formas y los tamaños de las hojas en las plantas. De hecho, la forma de la hoja constituye un criterio

taxonómico, que ya fue empleado a mediados del siglo XVIII por Linneo (Figura 17), dado que existe una enorme diversidad de morfologías foliares específicas de especie. Sin embargo, y aunque han pasado casi 250 años desde la publicación de la *Philosophia botanica*, se dispone de muy poca información acerca de las operaciones genéticas que controlan el crecimiento y la morfogénesis de las hojas. Puede afirmarse que la pregunta de cómo es construida una hoja sigue en lo fundamental sin responder.

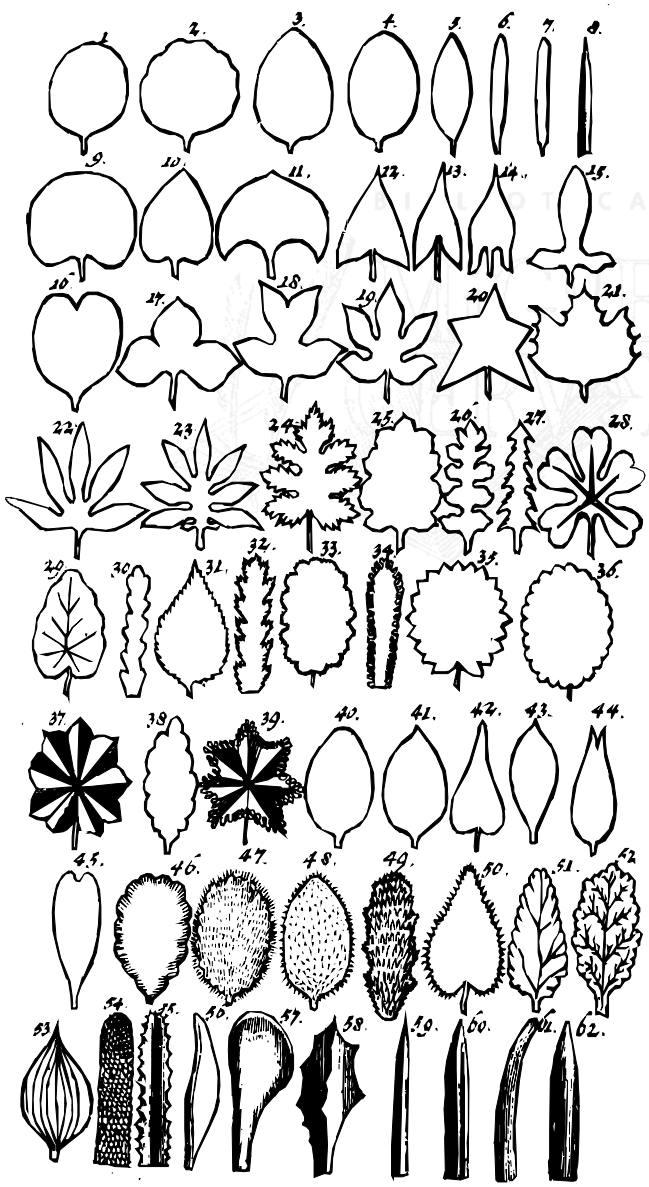


Figura 17.- Tipos de hojas simples recogidos en la *Philosophia botanica* de Carolus Linnaeus. Los números en la Figura se corresponden con los tipos siguientes: 1, *Orbiculatum*; 2, *Subrotundum*; 3, *Ovatum*; 4, *Ovale s. Ellipticum*; 5, *Oblongum*; 6, *Lanceolatum*; 7, *Lineare*; 8, *Subulatum*; 9, *Reniforme*: 10, *Cordatum*; 11, *Lunulatum*; 12, *Triangulare*; 13, *Sagittatum*; 14, *Cordato-sagitattum*; 15, *Hastatum*; 16, *Fissum*; 17, *Trilobum*; 18, *Praemorsum*; 19, *Lobatum*; 20, *Quinquangulare*; 21, *Erosum*; 22, *Palmatum*; 23, *Pinnatifidum*; 24, *Laciniatum*; 25, *Sinuatum*; 26, *Dentato-sinuatum*; 27, *Restrorsum sinuatum*; 28, *Partitum*; 29, *Repandum*; 30, *Dentatum*; 31, *Serratum*; 32, *Duplicato-serratum*: 33, *Duplicato-crenatum*; 34, *Cartilagineum*: 35, *Acute crenatum*; 36, *Obtuse crenatum*; 37, *Plicatum*; 38, *Crenatum*; 39, *Crispum*; 40, *Obtusum*; 41, *Acutum*; 42, *Acuminatum*; 43, *Obtusum acumine*; 44, *Emarginatum acute*; 45, *Cuneiforme emarginatum*; 46, *Retusum*; 47, *Pilosum*; 48, *Tomentosum*; 49, *Hispidum*; 50, *Ciliatum*; 51, *Rugosum*; 52, *Venosum*; 53, *Nervosum*; 54, *Papillosum*; 55, *Linguiforme*; 56, *Acinaciforme*; 57, *Dolabriforme*; 58, *Deltoides*; 59, *Triquetrum*; 60, *Canaliculatum*; 61, *Sulcatum*; 62, *Teres*. Reproducido de Stearn, 1995, quien lo hace a su vez del original de 1751.

A fin de llevar a cabo una disección genética del desarrollo de la hoja en *Arabidopsis thaliana*, se requiere, en primer lugar, la obtención y el análisis de mutantes con alteraciones en la morfología de dicho órgano. Tal como se ha comentado en otros apartados de esta Tesis, autores anteriores han aislado numerosos mutantes con hojas anormales, tanto en *Arabidopsis* como en otras plantas, de los que sólo algunos han sido objeto de un estudio detallado, que no ha conducido en ningún caso a la caracterización molecular de genes implicados en el control del desarrollo de la hoja. Nuestra intención es obtener el máximo número posible de mutantes con hojas anormales, para (a) definir el espectro de posibles anormalidades en la morfogénesis de la hoja, (b) determinar el número de genes diferentes cuyas mutaciones perturban el proceso, (c) elegir aquéllos cuyo fenotipo y/o interacciones genéticas con otros sugieran que participan en el control del desarrollo de la hoja, sin prestar, de momento, mayor atención a los que parezcan corresponder a funciones no relacionadas con el desarrollo, y (d) proceder a la caracterización estructural y funcional de alguno de ellos. Pretendemos formular un modelo para el desarrollo de la hoja en *Arabidopsis*, basado en la contrastación de los resultados del análisis genético y el molecular de los genes identificados mediante el estudio de estos mutantes.

La hoja es un órgano que cumple funciones capitales de contribución al desarrollo y a la supervivencia de cualquier planta (Fosket, 1994). Sin embargo, es muy escasa la información disponible sobre los genes que controlan su ontogenia (Hake y Sinha, 1991; Smith y Hake, 1992; Sinha *et al*., 1993; Telfer y Poethig, 1994; Tsukaya, 1995; Sylvester *et al*., 1996; Hall y Langdale, 1996; Poethig, 1997; Brutnell y Langdale, 1998; van Lijsebettens y Clarke, 1998). En *Arabidopsis thaliana*, y en otras especies vegetales, se conocen algunos genes cuyas mutaciones causan alteraciones del desarrollo foliar (véanse los apartados I.6.3 y I.6.4 de la Introducción). Existe también un gran número de estirpes mutantes no caracterizadas genéticamente, que presentan alteraciones en la morfología de sus hojas, así como en la disposición de éstas en el tallo (Relichova, 1976; Kranz, 1978; Kranz y Kirchheim, 1987; 1990; Anderson, 1993; Varios autores, 1995). Se dispone asimismo de colecciones de estirpes silvestres o ecotipos, procedentes de distintos hábitats en diferentes puntos del planeta, que han recibido muy poca atención experimental (Röbbelen, 1965; Kirchheim y Kranz, 1981; Kranz y Kirchheim, 1987; 1990; Anderson, 1993; Varios autores, 1995).

En el momento en que se inició esta Tesis, en 1993, no se había llevado a cabo ningún intento de identificación del máximo número posible de los genes que participan en el control de la morfogénesis de la hoja, ni mediante la realización de una

mutagénesis de saturación, ni mediante el análisis del vasto catálogo de mutantes preexistentes y no estudiados, ni aprovechando el amplio espectro de variantes naturales depositadas en los centros de recursos de *Arabidopsis thaliana*.

Aunque la disección genética de un aspecto cualquiera del desarrollo en un organismo pluricelular se fundamenta en la inducción y aislamiento de mutantes que manifiesten perturbaciones en el proceso a estudio, una etapa previa obligada es la descripción detallada de tal proceso en los individuos silvestres, que constituirán el canon a partir del cual se podrá definir la naturaleza y la magnitud de la anormalidad de los mutantes. Una parte del trabajo inicialmente proyectado para esta Tesis consistía en la caracterización de algunos parámetros del desarrollo normal de la hoja en *Arabidopsis thaliana*, cuyo conocimiento debería permitirnos determinar con precisión la naturaleza de las anormalidades de los mutantes y de la variabilidad de los ecotipos.

El análisis genético de la variabilidad natural de determinados caracteres entre ecotipos ha permitido establecer en algunos casos que obedecían a controles monogénicos, lo que ha hecho posible la identificación y caracterización de los correspondientes genes. Recientemente se ha aprovechado la variabilidad natural que manifiestan los diferentes ecotipos de *Arabidopsis thaliana* para obtener información acerca de la naturaleza de los genes que controlan algunos procesos. Así, Grbic y Bleecker (1996) constataron la existencia de diferencias muy claras entre los ecotipos Landsberg *erecta* (L*er*) y Sy-0 en lo relativo, entre otros rasgos, al tiempo de floración y a la formación de rosetas aéreas. Pudieron identificar los genes *AERIAL ROSETTE* (*ART*) y *ENHANCER OF AERIAL ROSETTE* (*EAR*), responsables de las diferencias anteriormente citadas, tras estudiar la segregación de dichos rasgos en la F_2 de cruzamientos entre L*er* y Sy-0. El locus *FLOWERING ALTERED* (*FLA*) ha sido identificado también tras la comprobación de la naturaleza monogénica de la diferencia en el tiempo de la floración entre las estirpes silvestres Sf-2 y Columbia (Lee *et al.,* 1993). Merece también comentario la utilidad de los ecotipos para la identificación de genes que controlan rasgos cuantitativos (*quantitative trait loci*; QTL), tal como se ha podido comprobar para los loci *ROSETTE LEAF NUMBER* (*RLN-1* a *RLN-5*), implicados en el control del tiempo de floración e identificados tras la comparación de los ecotipos H51 y L*er* (Clarke *et al.,* 1995).

Autores anteriores han aislado numerosas estirpes silvestres (ecotipos) de *Arabidopsis thaliana*, actualmente depositadas en el Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre (NASC), la inmensa mayoría de las cuales no han sido estudiadas con anterioridad. El estudio comparativo de estos ecotipos puede proporcionar información

acerca de la variabilidad natural en la morfología de la hoja, reflejo de los cambios ocurridos en el genotipo de cada uno de ellos en su reciente historia evolutiva. La disponibilidad de tales ecotipos nos ha llevado a proponernos el estudio de una amplia muestra de ellos.

Una de las más vastas colecciones de mutantes de *Arabidopsis thaliana* es la denominada *Arabidopsis* Information Service Form Mutants, actualmente depositada en el NASC. Esta colección de mutantes morfológicos fue iniciada en Göttingen (Alemania), en el laboratorio de G. Röbbelen, en 1964, siendo completada en el de A.R. Kranz, en Frankfurt (Alemania), a partir de 1980. En el único artículo publicado sobre esta colección (Bürger, 1971), se indica que la mayoría de ellos habían sido obtenidos mediante tratamiento con mutágenos químicos, aunque sin especificar la naturaleza molecular de la sustancia empleada. Adicionalmente, se clasificaba a los mutantes morfológicos en seis grandes grupos, en función de que manifestasen alteraciones: (a) en la estructura de la plántula; (b) en la estructura de la roseta, incluyendo plantas enanas, de roseta compacta, con hojas asimétricas (con el fenotipo denominado Asymmetric leaves), redondeadas y de otras formas distintas de la silvestre; (c) en el aspecto de la hoja, que adquiere forma de cuchara, presenta curvatura del margen hacia el haz, el limbo arrugado, es estrecha, ancha o dentada, manifiesta alteraciones en la forma de los tricomas o carece completamente de ellos (hojas glabras); (d) en la estructura o el porte de la inflorescencia, grupo en el que se incluyen, entre otras, las inflorescencias cortas y densas, con ramificación anormal, enmarañadas, con tallos brillantes, y las arbustivas; (e) en la morfología de las flores; y (f) en el color de la semilla. En el artículo de Bürger no se aporta, sin embargo, información acerca de las condiciones de cultivo bajo las cuales se obtuvieron los fenotipos que se describen. El estudio de esta amplia colección de mutantes es otro objetivo de esta Tesis, con el fin de establecer la penetrancia, la expresividad, la eventual naturaleza monogénica y el modo de herencia de los fenotipos mutantes. Otra parte importante de este trabajo es el análisis de complementación de los mutantes, para definir relaciones de alelismo y preparar la obtención de dobles mutantes, para determinar la eventual existencia de interacciones génicas.

III.- MATERIALES Y METODOS

III.1.- Cultivos

III.1.1.- Condiciones de cultivo de *Arabidopsis thaliana*

Los cultivos de *Arabidopsis thaliana* se realizaron a partir de semillas que habían sido previamente conservadas a 4°C durante al menos una semana. Se llevaron a cabo cultivos en caja de Petri y en maceta.

III.1.1.1.- Cultivo de *Arabidopsis thaliana* en caja de Petri

La mayoría de los cultivos fueron iniciados en cajas de Petri de 15 cm de diámetro, que contenían medio sólido GM o ATM (véase el apartado III.6.2, en la página 78). El vertido del medio de cultivo en cajas de Petri se efectuó en una cabina de flujo laminar horizontal. La siembra de las semillas de *Arabidopsis thaliana* se llevó a cabo tras su esterilización por inmersión con agitación, durante 8 min, en una disolución del 40% de lejía comercial (NaClO al 4-5% m/v) y 3 μl/ml de una disolución del 1% de Triton X-100, y realizando a continuación tres lavados sucesivos con agua estéril.

La siembra en cajas de Petri se realizó con material estéril, en una cabina de flujo laminar horizontal. Se sembraron habitualmente unas 100 semillas por caja de Petri. La inoculación se hizo con la ayuda de una pipeta Pasteur, tomando semillas en suspensión acuosa y depositándolas de una en una sobre la superficie del medio de cultivo, en las posiciones indicadas por una retícula dibujada en un papel dispuesto bajo la caja de Petri. Una vez inoculadas, las cajas de Petri fueron precintadas con esparadrapo quirúrgico Micropore Scotch 3M, que constituye una barrera efectiva para cualquier partícula pero no impide el intercambio de gases con el exterior.

Las cajas de Petri recién inoculadas con semillas se mantuvieron a 4°C en ausencia de luz, durante 24 h, a fin de sincronizar la germinación, tras lo cual fueron incubadas a 20±1°C y 60-70% de humedad relativa, bajo iluminación continua de unos 7.000 lux de luz blanca, suministrada por tubos fluorescentes Sylvania Standard F20W/133-RS Cool White (en cámaras de cultivo Conviron TC16) y Sylvania 160W F72T12 CW VHO Cool White o Philips F72TI2/D/VHO 160 w 1500 SF (en una Conviron TC30). El flujo de aire en estas cámaras de cultivo es permanentemente ascendente, lo que impide la condensación de agua en el interior de la tapa de las cajas de Petri.

Pasadas dos semanas desde la siembra, el crecimiento de las plantas es tal que se aprecia a simple vista la arquitectura de la roseta y de sus hojas vegetativas, lo que permite distinguir sin dificultad a los mutantes en base a sus diferencias morfológicas

con los individuos silvestres. Las plantas de interés, cuyo cultivo se había iniciado mediante siembra en caja de Petri, fueron posteriormente transplantadas a maceta, en donde completaron su ciclo de vida en las condiciones que se detallan en el apartado siguiente.

Algunos cultivos en caja de Petri fueron realizados en ausencia de luz. Para ello, las cajas de Petri fueron envueltas con papel de aluminio, tras haber sido sembradas y mantenidas a 4°C durante 24 h. Después de 8 días de incubación en las condiciones de cultivo habituales, se retiró el envoltorio de papel de aluminio y se procedió a la observación de las plantas.

III.1.1.2.- Cultivo de *Arabidopsis thaliana* en maceta

Los cultivos en maceta se efectuaron en bandejas de plástico de 28 x 50 cm, con 42 alvéolos, cada uno de ellos de 5 x 5 cm (diámetro x altura), introducidas en cubetas de unos 7 cm de profundidad. Se empleó como sustrato una mezcla equivolumétrica de perlita (granulometría de 1 a 3 mm; 105-125 kg/m^3), vermiculita (granulometría de 0 a 3 mm; 80-100 kg/m^3) y turba no fertilizada (turba rubia de musgo *Sphagnum*, de estructura gruesa, Grobmull Neuhaus), previamente esterilizada en autoclave, durante 20 min a 121°C. En algunos casos se emplearon los tres componentes mencionados en una proporción volumétrica 2:2:1, con iguales resultados. Las bandejas de alvéolos estuvieron permanentemente subirrigadas, manteniéndose un nivel de unos 2-3 cm de agua en el fondo de las cubetas. El aporte de nutrientes se llevó a cabo una vez por semana, mediante la adición de una cantidad saturante de medio mínimo ATM al agua de subirrigación.

Los cultivos en maceta se mantuvieron en una cámara climatizada, a 20±1°C y 60-70% de humedad relativa, bajo iluminación continua, con luz blanca suministrada por tubos fluorescentes Sylvania 160 w F72T12 CW VHO Cool White o Philips F72TI2/D/VHO 160 w 1500 SF, y la aportación adicional de luz roja por bombillas incandescentes de 60 w, totalizando 7.000 lux. A partir del momento en que la floración se interrumpe, no apareciendo más flores, se deja de añadir agua y nutrientes, por lo que la planta se seca, siendo mantenida en la cámara de cultivo unas dos semanas más, hasta la recolección de sus semillas.

Cada alvéolo se destinó al cultivo de una sola planta, que en la mayoría de los casos había sido transplantada desde la caja de Petri en la que permaneció durante las primeras semanas de su ciclo de vida. Sólo en algunas ocasiones se sembraron semillas sobre el sustrato de cultivo en maceta, no requiriéndose su esterilización previa.

Se introdujo en cada alvéolo, previamente a su llenado con el sustrato, una maceta de rejilla de 5 x 5 cm (diámetro x altura). Las macetas de rejilla impiden que el sustrato se adhiera al alvéolo, facilitando la extracción de las plantas para la realización de cruzamientos o la recolección de semillas. Para impedir el contacto entre plantas adyacentes, se las aisló con cilindros de plástico transparente, denominados aracones (*aracons*; Beta Tech).

III.1.2.- Cruzamientos y recolección de semillas

Para realizar un cruzamiento entre dos estirpes de *Arabidopsis thaliana*, se utiliza una de ellas como donante y la otra como receptora de polen (parentales masculino, **m**, y femenino, **f**, respectivamente). Según el procedimiento descrito por Kranz y Kirchheim (1987), se elige un grupo de capullos florales, en el ápice de un tallo inflorescente de la planta que se usará como parental femenino, eliminando todas las flores maduras, presuntamente autofecundadas, así como todos los capullos, salvo aquéllos cuyos pétalos sean apenas visibles. A estos últimos se les extirpan los sépalos, los pétalos y los estambres inmaduros, obteniendo de este modo flores cuya única estructura funcional es un pistilo no fecundado. Estas manipulaciones se realizan con unas pinzas de microcirugía (Aesculap BD331) previamente esterilizadas por inmersión en etanol del 95% y secadas al aire, para destruir cualquier traza de polen contaminante que pudieran contener. De la planta que se utilizará como donante de polen se extirpa una flor madura, que presente los pétalos abiertos y estambres en cuyas anteras sean visibles los granos de polen. Presionándola con las pinzas a la altura de los sépalos, se ponen en contacto varias de sus anteras, una por una, con el pistilo de la flor receptora del polen. El cruce se señaliza adhiriendo al tallo, junto a la flor fecundada manualmente, una etiqueta en la que se indica el genotipo del parental masculino empleado para la polinización. Finalmente, la planta que ha sido fecundada por este procedimiento es devuelta a la cámara de cultivo, en la que permanecerá hasta que se forme y madure la silicua, que será recogida y depositada en un tubo *eppendorf* adecuadamente etiquetado.

Para la recolección de las semillas contenidas en la totalidad de las silicuas de una planta, producto de su autofecundación, se procede a presionar con ambas manos una planta seca, empleando para ello guantes desechables, sobre un papel de filtro, en el que caen las semillas. La mezcla de semillas, fragmentos de silicuas y otras partes secas de la planta, que se acumula sobre el papel de filtro, ha de ser cribada a través de

un colador adecuado, a fin de eliminar en lo posible todas las partículas de tamaño mayor al de las semillas.

III.1.3.- Conservación de estirpes

Las semillas de las estirpes silvestres y mutantes se almacenaron en tubos *eppendorf* convenientemente rotulados, que se conservaron a 4°C.

III.1.4.- Control y erradicación de plagas

El control de los parásitos habituales en cámaras de cultivo de plantas se llevó a cabo siguiendo las indicaciones que pueden encontrarse en el apartado de *Chemical control of pests and diseases* del servidor de WWW del NASC (http://nasc.nott.ac.uk).

Se empleó Biokill (Permetrina al 0,25% m/v; Zelnova), como aerosol insecticida de amplio espectro, siempre que se consideró necesario, en intervalos semanales. Ante la aparición de algunos parásitos concretos, se hizo uso de sustancias específicas. Así, se empleó Mesurol (*Methocarb*, Bayer; 2 g/l en el agua de riego), para el exterminio de trips (*thrips*, insectos del orden de los Tisanópteros). También, Basudin EW (Diazinon al 60% m/v, Ciba-Geigy), a razón de 2,5 ml por cada 5 l de agua de riego, para la erradicación de esciáridos (*mushroom flies*, insectos del orden de los Dípteros).

III.2.- Nomenclatura para la denominación de genes, mutaciones y fenotipos

La nomenclatura que se aplica en esta memoria a genes, mutaciones y fenotipos se atiene estrictamente a las pautas propuestas por D. Meinke (Meinke y Koornneeff, 1997), cuya versión más reciente puede encontrarse en http://mutant.lse.okstate.edu/genepage/namerule.html. Los alelos de un gen se indican con abreviaturas de tres letras en cursiva, empleándose las mayúsculas para el silvestre y las minúsculas para los mutantes. Los fenotipos mutantes se denotan con abreviaturas de tres letras, la primera de ellas mayúscula, en tipografía normal. Si existen diferentes genes que han recibido la misma denominación, se les distingue añadiendo un número al grupo de tres letras que les denota. Los diferentes alelos mutantes de un gen reciben un distintivo numérico, separado por un guión del identificador del gen.

Puede citarse, como ejemplo de lo comentado en el párrafo anterior, que uno de los grupos de mutantes estudiados en esta Tesis presenta el fenotipo Incurvata (Icu), habiéndose definido, mediante análisis de complementación, varios genes *INCURVATA*, (*ICU*) uno de los cuales es *ICU1*, del que se han descrito varios alelos mutantes, numerados de *icu1-1* a *icu1-8*.

III.3.- Estirpes utilizadas en este trabajo

En esta Tesis se han sometido a estudio 193 diferentes estirpes silvestres (ecotipos) y 167 mutantes de *Arabidopsis thaliana*, cedidas por el Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre (NASC), así como otras 6 estirpes mutantes cedidas por el *Arabidopsis* Biological Resource Center (ABRC). Se indica más adelante la notación empleada a lo largo de esta memoria para identificarlas, que se corresponde, salvo cuando se indique lo contrario, con la del NASC.

III.3.1.- Ecotipos

Los ecotipos empleados en este trabajo se enumeran en la Tabla 6. Proceden de muy diferentes partes del planeta, tal como se indica en la página 7. Forman parte de la colección del *Arabidopsis* Information Service, que tiene su origen en las estirpes silvestres de *Arabidopsis thaliana* recolectadas por F. Laibach desde principios de siglo y que era conocida como "la colección estándar de razas naturales de Laibach". Dicha colección fue mantenida posteriormente por G. Röbbelen en el Instituto de Agronomía y Cultivos Vegetales de Göttigen, Alemania, en donde fue progresivamente ampliada mediante donaciones de otros investigadores (Röbbelen, 1965). Su custodia y mantenimiento fueron realizados a partir de 1975 por A.R. Kranz en el Botanical Institute de la Universidad Johann Wolfgang Goethe de Frankfurt, Alemania (Kranz, 1976), estando actualmente depositada, además de en otros centros, en el NASC, de donde hemos obtenido las correspondientes semillas.

III.3.2.- Estirpes mutantes

Las estirpes mutantes estudiadas en este trabajo pueden agruparse en dos bloques. El primero de ellos comprende 11 mutantes con alteraciones en la morfología de la hoja (véase la Tabla 7), seis de los cuales fueron aislados por Rédei y están depositados en el ABRC, mientras que los restantes cinco se hallan en el NASC. La gran mayoría de los mutantes estudiados en esta Tesis, un total de 162, pertenecen a la colección denominada *Arabidopsis* Information Service Collection, que se creó a partir de diferentes experimentos de mutagénesis y selección de fenotipos caracterizados por

Tabla 6.- Ecotipos de *Arabidopsis thaliana* utilizados en este trabajo

L*er* (NW20)	Aa-0 (N900)	Ag-0 (N901)	Cvi-0 (N902)	Kas-1 (N903)
Mh-0 (N904)	Ms-0 (N905)	C24 (N906)	Col-2 (N907)	Col-3 (N908)
Dijon-G (N910)	Estland (N911)	RLD1 (N913)	S96 (N914)	Ws (N915)
Condara (N916)	Da (1)-12 (N917)	Dijon-M (N919)	Enk-D (N920)	Enkheim-T (N921)
Hodja-Obi-	H55 (N923)	Je54 (N924)	Petergof (N926)	Rubez-1 (N927)
Shadara (N928)	Sn(5)-1 (N930)	Sorbo (N931)	Abd-0 (N932)	Col-4 (N933)
Aa-0 (N934)	Ag-0 (N936)	Ak-1 (N938)	An-1 (N944)	An-2 (N946)
Ang-0 (N948)	Ang-1 (N950)	Bay-0 (N954)	Bch-1 (N956)	Bch-3 (N958)
Bch-4 (N960)	Bd-0 (N962)	Be-0 (N964)	Be-1 (N966)	Bl-1 (N968)
Bla-1 (N970)	Bla-2 (N972)	Bla-3 (N974)	Bla-4 (N976)	Bla-6 (N980)
Bla-10 (N982)	Bla-11 (N984)	Bla-12 (N986)	Bla-14 (N988)	Bs-1 (N996)
Bs-2 (N998)	Bs-5 (N1000)	Bsch-0 (N1002)	Bsch-2 (N1004)	Bu-0 (N1006)
Bu-2 (N1008)	Bu-3 (N1010)	Bu-4 (N1012)	Bu-5 (N1014)	Bu-6 (N1016)
Bu-7 (N1018)	Bu-8 (N1020)	Bu-9 (N1022)	Bu-11 (N1024)	Bu-13 (N1026)
Bu-14 (N1032)	Bu-15 (N1034)	Bu-17 (N1036)	Bu-18 (N1038)	Bu-19 (N1040)
Bu-20 (N1042)	Bu-22 (N1046)	Bu-23 (N1048)	Bu-24 (N1050)	Bu-25 (N1052)
Bur-0 (N1028)	Ca-0 (N1060)	Cal-0 (N1062)	Cen-0 (N1066)	Chi-0 (N1072)
Chi-1 (N1074)	Chi-2 (N1076)	Cl-0 (N1082)	Co-1 (N1084)	Co-2 (N1086)
Co-3 (N1088)	Co-4 (N1090)	Col-0 (N1092)	Ct-1 (N1094)	Cvi-0 (N1096)
Da-0 (N1098)	Db-0 (N1100)	Db-1 (N1102)	Db-2 (N1104)	Di-0 (N1106)
Di-1 (N1108)	Di-2 (N1110)	Do-0 (N1112)	Dr-0 (N1114)	Dra-0 (N1116)
Dra-1 (N1118)	Dra-2 (N1120)	Edi-0 (N1122)	Ei-2 (N1124)	Ei-4 (N1126)
Ei-6 (N1130)	Eil-0 (N1132)	El-0 (N1134)	En-1 (N1136)	En-2 (N1138)
Ep-0 (N1140)	Er-0 (N1142)	Es-0 (N1144)	Est-0 (N1148)	Est-1 (N1150)
Fe-1 (N1154)	Fi-0 (N1156)	Fi-1 (N1158)	Fr-2 (N1168)	Fr-3 (N1170)
Fr-4 (N1172)	Fr-5 (N1174)	Fr-6 (N1176)	Fr-7 (N1178)	Ga-0 (N1180)
Ga-2 (N1182)	Gd-1 (N1184)	Ge-1 (N1188)	Ge-2 (N1190)	Gie-0 (N1192)
Gö-0 (N1194)	Gö-2 (N1196)	Gr-1 (N1198)	Gr-2 (N1200)	Gr-3 (N1202)
Gr-4 (N1204)	Gü-0 (N1212)	Gü-1 (N1214)	Gy-0 (N1216)	Ha-0 (N1218)
Hh-0 (N1224)	Hl-0 (N1228)	Hl-2 (N1230)	Hn-0 (N1234)	In-0 (N1238)
Je-0 (N1246)	Jl-1 (N1248)	Jl-2 (N1250)	Jl-4 (N1254)	Jl-5 (N1256)
Kä-0 (N1266)	Kas-1 (N1264)	Kl-1 (N1276)	Kl-3 (N1280)	Kl-4 (N1282)
Kn-0 (N1286)	Kr-0 (N1296)	Kro-0 (N1300)	La-0 (N1298)	La-1 (N1302)
Lan-0 (N1304)	Lc-0 (N1306)	Li-3 (N1316)	Li-5 (N1320)	Li-5-3 (N1324)
Li-7 (N1330)	Li-8 (N1332)	Lip-0 (N1336)	Ll-0 (N1338)	Ll-1 (N1340)
Lm-2 (N1344)	Lö-1 (N1346)	Lö-2 (N1348)	Lz-0 (N1354)	Ma-0 (N1356)
Ma-2 (N1358)	Mh-0 (N1366)	Mnz-0(N1370)	Mrk-0 (N1374)	Mt-0 (N1380)
Mz-0 (N1382)	Nc-1 (N1388)	Nd-0 (N1390)	Nie-0 (N1392)	Np-0 (N1396)
Ws-2 (N1601)	Ws-1 (N2223)	Wei-0 (N3110)		

Se indica, para cada ecotipo, su denominación según la nomenclatura de la colección AIS (Röbbelen, 1965; Kranz, 1978; Kirchheim y Kranz, 1981) y, entre paréntesis, su número de catálogo en la colección del NASC (Kranz y Kirchheim, 1987). Los ecotipos están ordenados de izquierda a derecha y de arriba abajo según su número de catálogo en el NASC.

las alteraciones en la morfología y el color, apreciables a simple vista. Forman parte de esta colección los denominados *Form Mutants*, los mutantes afectados en la forma, aislados en el laboratorio de G. Röbbelen, en Göttingen (Alemania), entre 1964 y 1969 (líneas F1 a F163; Bürger, 1971; Kranz, 1978), y en el laboratorio de A. R. Kranz, en Frankfurt (Alemania), de 1980 a 1986 (líneas F166 a F202). El ecotipo sometido a mutagénesis fue en la mayoría de los casos (estirpes F13 a F192) Enkheim-2 (En-2), con las excepciones de las líneas F1 a F12, que derivan de Antwerpen-1 (An-1) y algunas otras que se indican en la Tabla 8. Se desconoce el mutágeno empleado por G. Röbbelen para obtener los mutantes que aportó a esta colección. La colección fue mantenida por A. R. Kranz, durante varios años, y está actualmente depositada en el NASC, el ABRC y el SENDAI. La escasa información disponible acerca de cada una de estas estirpes se refleja en la Tabla 8 (Bürger, 1971; Kranz y Kirchheim, 1987; 1990; Anderson, 1993).

Tabla 7.- Descripción de algunos de los mutantes estudiados en esta Tesis

Código	Denominación	Ecotipo originario	Mutágeno	Descripción del fenotipo, según los catálogos del NASC y el ABRC
N230[a,b]	304	EnkheimD	D	Hojas asimétricas y ligeramente revolutas.
N241[a,c]	angustifolia	S96	X	Hojas numerosas y alargadas.
N242[a,c]	cupuliformis	S96	MNU	Hojas asimétricas y redondeadas, con margen involuto.
N243[a,c]	dentata	Dijon-G	D	Hojas anchas con margen festoneado. Floración tardía.
N254[a,c]	rotundifolia	S96	MNU	Hojas anchas y redondas, con peciolos corto. Floración tardía.
CS3397[d]	invalida	Col-1	X	Planta pequeña, con hojas ligeramente lobuladas y revolutas (como la col), oscura, semienana y con entrenudos visibles (tallo ondulado).
CS3257[d,e]	serrate	Col-1	X	Hojas aserradas.
CS3254[d]	flavodentata	Col-1	X	Hojas pálidas, con margen irregularmente inciso.
CS3138[d]	Edward	Col-1	X	Hojas aserradas y pequeñas.
CS3240[d]		Col-1	EMS	Hojas de la roseta lobuladas y asimétricas, con márgenes irregularmente revolutos. Roseta pequeña.
CS3250[d]		Col-1	EMS	Hojas asimétricas, con los márgenes irregularmente revolutos.

[a]Anderson, 1993; [b]Petrov y Vizir, 1982; [c]Relichova, 1976; [d]Varios autores, 1995; [e]Rédei y Hirono, 1964; X: Rayos X; MNU: Metilnitrosourea. EMS: Metanosulfonato de etilo; D: Se desconoce el mutágeno empleado.

Tabla 8.- Descripción de las estirpes de la colección AIS Form Mutants

Denominación	Código AIS	Código NASC	Descripción del fenotipo según el catálogo del NASC
semcolfol	F1	N300	Planta de color verde pálido, con tallo muy ramificado y hojas glabras, de margen inciso.
ros	F2	N301	Planta de roseta enana y brillante y floración temprana. De la clase dentata[1].
ros, vir	F3	N302	Planta de roseta compacta, hojas ligeramente aserradas y pocas flores. De la clase procera[1].
flor	F4	N303	Planta enana y oscura, con muchos tallos inflorescentes, roseta densa, con hojas de peciolo corto, ligeramente apuntadas y con el margen aserrado. De las clases rosula[1] y latifolia[1].
rosetomut	F5	N304	Planta enana de floración tardía, roseta grande y verdeamarillenta. Las hojas son aserradas, con el limbo redondo y el peciolo largo.
rosetomut	F6	N305	Planta de roseta erecta y oscura, con muchos tallos inflorescentes. Las hojas son hirsutas, con el peciolo largo y el limbo rómbico.
foliomut	F7	N306	Roseta grande y verdegrisácea, con hojas estrechas y deformes. De la clase dentata[1].
foliomut	F10	N307	Hojas con margen inciso y limbo redondo. Planta de floración temprana, semienana y con el tallo principal más corto que los secundarios.
rosetomut	F11	N308	Planta de floración tardía, con roseta erecta y poblada. Hojas brillantes y estrechas, con el limbo ligeramente deforme.
foliomut	F12	N309	Planta enana, pálida y verdegrisácea, con varios tallos inflorescentes. De la clase lata[1].
rosetomut	F17	N310	Planta enana, con las hojas deformes y varios tallos inflorescentes. Semillas amarillas. Es alélica de *tt8*[2].
seminemut	F18	N311	Semilla amarilla alabastrina. Roseta verde oscura y pequeña. Floración temprana.
seminemut	F19	N312	Varios tallos inflorescentes. Semillas amarillas.
foliomut	F21	N313	Hojas estrechas, claras, pequeñas y con el margen involuto. Planta muy enana, con pétalos de reducido tamaño y floración temprana. Es alélica de las líneas F72 y F150.
foliomut	F22	N314	Hojas acucharadas y brillantes, con margen involuto. Floración temprana.
seminemut	F23	N315	Planta semienana, con cotiledones estrechos, roseta pálida y muchos tallos inflorescentes. El 20 % de su descendencia es letal.
foliomut	F24	N316	Planta de cotiledones estrechos, muchos tallos inflorescentes, roseta erecta y espesa, y hojas estrechas, involutas y con el margen aserrado. De la clase dentata[1].
rosetomut	F26	N317	Planta oscura, semienana, con muchos tallos inflorescentes y hojas hirsutas, anchas, en forma de cuchara y con el peciolo corto. De la clase latifolia[1].
rosetomut	F27	N318	Planta muy pequeña, oscura y enana, con hojas hirsutas.
semflormut	F31	N319	Planta enana, con roseta densa y hojas anchas, glabras, y con el peciolo corto. La semilla es amarilla. De la clase rosula[1]. Es alélica de *ttg*[3].
foliomut	F33	N320	Planta de floración tardía, con roseta grande y oscura y margen de la hoja profundamente inciso. Floración tardía. De las clases dentata[1] y latissima[1].
foliomut	F34	N321	Roseta oscura, pequeña, densa y muy arbustiva. Hojas rómbicas, con margen recurvado hacia el haz y el envés y el peciolo corto. Los estigmas sobresalen a través del capullo floral, que es redondo y corto. Los pétalos son muy cortos y los frutos, pequeños. Es alélica de *as1*[4].
foliomut	F35	N322	Planta semienana y muy arbustiva, con roseta pálida, pequeña y compacta, y hojas estrechas y deformes. De la clase latissima[1].
semcolmut	F36	N323	Planta enana, con muchos tallos inflorescentes, fertilidad reducida y semilla verdosa, marrón-grisácea. La roseta es muy erecta y brillante, con hojas estrechas y deformes.
semhabmut	F37	N324	Planta enana y pálida, con muchos tallos inflorescentes y cotiledones con forma de copa. Los individuos homocigóticos son estériles.
semhabmut	F38	N325	Planta enana, con varios tallos inflorescentes y de floración tardía. Los cotiledones son deformes, estrechos y en forma de gancho, apareciendo sólo uno en algunos casos. La roseta es pequeña, con hojas lanceoladas.
semcolmut	F41	N326	Planta glabra, con semillas marrones. No es alélica de *gl*[5] ni de la línea F1.
foliomut	F42	N327	Planta semienana, con fertilidad reducida, roseta muy erecta y brillante y hojas involutas.

Tabla 8 (continuación).- Descripción de las estirpes de la colección AIS Form Mutants

Denominación	Código AIS	Código NASC	Descripción del fenotipo según el catálogo del NASC
foliomut	F43	N328	Planta muy enana, amarillenta y de floración temprana, con margen de la hoja involuto.
foliomut	F44	N329	Planta muy pequeña y pálida, de floración temprana, roseta erecta y hojas rómbicas, arrugadas y estrechas.
foliomut	F45	N330	Planta enana, con hojas blanquecinas y moteadas de amarillo, el margen involuto y el peciolo largo.
rosetomut	F46	N331	Planta semienana, con roseta arbustiva y pálida y hojas onduladas y deformes.
foliomut	F47	N332	Planta poco fértil y semienana, con hojas redondeadas y de roseta erecta, con el centro amarillento.
foliomut	F50	N333	Planta de roseta muy erecta, con muchos tallos inflorescentes y hojas estrechas e hirsutas.
semfolmut	F52	N334	Planta semienana y pálida, con roseta grande y arbustiva, hojas redondas con el margen aserrado y semillas grisáceas.
foliomut	F53	N335	Planta oscura y semienana, con roseta grande y arbustiva. De las clases latifolia[1] y late[1].
foliomut	F54	N336	Planta enana, de floración temprana, con roseta diminuta, muchos tallos inflorescentes y hojas apuntadas, glabras y variegadas.
foliomut	F55	N337	Planta de roseta grande, poblada y oscura, con hojas ovales y deformes, con el margen blanco.
rosetomut	F56	N338	Letal embrionario.
rosetomut	F57	N339	Planta de roseta pálida, con semillas amarillas. Esta línea segrega plantas glabras.
rosetomut	F58	N340	Planta enana, con roseta oscura y plana y muchos tallos inflorescentes. Las hojas son redondeadas y en forma de cuchara. De la clase latifolia[1].
rosetomut	F59	N341	Hojas anchas con el margen suavemente aserrado. Planta pálida y semienana, con una roseta pequeña y plana.
rosetomut	F60	N342	Hojas muy pequeñas, apuntadas, variegadas y dentadas. Planta de floración tardía, de roseta pequeña y plana.
semrosmut	F61	N343	Cotiledones pequeños y brillantes. Planta de roseta pequeña, muchos tallos inflorescentes, y hojas de peciolos largos.
semrosmut	F66	N344	Planta de floración tardía y cotiledones pequeños, verdegrisáceos y moteados de blanco. Las primeras hojas son de aspecto filiforme y el resto suavemente apuntadas. Letal embrionario.
rosetomut	F67	N345	Planta enana, con hojas muy pequeñas de margen involuto.
rosflormut	F68	N346	Planta semienana, de roseta muy pequeña, poca fertilidad, floración temprana, sépalos persistentes y pétalos reducidos o ausentes. Hojas apuntadas y con el margen ligeramente involuto.
folmut	F69	N347	Planta semienana, poco fértil, con una roseta muy pequeña y pálida, hojas involutas y varios tallos inflorescentes.
rosfolmut	F70	N348	Planta de roseta brillante y floración temprana, con margen de la hoja involuto.
rosfolmut	F71	N349	Planta enana, de crecimiento muy lento, con una roseta poblada, arbustiva, plana y pálida. Las hojas presentan márgenes aserrados y venación oscura.
folflosmut	F72	N350	Planta enana, de floración temprana, con una roseta muy pequeña y pálida. Las hojas son apuntadas e involutas. Muestra pétalos atrofiados y sépalos persistentes. El fenotipo se manifiesta con expresividad variable. Es alélica de las líneas F21 y F150.
folflormut	F75	N351	Hojas en forma de cuchara, con margen suavemente curvado y el peciolo largo. Planta semienana, con una roseta pequeña, poca fertilidad y pétalos de reducido tamaño.
rosetomut	F76	N352	Planta muy enana, de roseta pequeña y oscura, con frutos cortos y hojas curvadas y asimétricas. De la clase *late*[1].
rosetomut	F77	N353	Planta de roseta muy pequeña y pálida, de floración tardía, con silicuas y hojas variegadas, estas últimas con el margen blanco.
rosetomut	F78	N354	Planta de roseta pequeña, brillante y amarillenta, con varios tallos inflorescentes.

Tabla 8 (continuación).- Descripción de las estirpes de la colección AIS Form Mutants

Denominación	Código AIS	Código NASC	Descripción del fenotipo según el catálogo del NASC
rosetomut	F79	N355	Planta muy enana, de roseta muy pequeña, con hojas curvadas y asimétricas, tallo grueso y fruto corto (Rüffer-Turner y Napp-Zinn, 1980).
rosetomut	F80	N356	Planta estéril en cámara de crecimiento, muy enana, con hojas anchas, floración temprana y fruto corto. De la clase cordifolia[1].
rosflormut	F81	N357	Planta enana y poco fértil, de roseta muy pequeña y oscura, de floración tardía, con varios tallos inflorescentes e inflorescencia en corona. Hojas sin peciolo, con el margen muy aserrado y enrollado.
rosflolmut	F82	N358	Hojas apuntadas y con el peciolo muy corto.
rosflormut	F83	N359	Planta muy enana y poco fértil, de roseta pequeña, densa y oscura, y con varios tallos inflorescentes. Hojas anchas y con el peciolo muy corto. De la clase rosula[1].
rosflormut	F84	N360	Planta enana, con roseta pequeña y pálida, de floración tardía y con varios tallos inflorescentes.
rosetomut	F85	N361	Planta de roseta suelta y tallo hirsuto. Las hojas son dentadas, de peciolo largo y con el ápice doblado hacia el envés.
semfolmut	F86	N362	Planta de roseta grande, con los cotiledones pequeños y hojas muy anchas, con el margen aserrado. De la clase lata[1].
foliomut	F87	N363	Planta de roseta erecta. Las primeras hojas son necróticas, y el resto, estrechas y dentadas, con el peciolo largo. Presenta floración tardía.
foliomut	F88	N364	Planta de fertilidad reducida, con la roseta suelta y hojas pequeñas, estrechas, dentadas y con el peciolo largo. Esta línea segrega para el tiempo de floración.
rosetomut	F89	N365	Planta de floración tardía, muy enana, deforme y con la roseta muy pequeña y oscura. Las hojas presentan el peciolo corto.
foliomut	F90	N367	Planta semienana, de floración tardía y fertilidad reducida, con la roseta amarilla y brillante y hojas redondeadas.
folflormut	F91	N368	Planta de floración tardía, con roseta grande, con el centro amarillo y hojas redondeadas.
rosflormut	F92	N369	Planta semienana, con roseta rojiza, varios tallos inflorescentes y floración tardía. De la clase lata[1].
folflormut	F93	N370	Planta oscura, con tallo fasciado y hojas anchas y deformes, con el margen festoneado. Esta línea segrega plantas fértiles y estériles. De la clase undulata[1].
folflormut	F94	N371	Planta oscura y muy hirsuta, con varios tallos inflorescentes, fasciados, y hojas aserradas. Los homocigotos son estériles. De la clase dentata[1].
semflormut	F97	N372	Planta de roseta erecta, con semillas amarillas y hojas glabras, de peciolo corto. Esta línea segrega un 12% de plantas mutantes *pin*[6].
semfolmut	F98	N373	Planta muy enana, de roseta pequeña, poblada y oscura. Presenta semillas amarillas y hojas glabras en forma de cuchara, con el peciolo corto y el margen enrollado. Los capullos florales son cortos y a menudo se abren prematuramente.
rosetomut	F99	N374	Planta muy enana con pocas hojas, glabras, con el margen festoneado y sin peciolo. Presenta esterilidad al cultivarla en cámara de crecimiento.
semrosmut	F100	N375	Planta semienana con las primeras hojas necróticas. El resto de las hojas son anchas, con el margen aserrado. Sus semillas son anchas y de color marrón claro. Pudiera ser tetraploide. De la clase latifolia[1].
foliomut	F101	N376	Las primeras hojas son necróticas, y el resto, aserradas, con el peciolo largo y estrechas, especialmente en su parte basal. De la clase lata[1].
rosetomut	F103	N377	Planta semienana con la roseta pequeña y pálida. Las hojas son aserradas, observándose necrosis en las dos primeras.
rosetomut	F104	N378	Planta de roseta grande, suelta y oscura. A lo largo de su expansión, las hojas giran sobre su eje próximo-distal en sentido antihorario, fenómeno que se aprecia incluso en los cotiledones. La mutación causante del fenotipo está ligada a *cer2*[7]. De la clase tortifolia[1].
rosetomut	F105	N379	Planta enana, con la roseta pequeña y oscura y hojas pequeñas e involutas, con el peciolo muy corto. De la clase lata[1] (Rüffer-Turner y Napp-Zinn, 1980).

Tabla 8 (continuación).- Descripción de las estirpes de la colección AIS Form Mutants

Denominación	Código AIS	Código NASC	Descripción del fenotipo según el catálogo del NASC
rosetomut	F106	N380	Planta enana, con la roseta pálida y el centro amarillo, con varios tallos inflorescentes. Letal embrionario. De la clase lata[1].
semcolmut	F107	N381	Planta semienana con la roseta pequeña y semilla blanquecina. Alélica de *tt8*[2].
semrosflor	F108	N382	Planta de floración temprana, con la roseta pequeña y oscura, cotiledones y hojas redondeados y una inflorescencia de poco porte, con varios tallos inflorescentes.
folflormut	F109	N383	Planta semienana con los cotiledones redondos. Las hojas son amarillentas, con la venación oscura y el margen aserrado. De la clase lata[1].
folrosmut	F110	N384	Planta enana de hojas estrechas. Esta línea segrega plantas oscuras y amarillentas.
foliomut	F112	N385	Planta con la primeras hojas moteadas, y las restantes, involutas, con el peciolo largo. Presenta muchos tallos inflorescentes fasciados y silicuas variegadas.
foliomut	F113	N386	Planta enana, de floración tardía, con la roseta pequeña y pálida. Las hojas presentan peciolos cortos y pigmentados por antocianinas.
semrosmut	F114	N387	Planta muy enana con las hojas hirsutas, redondeadas, oscuras, y con el margen aserrado. Presenta varios tallos inflorescentes y manifiesta semiesterilidad, siendo las semillas de color marrón y amarillo. Alélica de *tt4*[8].
rosetomut	F116	N388	Planta muy enana, con fertilidad reducida, hojas muy hirsutas y la roseta muy pequeña, oscura y estrechamente arracimada. De la clase rosula[1].
rosetomut	F117	N389	Planta enana, con la roseta brillante y el peciolo muy corto. Presenta esterilidad al cultivarla en cámara de crecimiento.
semfolmut	F118	N390	Planta muy enana, con la roseta erecta y arbustiva, varios tallos inflorescentes, semillas marrones y hojas pequeñas, glabras y apuntadas.
folrosmut	F119	N391	Planta enana, de fertilidad reducida y con la roseta pequeña, oscura e hirsuta, con hojas anchas, pequeñas y de margen aserrado. De la clase latissima[1].
folrosmut	F120	N392	Planta de floración tardía, semienanana y estéril, de color amarillo brillante, que presenta antocianinas en las venas de las hojas, el peciolo y el tallo inflorescente. Esta línea segrega plántulas albinas.
rosetomut	F121	N393	Planta muy enana, con las hojas onduladas. Los individuos homocigóticos son estériles. De la clase undulata[1].
semfolmut	F122	N394	Planta enana y poco fértil, con cotiledones redondeados, y una roseta pequeña y de centro amarillo.
semhabmut	F124	N395	Planta semienana, de fertilidad reducida, con los cotiledones muy pequeños y hojas con el peciolo largo. Esta línea segrega plántulas albinas.
folrosmut	F125	N396	Planta pálida con las hojas largas, estrechas y con el margen aserrado. Esta línea segrega plántulas albinas. De la clase dentata[1].
foliomut	F126	N397	Planta con la roseta pequeña, plana y brillante, con varios tallos inflorescentes y el margen de la hoja aserrado. De la clase tarda[1].
semrosmut	F127	N398	Planta enana, con semillas de color marrón oscuro, varios tallos inflorescentes, la roseta pequeña, oscura y densa, y las hojas apuntadas, con el peciolo corto. Es semejante al mutante *lepida* (*le*) de McKelvie, que a su vez es alélico del *palida* (*pa*) de Redei. De la clase rosula[1].
rosflormut	F128	N399	Planta enana, con la roseta pequeña y oscura y los cotiledones gruesos, y hojas pequeñas y apuntadas. Posee un tallo inflorescente muy corto.
rosetomut	F129	N400	Planta de roseta erecta, con hojas alargadas y con el margen enrollado.
rosflormut	F130	N401	Planta de roseta erecta y brillante, con capullos florales cortos, que a menudo se abren prematuramente. Las hojas son glabras, con forma de cuchara, el peciolo corto, y protuberancias en el envés.
semfolmut	F132	N402	Planta muy enana, con la roseta densa, varios tallos inflorescentes y hojas pequeñas, oscuras, suavemente apuntadas y con el peciolo corto. Es semejante a F127 y de la clase rosula[1].

Tabla 8 (continuación).- Descripción de las estirpes de la colección AIS Form Mutants

Denominación	Código AIS	Código NASC	Descripción del fenotipo según el catálogo del NASC
semrosmut	F133	N403	Planta semienana, con un tallo inflorescente grueso, las hojas anchas y los cotiledones redondos.
semfolmut	F134	N404	Planta enana, con la roseta pálida, de centro amarillo, tallo brillante, hojas deformes y glabras y una estructura floral alterada. De la clase lata[1].
semrosmut	F135	N405	Planta semienana y semiestéril, con roseta amarillenta, hojas redondas y apuntadas, con el margen aserrado, varios tallos inflorescentes y semillas verdes o marrón grisáceas.
semfolmut	F136	N406	Planta de roseta verdegrisácea, con hojas glabras y semillas de color amarillo.
foliomut	F138	N407	Planta con el centro de la roseta amarillento, los cotiledones blanquecinos y las hojas variegadas, con el margen aserrado. De la clase grandiserrata[1].
folflormut	F139	N408	Planta de fertilidad reducida y floración temprana, con varios tallos inflorescentes, roseta pálida y amarillenta, y hojas estrechas de venación oscura.
semfolmut	F140	N409	Planta enana de fertilidad reducida, con hojas apuntadas y oscuras, varios tallos inflorescentes y floración temprana. Esta línea segrega plantas glabras e hirsutas. De la clase latifolia[1].
semfolmut	F141	N410	Planta de floración temprana, con una roseta pálida, grande y erecta, y los cotiledones grandes y grisáceos. Las hojas son estrechas, con el margen aserrado y el peciolo largo.
semrosmut	F142	N411	Planta de tallo inflorescente grueso, semillas de color amarillo pálido y roseta pálida, grande, desigual y erecta. Las hojas presentan el margen festoneado y el peciolo largo. Es alélica de *tt4*[8].
folchmut	F143	N412	Planta oscura con hojas estrechas y de margen aserrado.
foliomut	F144	N413	Planta oscura y de floración tardía, con hojas estrechas y de margen aserrado.
folrosmut	F145	N414	Planta de floración tardía, con una roseta muy pequeña y compacta, las primeras hojas moteadas y las restantes estrechas, con el margen amarillento.
rosflormut	F146	N415	Planta con hojas muy variegadas y una inflorescencia densa y de poco porte. La roseta es pequeña, con el centro amarillo, que en estados posteriores del desarrollo adquiere una coloración uniformemente verde y, finalmente, púrpura. De la clase lata[1].
rosetomut	F147	N416	Planta muy enana, de fertilidad reducida, con la roseta pequeña y oscura, varios tallos inflorescentes, semillas grandes y hojas acorazonadas. Este mutante es semejante a F127 y F132, salvo en lo relativo a la coloración de la semilla. De la clase cordifolia[1].
semrosmut	F148	N417	Planta semienana de floración temprana, con varios tallos inflorescentes, roseta pequeña y oscura y cotiledones redondos.
semf	F149	N418	Planta de altura variable, con la roseta amarillenta y muy pequeña, los cotiledones redondeados y las hojas deformes y arrugadas. De la clase lata[1].
folflosmut	F150	N419	Planta muy enana, de color claro, con los cotiledones casi verticales, hojas estrechas e involutas y floración muy temprana. Los pétalos están atrofiados y los sépalos son persistentes. Es alélica de las líneas F21 y F72.
foliomut	F152	N420	Planta glabra, de floración temprana y semillas amarillentas. Esta línea segrega plantas amarillentas. De la clase dentata[1].
foliomut	F153	N421	Planta semienana, con una roseta pálida, de centro amarillo, varios tallos inflorescentes, y hojas pequeñas y ovaladas, con el margen aserrado y el peciolo rojo. Los tricomas son escasos y más cortos y menos ramificados que en el tipo silvestre. De la clase lata[1].
folflormut	F154	N422	Planta semienana, de roseta pequeña y floración temprana, con hojas ovaladas, de borde casi totalmente liso, con pocos tricomas, cortos y poco ramificados.
foliomut	F155	N423	Planta de roseta erecta, con el centro amarillo, y tallos inflorescentes de color púrpura. La hoja es glabra, de margen aserrado, y se oscurece adquiriendo una coloración purpura después de la transición floral. No es alélica de *gl*[5].
rosetomut	F157	N424	Planta enana, de floración temprana y fertilidad reducida, con varios tallos inflorescentes, roseta pequeña y hojas estrechas.

Tabla 8 (continuación).- Descripción de las estirpes de la colección AIS Form Mutants

Denominación	Código AIS	Código NASC	Descripción del fenotipo según el catálogo del NASC	Mutágeno
rosflormut	F158	N425	Planta enana, de roseta amarillenta y brillante, y hojas con el peciolo rojo. Presenta tallo fasciado y floración temprana, con silícuas que se curvan hacia el suelo.	D
folflormut	F161	N427	Planta muy enana, de color pálido amarillento y hojas con el peciolo rojo. De la clase lata[1].	D
rosetomut	F162	N428	Planta muy enana, de floración tardía, con la roseta pequeña, amarillenta y erecta. Las hojas son anchas, pequeñas y con el margen ligeramente aserrado. De la clase lata[1].	D
foliomut	F163	N429	Planta muy enana, de floración tardía. Esta línea segrega plantas pálidas y oscuras, con hojas deformes. De la clase dentata[1].	D
folflormut	F166	N430	Planta de roseta grande y pálida y el tallo curvado, con hojas grandes, anchas, en forma de cuchara y con el peciolo largo.	EMS[9]
folrosmut	F168	N431	Planta semienana, de fertilidad reducida, con una roseta compacta, hojas involutas y el tallo inflorescente deforme.	EMS
foliomut	F169	N432	Planta muy enana, con varios tallos inflorescentes, una roseta pequeña y pálida, y hojas apuntadas, anchas y con el margen aserrado. De la clase cordifolia[1].	HZE Ne[10]
foliomut	F170	N434	Planta enana, de fertilidad reducida, con varios tallos inflorescentes y una roseta pequeña, compacta, arbustiva y pálida, con hojas apuntadas y de margen aserrado. De la clase cordifolia[1].	HZE Ne
rosetomut	F171	N435	Planta semienana, de floración temprana, con varios tallos inflorescentes, roseta pálida y hojas con el peciolo largo.	HZE Ne
rosetomut	F172	N436	Planta enana, de floración tardía, con la roseta pálida, deforme y muy pequeña, que adquiere una coloración púrpura durante la floración. Las hojas presentan una venación oscura.	HZE Ne
rosetomut	F173	N437	Planta enana, de floración tardía, y roseta deforme, amarilla y pálida, con hojas apuntadas, de venación oscura.	HZE Ne
rosetomut	F174	N438	Planta muy enana, con la roseta pequeña y muy oscura y hojas con los márgenes aserrados.	HZE Ne
foliomut	F175	N439	Planta de floración tardía, roseta grande y hojas de márgenes aserrados. De la clase latifolia[1].	HZE Ne
rosetomut	F176	N440	Planta enana, de germinación tardía, con una roseta grande y oscura. Las primeras hojas son moteadas, y las restantes, estrechas y con el margen aserrado.	HZE Ne
foliomut	F177	N441	Planta con la roseta suelta, oscura, grande y arbustiva, con hojas anchas, de margen festoneado. De la clase latifolia[1].	HZE Ne
rosetomut	F178	N442	Planta muy enana, con un tallo único, una roseta oscura, que adquiere una coloración púrpura durante la floración. Las hojas son involutas, pequeñas y apuntadas.	HZE Ne
foliomut	F179	N443	Planta robusta, con la roseta oscura y hojas involutas y anchas, con el peciolo y la base del tallo inflorescente de color púrpura. De la clase latifolia[1].	HZE Ne
foliomut	F180	N444	Planta de fertilidad reducida, con varios tallos inflorescentes, y la roseta arbustiva y brillante. Hojas muy grandes, arrugadas y acorazonadas. De la clase latissima[1].	HZE Ne
foliomut	F181	N445	Planta semienana, de fertilidad reducida, hirsuta y con la roseta pequeña, arbustiva y oscura, con hojas asimétricas y redondeadas.	HZE Kr[11]
foliomut	F182	N446	Planta semienana e hirsuta, con la roseta grande, oscura y compacta. Las hojas son acorazonadas y redondeadas.	HZE Kr

Tabla 8 (continuación).- Descripción de las estirpes de la colección AIS Form Mutants

Denominación	Código AIS	Código NASC	Descripción del fenotipo según el catálogo del NASC	Ecotipo originario	Mutágeno
florimut	F183	N447	Planta enana, con una inflorescencia compacta, semillas amarillas y las rimeras hojas aserradas. Presenta un número de tricomas reducido.	En-2	HZE Kr
vridfolros	F184	N448	Planta semienana con la roseta suelta y hojas con el margen aserrado y el peciolo largo.	En-2	HZE Ne
cornan	F185	N449	Presenta hojas apuntadas, con el peciolo largo.	En-2	HZE Ne
cornan	F186	N450	Planta de floración tardía, enana y muy oscura, con el tallo inflorescente púrpura.	En-2	HZE Ne
flor	F187	N451	Planta enana, con varios tallos inflorescentes, de fertilidad reducida, arbustiva y con las primeras hojas moteadas. El resto de la hojas son redondeadas, con el margen ligeramente arrugado.	En-2	HZE Ne
nanflor	F188	N452	Planta semienana y oscura, con las hojas moteadas, necróticas y arrugadas.	En-2	D
	F189	N453	Planta de roseta grande, brillante, oscura y muy erecta, con hojas de peciolo largo. El tallo inflorescente y las silicuas adquieren una coloración púrpura en su madurez.	En-2	D
nana	F190	N454	Planta de roseta grande, brillante, oscura y muy erecta, con hojas de peciolo largo. El tallo inflorescente y las silicuas adquieren una coloración púrpura en su madurez.	En-2	cHZE[12]
flor	F191	N455	Planta semienana, de floración tardía, fertilidad reducida. Presenta un tallo corto y robusto,con una roseta pequeña y hojas con el peciolo largo.	En-2	cHZE
linnana	F192	N456	Planta de fertilidad reducida, con la roseta pequeña y oscura. Hojas pequeñas, estrechas, lanceoladas y con el margen aserrado.	En-2	D
	F194	N457	Hojas con grandes sectores blancos y verdes y el peciolo largo.	V81	D
	F196	N458	Planta enana, de hojas variegadas, amarillas y verdes, con la venación oscura.	V88	D
	F198	N459	Planta semienana, con la roseta pequeña y amarillenta, y hojas cuyo peciolo y nervio primario son rojizos.	F43	D
	F199	N460	Planta semienana, con la roseta brillante, de centro amarillo, y hojas arrugadas y deformes.	F43	D
	F200	N461	Planta muy enana, de floración tardía y fertilidad reducida y con la roseta muy oscura o púrpura.	F73	D
compfol	F202	N462	Planta muy enana, con la roseta compacta y amarillenta y hoja acorazonada y recurvada hacia abajo.	Col	cHZE
as	F203	N463	Planta semienana, con el hipocotilo muy largo y la roseta brillante, con hojas asimétricas, de peciolo largo. No es alélica de *as1*[4] .	En-2	D
lanceolata	F204	N464	Planta semienana, de fertilidad reducida, con el hipocotilo largo y la roseta pálida y muy pequeña. Sus hojas son pequeñas, lanceoladas y con el peciolo largo.	D	D

[1]Véase la Figura 18. [2]*tt8*: *transparent testa8*. [3]*ttg: transparent testa glabra*. [4]*as1: asymmetric leaves1*. [5]*gl: glabra*. [6]*pin: pinformed*. [7]*cer2: eceriferum2*. [8]*tt4: transparent testa4*. [9]EMS: Metanosulfonato de etilo. [10]HZE Ne: Radiaciones de alta energía procedentes de átomos de neón. [11]HZE Kr: Radiaciones de alta energía procedentes de átomos de kriptón. [12]cHZE: Radiaciones de alta energía procedentes de rayos cósmicos. D: Mutágeno o ecotipo originario desconocidos.

Algunas de las estirpes analizadas en esta Tesis mostraron rasgos fenotípicos semejantes en algún aspecto a los descritos por autores anteriores para otros mutantes.

Con el fin de determinar la existencia de eventuales relaciones de alelismo, se obtuvieron dichos mutantes, mediante su solicitud al NASC o a los propios autores, a fin de llevar a cabo los correspondientes cruzamientos. Se actuó de modo similar para estudiar las posibles interacciones entre alguna de las mutaciones sometidas a estudio en este trabajo y las previamente analizadas por otros investigadores. Estas líneas mutantes empleadas para ensayos de alelismo o análisis genético de interacciones entre genes se relacionan en la Tabla 9.

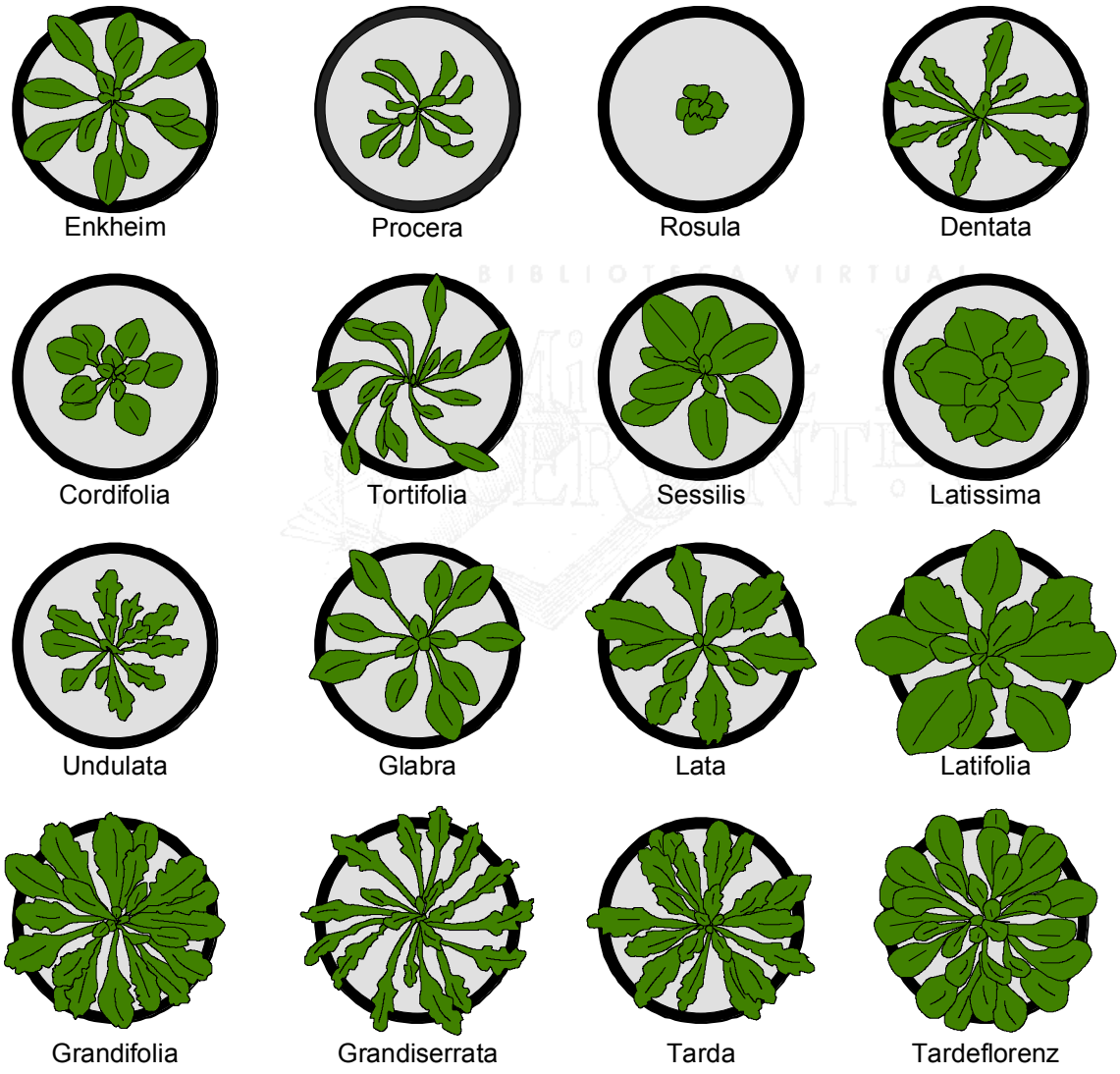


Figura 18.- Clases fenotípicas de mutantes alterados en la forma de la hoja o la estructura de la roseta, definidas por Reinholz (1947b). Sus denominaciones se citan en algunos casos en la cuarta columna (de izquierda a derecha) de la Tabla 8. Estos mutantes se obtuvieron a partir de la estirpe silvestre Enkheim-2. Redibujado a partir de Kirchheim y Kranz, 1985.

Tabla 9.- Mutantes empleados para ensayos de alelismo e interacciones genéticas

Código	Alelo	Gen afectado	Ecotipo originario	Mutágeno	Fenotipo (Referencia)
NW25	*ag-1*	*AGAMOUS*	L*er*	EMS	Planta cuyas flores carecen de pistilos y estambres. Estos últimos están transformados homeóticamente a pétalos, con una flor supernumeraria en lugar del pistilo. Esta línea es mantenida en heterocigosis, dada la esterilidad del homocigoto (Bowman *et al*., 1991.)
CS3400	*an-1*	*ANGUSTIFOLIA*	L*er*/An-1	X	Planta de poco porte, con hojas alargadas y gruesas y tricomas con sólo dos ramificaciones (Rédei, 1962).
CS3374	*as1-1*	*ASYMMETRIC LEAVES1*	Col-1	X	Hojas asimétricas, lobuladas y ligeramente triangulares, con el margen revoluto (Barabás y Rédei, 1971).
CS3283	*as1*	*ASYMMETRIC LEAVES1*	Enkheim	X	Hojas asimétricas, lobuladas y ligeramente redondeadas, con el margen revoluto. Inicialmente denominada Magnifica (Reinholz, 1947a).
NW146	*as-1*	*ASYMMETRIC LEAVES1*	L*er*/Col	D	Hojas asimétricas (Rédei, 1962).
CS3117	*as2-1*	*ASYMMETRIC LEAVES2*	Er	X	Hojas asimétricas, lobuladas y ligeramente elongadas y triangulares, con el margen revoluto (Rédei, 1962).
NW45	*clv1-1*	*CLAVATA1*	L*er*	EMS	Silicuas en forma de porra (Koornneef *et al*., 1983).
CS47	*cp2-1*	*COMPACTA2*	L*er*	EMS	Planta semienana (Koornneef *et al*., 1983).
CS48	*cp3-1*	*COMPACTA3*	L*er*	EMS	Planta semienana, con hojas redondas y oscuras (Koornneef *et al*., 1983).
CS6158	*det1-1*	*DE-ETIOLATED1*	Col	EMS	Desarrolla en la oscuridad un hipocotilo corto y grueso, cotiledones pigmentados y expandidos y numerosas hojas. Si se cultiva con iluminación manifiesta un color más pálido y un tamaño menor que el del silvestre, con raíz verdosa, floración tardía, dominancia apical reducida, y flores pequeñas, con anteras parcialmente estériles (Chory *et al*., 1989).
CS6159	*det2-1*	*DE-ETIOLATED2*	Col	EMS	Desarrolla en la oscuridad un hipocotilo corto y grueso y cotiledones expandidos y pigmentados. Si se cultiva con iluminación manifiesta un color más oscuro y un tamaño menor que el del silvestre, con floración tardía, dominancia apical reducida, y flores pequeñas con anteras parcialmente estériles (Chory *et al*., 1991).
CS6160	*det3-1*	*DE-ETIOLATED3*	Col	DEB	Este mutante presenta en la oscuridad un aspecto similar al del tipo silvestre cuando es cultivado con iluminación, desarrollando verdaderas hojas sin cloroplastos y etioplastos ricos en gránulos de almidón. Cuando es cultivado con iluminación presenta pequeño tamaño y una débil dominancia apical (Cabrera y Poch *et al*., 1993).
N265	*fas1-1*	*FASCIATED1*	Enkheim	X	Planta con el tallo fasciado, hojas estrechas y dentadas y sépalos y pétalos con filotaxia irregular (Reinholz, 1966).

Tabla 9 (continuación).- Mutantes empleados para ensayos de alelismo e interacciones genéticas

Código	Alelo	Gen afectado	Ecotipo originario	Mutágeno	Fenotipo (Referencia)
N266	*fas2-1*	*FASCIATED2*	L*er*	EMS	Tallo fasciado, con filotaxia irregular (Leyser y Furner, 1992).
CS58	*ga1-1*	*GIBBERELLIN REQUIRING1*	L*er*	N	Planta enana, de hojas oscuras, cuyo fenotipo se normaliza en presencia de giberelinas. Requiere giberelinas para germinar y producir semillas (Koornneef y van der Veen, 1980).
CS59	*ga2-1*	*GIBBERELLIN REQUIRING2*	L*er*	N	Planta enana, cuyo fenotipo se normaliza en presencia de giberelinas. Su tasa de germinación se incrementa en presencia de giberelina (Koornneef y van der Veen, 1980).
CS60	*ga3-1*	*GIBBERELLIN REQUIRING3*	L*er*	EMS	Planta enana, cuyo fenotipo se normaliza en presencia de giberelinas. Su tasa de germinación se incrementa en presencia de giberelina (Koornneef y van der Veen, 1980).
CS61	*ga4-1*	*GIBBERELLIN REQUIRING4*	L*er*	EMS	Planta enana, cuyo fenotipo se normaliza en presencia de giberelinas. No requiere giberelina para germinar (Koornneef y van der Veen, 1980).
CS62	*ga5-1*	*GIBBERELLIN REQUIRING5*	L*er*	EMS	Planta enana, cuyo fenotipo se normaliza en presencia de giberelinas. No requiere giberelina para germinar (Koornneef y van der Veen, 1980).
CS63	*gai-1*	*GIBBERELLIN INSENSITIVE*	L*er*	N	Planta enana con hojas oscuras. La mutación es dominante (Koornneef *et al*., 1985).
CS6268	*spy-3*	*SPYNDLY*	Col	EMS	Planta de floración temprana, cuyo aspecto es similar al que muestra el tipo silvestre cuando es tratada con giberelina, con el hipocotilo largo y la roseta erecta y laxa (Jacobsen y Olszewski, 1993).
CS74	*min-1*	*MINIATURE*	L*er*	D	Planta semienana, con hojas verdegrisáceas (Koornneef *et al*., 1983).
NW89	*ttg-1*	*TRANSPARENT TESTA GLABRA*	L*er*	EMS	Planta sin tricomas ni antocianinas en las hojas y los tallos, con semillas amarillas (Koornneef, 1981).
CS91	*yi-1*	*YELLOW INFLORESCENCE*	L*er*	EMS	Planta de hojas dentadas y amarillogrisáceas y capullos florales amarillentos (Koornneef *et al*., 1983).

EMS: Metanosulfonato de etilo. X: Rayos X; N: Neutrones rápidos; DEB: Diepoxibutano; D: Mutágeno desconocido.

Para establecer la posición, en el mapa genético de *Arabidopsis thaliana*, de los genes afectados en las estirpes mutantes, se realizaron cruces con las líneas que aparecen en la Tabla 10, cada una de las cuales es portadora de varios marcadores fenotípicos fácilmente observables. Estas líneas con múltiples marcadores permiten la asignación a cromosoma y la determinación de la posición de mapa de las mutaciones responsables de los fenotipos a estudio (Koornneef y Hanhart, 1983).

Tabla 10.- Líneas marcadoras empleadas para la cartografía génica

Línea	Marcador	Gen afectado	Fenotipo	Cromosoma
N3078[a]	*ch1-1*	*CHLORINA1*	Tallos verde-amarillentos.	1
	er-1	*ERECTA*	Peciolos cortos, tallos erectos, inflorescencia compacta y frutos romos.	2
	gl1-1	*GLABRA1*	Ausencia de tricomas.	3
	cer2-2	*ECERIFERUM2*	Tallos y silicuas verdes y muy brillantes.	4
	tt3-1	*TRANSPARENT TESTA3*	Semillas amarillas.	5
N3079[a]	*er-1*	*ERECTA*	Peciolos cortos, tallos erectos, inflorescencia compacta y frutos romos.	2
	bp1-1	*BREVIPEDICELLUS*	Silicuas giradas hacia el suelo y con el pedicelo corto.	4
	ttg-1	*TRANSPARENT TESTA, GLABRA*	Planta sin tricomas y con semillas amarillas.	5
	yi-1	*YELLOW INFLORESCENCE*	Hojas aserradas y amarillentas. Las yemas florales también son amarillentas.	5
N3080[a]	*dis1-1*	*DISTORTED TRICHOMES1*	Tricomas cortos y deformes.	1
	clv2-1	*CLAVATA2*	Silicuas en forma de porra.	1
	er-1	*ERECTA*	Planta con peciolos cortos, tallos erectos, inflorescencia compacta y frutos romos.	2
	tt5-1	*TRANSPARENT TESTA5*	Ausencia de antocianina en tallos y hojas. Semillas amarillas.	3
NW151[a]	*sti*	*STICKLE*	Tricomas de las hojas sin ramificaciones.	2
	cp2-1	*COMPACTA2*	Planta semienana.	2
	er-1	*ERECTA*	Peciolos cortos, tallos erectos, inflorescencia compacta y frutos romos.	2
	as1	*ASYMMETRIC LEAVES1*	Roseta pequeña, con hojas vegetativas asimétricas, redondas y lobuladas.	2
	cer8-1	*ECERIFERUM8*	Tallos y silicuas de color verde brillante.	2

[a]Anderson, 1993.

III.4.- Observación microscópica y microfotografía

Los cruzamientos y las observaciones de rutina de las plantas se llevaron a cabo con una lupa binocular Olympus SZ30 60TR. Las fotografías de plantas en caja de Petri se efectuaron usualmente con una lupa Leika MZ6, dotada de un dispositivo microfotográfico Leika WILD MPS48, con iluminación de fibra óptica anular, provista por una fuente de luz fría Olympus Highlight 2000. Las fotografías de plantas en maceta se obtuvieron con una cámara fotográfica Nikon F-601 AF, con un macroobjetivo AF Micro-Nikkor de 105 mm f/2.8. La cámara fue inmovilizada en un soporte Polaroid MP-4 dotado de un equipo de iluminación de cuatro lámparas de tungsteno, de 150 W.

III.5.- Análisis morfométrico

Para el análisis morfométrico de hojas silvestres o mutantes, se procedió a separarlas del tallo con la ayuda de unas pinzas. Las hojas fueron sumergidas de inmediato en agua destilada, para evitar deshidrataciones que pudieran alterar su forma

y tamaño, y posteriormente montadas entre un portaobjetos y un cubreobjetos, para ser fotografiadas. Se tomaron muestras de hojas cada dos días a partir del décimo desde la siembra y hasta el día trigésimo segundo. Solo se obtuvieron hojas que pudieran ser cortadas limpiamente a simple vista, descartando el resto de la planta. Para el análisis morfométrico de estas fotografías se empleó el programa Sigmascan 2.0 (Statistical Products & Service Solutions).

III.6.- Medios de cultivo

En este apartado se indica el fabricante de un determinado compuesto sólo en aquellos casos en los que se trata de un producto único en su género o cuando presenta diferencias netas con sus equivalentes u homónimos de otras marcas. El agua fue siempre bidestilada, y las disoluciones se conservaron a temperatura ambiente, salvo que se indique lo contrario.

III.6.1.- Medios de cultivo líquidos

Medio mínimo ATM: KNO_3 5 mM; KH_2PO_4 2,5 mM; $MgSO_4$ 2 mM; $Ca(NO_3)_2$ 2 mM; FeNaEDTA 51 μM; H_3BO_3 70 μM; $MnCl_2$ 14 μM; $CuSO_4$ 0,5 μM; $ZnSO_4$ 1 μM; $NaMoO_4$ 0,2 μM; NaCl 10 μM y $CoCl_2$ 0,01 μM (Kranz y Kirchheim, 1987).

Se añaden, a 900 ml de agua, 5 ml de KNO_3 1 M; 2,5 ml de KH_2PO_4 1 M; 2 ml de $MgSO_4$ 1 M; 2 ml de $Ca(NO_3)_2$ 1 M; 2 ml de FeNaEDTA 20 mM y 1 ml de disolución de micronutrientes, ajustando finalmente el volumen a 1 l. Todas las disoluciones madre (*stock solutions*) se preparan en las concentraciones indicadas y se esterilizan por filtración. Las disoluciones madre de las sales deben añadirse a los 900 ml de agua, y no a la inversa, a fin de evitar la precipitación de complejos insolubles de fosfato cálcico.

La composición de la disolución de micronutrientes es H_3BO_3 70 mM; $MnCl_2$ 14 mM; $CuSO_4$ 0,5 mM; $ZnSO_4$ 1 mM; $NaMoO_4$ 0,2 mM; NaCl 10 mM y $CoCl_2$ 0,01 mM. Se prepara añadiendo, a 900 ml de agua, 4,32 g de H_3BO_3; 2,77 g de $MnCl_2{\cdot}4H_2O$; 124 mg de $CuSO_4{\cdot}5H_2O$; 287 mg de $ZnSO_4{\cdot}7H_2O$; 48,7 mg de $NaMoO_4{\cdot}2H_2O$; 584,4 mg de NaCl; 2,38 mg de $CoCl_2{\cdot}6H_2O$. Finalmente, se ajusta el volumen a 1 l.

III.6.2.- Medios de cultivo sólidos

Los medios de cultivo sólidos fueron preparados por adición de agar (agar bacteriológico europeo; Pronadisa), a una concentración final del 0,8% m/v, tras la disolución del resto de los componentes. Una vez finalizada su esterilización en autoclave, los medios de cultivo se mantuvieron durante media hora en un baño a 50-

55°C antes de su vertido en cajas de Petri. Las cajas de Petri con medio sólido fueron conservadas hasta un mes a 4°C, en posición invertida y precintadas.

Medio GM: Su composición es la siguiente: NH_4NO_3 20,6 mM; H_3BO_3 100 μM; $CaCl_2$ 3 mM; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,1 μM; Na_2EDTA 100 μM; $FeSO_4$ 100 μM; $MgSO_4$ 1,5 mM; $MnSO_4 \cdot H_2O$ 100 μM; $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ 1 μM; KI 5 μM; KNO_3 5 mM; KH_2PO_4 1,25 mM; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 30 μM; Glicina 26,6 μM; Mioinositol 550 μM; Acido nicotínico 4 μM; Clorhidrato de piridoxina 2,43 μM; Clorhidrato de tiamina 0,3 μM; Sacarosa 29,2 mM; MES 2,3 mM; Agar 8 g/l).

Para su preparación se añaden, a 900 ml de agua, 4,7 g de sales de Murashige y Skoog (Sigma M-5519; Murashige y Skoog, 1962), 10 g de sacarosa y 0,5 g de MES. Se agita la suspensión hasta la total disolución de sus componentes y se ajusta el pH a 6 con KOH 1M. Posteriormente, se añaden 8 g de agar y se ajusta el volumen a 1 l. Se esteriliza en autoclave, durante 20 min a 121°C.

Medio ATM: Se obtiene preparando medio mínimo ATM y añadiéndole 8 g/l de agar bacteriológico europeo.

BIBLIOTECA VIRTUAL

III.6.3.- Medios de cultivo suplementados con giberelinas

Algunos de los medios anteriormente descritos se han suplementado en ocasiones con giberelinas a una concentración final de 500 μM. La hormona se añade al medio de cultivo después de que éste haya sido esterilizado en autoclave y posteriormente estabilizado a 55°C en un baño.

Para 1 litro de medio GM se prepara una disolución 500mM de ácido giberélico (sal potásica de la giberelina GA_3; Sigma G1025), disolviendo 0,2 g en agua, en un volumen total de 1 ml y esterilizándola por filtración.

III.7.- Pautas que se han seguido para la redacción de esta memoria

Para la redacción de esta memoria se han seguido las pautas definidas en una Tesis previa (Ponce Molet, 1996). Se ha intentado hacer justicia a los autores anteriores, citando, en la medida de lo posible, los artículos en los que se recogió por primera vez un experimento o una idea. En los casos en los que se mencionan documentos a los que no se ha tenido acceso, casi siempre por su antigüedad, se detallan en el texto tanto el artículo original como la revisión en la que se ha encontrado la cita, recogiendo ambas referencias en la bibliografía. Las referencias en el texto se ordenan cronológicamente, siguiéndose un orden alfabético para autores de artículos publicados en el mismo año. Todos los autores de una publicación son mencionados en la

bibliografía, mientras que en el texto se cita únicamente al primero de ellos, salvo cuando son dos, que se menciona a ambos.

Se ha procurado seguir el Diccionario de la Lengua Española de la Real Academia Española [Vigésima primera edición (1992). Espasa-Calpe, Madrid] y el Vocabulario Científico y Técnico de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales [Segunda edición. (1990). Espasa Calpe, Madrid].

Aquellos términos en inglés que no cuentan con un equivalente español de uso generalmente aceptado se citan en cursiva y entre paréntesis, junto a la traducción elegida. Por lo general, esto se ha hecho sólo la primera de las veces en que se emplea una determinada palabra.

Las abreviaturas empleadas en esta memoria para referirse a unidades de medida se corresponden con las del Sistema Internacional. Se ha procurado obedecer la normativa de la IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) en lo referente a la formulación química y a las denominaciones de los compuestos empleados en este trabajo. En consecuencia, se indica siempre el catión antes que el anión en las sales. No obstante, se ha preferido emplear los acrónimos castellanizados ADN y ARN, en lugar de los recomendados por la IUPAC, DNA y RNA, para los ácidos desoxirribonucleico y ribonucleico, respectivamente. Esta elección es totalmente subjetiva y no está basada en ningún argumento que se considere incontestable. No se ha hecho ningún esfuerzo especial, por no estimarse necesario, por ordenar sustantivos y adjetivos a la hora de denominar a las enzimas. En consecuencia, las expresiones de los tipos ADN polimerasa y polimerasa del ADN se utilizan indistintamente en esta Tesis.

En esta memoria se citan como fuentes, en varias ocasiones, direcciones de Internet (URL; *Uniform Resource Locator*), en el formato http://... Estas citas se hacen con plena conciencia de que algunas de ellas son transitorias. Se trata, no obstante, de documentos que existen únicamente en formato electrónico y que no tienen un equivalente impreso en papel, por lo que no pueden ser citados de otro modo que el empleado en esta Tesis.

IV.- RESULTADOS

IV.1.- Razones para un análisis genético de variantes silvestres y mutantes en la morfología de la hoja de *Arabidopsis thaliana*

Tal como se ha expuesto en apartados anteriores de esta memoria, se dispone de muy poca información acerca de los procesos genéticos que controlan el desarrollo de la hoja, tanto a nivel de la iniciación del primordio foliar como de la morfogénesis de este órgano. En la búsqueda de respuestas a la pregunta de cuáles son los genes implicados en la ontogenia foliar, son varias las aproximaciones experimentales que pueden resultar de utilidad. Una de ellas consiste en intentar, en primer lugar, definir el espectro de la diversidad que puede obtenerse en la arquitectura de la hoja de una especie vegetal. Dos son las fuentes de variantes que pueden resultar útiles para un estudio de este tipo: (a) La variabilidad natural, resultado de la diversificación de la especie a estudio en razas, como resultado de su adaptación a diferentes entornos, y (b) la inducción y aislamiento de mutantes. Una aproximación de este tipo debería proporcionar una visión panorámica de las posibilidades de variación del sistema a estudio, además de facilitar la elección de aquellas variantes naturales o mutantes cuyo fenotipo las convierta en candidatas a ser de utilidad para la identificación de los genes responsables del control de la morfogénesis.

Estos son los fundamentos del trabajo desarrollado en esta Tesis, que ha consistido en el estudio de la variabilidad de la arquitectura de la hoja de *Arabidopsis thaliana*, tanto en estirpes silvestres como en mutantes con hojas anormales, obtenidos por autores anteriores, que no habían recibido apenas atención. El objetivo común a ambas aproximaciones, que se siguieron en paralelo, consistía en la identificación de genes implicados en el control de la morfogénesis de la hoja.

IV.2.- Análisis fenotípico y genético de la variabilidad natural de la arquitectura de la hoja en *Arabidopsis thaliana*

Con el fin llevar a cabo un estudio del desarrollo de la hoja en una muestra amplia de estirpes silvestres de *Arabidopsis thaliana*, se recurrió a la colección más extensa de las disponibles en el momento en que se inició este trabajo, la denominada *Arabidopsis Information Service* (AIS) *Collection* (véase el apartado III.3.1 de Materiales y Métodos, en la página 64), a la que se hará referencia en lo sucesivo como "Colección

del AIS". El estudio fue iniciado con los 193 ecotipos de la colección del AIS que se obtuvieron del NASC, los que aparecen listados en la Tabla 6, en la página 65.

IV.2.1.- Clasificación fenotípica de los ecotipos de la colección del AIS

Todas las estirpes de esta colección fueron sembradas y cultivadas en idénticas condiciones (véase el apartado III.1.1 de Materiales y Métodos, en la página 60). Se usaron 6 semillas por ecotipo, sembrando un total de 24 (4 ecotipos) por caja de Petri de 150 mm de diámetro. Las plantas fueron fotografiadas a intervalos regulares de tres días, a partir del sexto desde la siembra, para comparar su ritmo de crecimiento y la forma y tamaño de las hojas de su roseta basal. Sólo cinco de estos ecotipos (Dijon-M, Enkheim-T, Hojda-Obi-Garm, Cen-0 y Chi-0) fueron descartados, a efectos de clasificación y posteriores estudios, dada su incapacidad, constatada tras varios intentos, para germinar o crecer adecuadamente en nuestras condiciones de trabajo. Los 188 ecotipos restantes fueron clasificados en 14 grupos fenotípicos, en función de la compacidad de su roseta y de la morfología de la hoja (de la forma del limbo y la estructura del margen) a los 30 días de la siembra, según se muestra en la Tabla 11. Se distinguieron plantas de roseta compacta (*compact*) o suelta (*loose*), con el limbo redondeado, alargado, ondulado o sin ninguna de estas características, y con el margen aserrado, involuto (recurvado hacia el haz) o revoluto (recurvado hacia el envés).

IV.2.2.- Estudio del patrón temporal de aparición de hojas vegetativas en los ecotipos de la colección del AIS

Tal como se ha expuesto en la Introducción (véase la página 26 y siguientes), las sucesivas hojas vegetativas de *Arabidopsis thaliana* manifiestan diferencias en su morfología, fenómeno denominado heteroblastia o sucesión foliar. Dado que las diferencias que cabe esperar entre las primeras y las últimas hojas de la roseta de una planta determinada pudieran ser tanto mayores cuanto mayor resulte su número total, es conveniente, en consecuencia, determinar el ritmo de generación de órganos foliares en los ecotipos a estudio. Por esta razón, las estirpes silvestres de la colección del AIS fueron sembradas en las condiciones habituales y fotografiadas a los 6, 9, 12, 15 y 18 días después de la siembra, efectuándose recuentos del número de órganos aéreos visibles (cotiledones, hojas de la roseta o primordios foliares), con los resultados que se describen en la Tabla 12. A estos efectos, se distingue entre hoja y primordio por la presencia o ausencia de un peciolo foliar patente.

Tabla 11.- Clasificación de los ecotipos de *Arabidopsis thaliana* utilizados en este trabajo, en función de la morfología foliar y la apariencia de la roseta

Roseta	Hoja	Ecotipos[a]
Compacta		An-2 (N946), Ang-0 (N948), Bs-2 (N998), Bsch-0 (N1002), Bsch-2 (N1004), Bu-4 (N1012), Bu-17 (N1036), Bu-20 (N1042), Bu-22 (N1046), Bu-25 (N1052), Bur-0 (N1028), Chi-2 (N1076), Do-0 (N1112), Dr-0 (N1114), Ei-2 (N1124), Lan-0 (N1304).
Suelta		Ag-0 (N901), Sorbo (N931), Ag-0 (N936), Ak-1 (N938), Bch-1 (N956), Bch-4 (N960), Bu-6 (N1016), Bu23 (N1048), Co-2 (N1086), Co-3 (N1088), Co-4 (N1090), Di-1 (N1108), Dra-0 (N1116), Ei-6 (N1130), Es-0 (N1144), Ge-1 (N1188), Kl-3 (N1280), Ma-0 (N1356).
Compacta	Limbo redondeado	**Bd-0 (N962), Bla-14 (N988), La-1 (N1302).**
Suelta	Limbo redondeado	**Aa-0 (N900),** C24 (N906), Be-0 (N964), **Bla-1 (N970),** Bla-2 (N972), Bla-3 (N974), Bla-6 (N980), Bla-10 (N982), Ca-0 (N1060), Er-0 (N1142), Ge-2 (N1190), L*er* (NW20), **Li-5-3 (N1324),** Ll-0 (N1338), Ll-1 (N1340), Lz-0 (N1354).
Compacta	Limbo alargado	Col-2 (N907), Da(1)-12 (N917), H55 (N923), Bla-12 (N986), Bu-15 (N1034), Edi-0 (N1122), El-4 (N1126), Est-1 (N1150), Fr-2 (N1168), Gie-0 (N1192), Jl-2 (N1250), Li-3 (N1316), Li-5 (N1320), Lm-2 (N1344), Lö-1 (N1346), Lö-2 (N1348), Nc-1 (N1388).
Suelta	Limbo alargado	Cvi-0 (N902), Chi-1 (N1074**), Cvi-0 (N1096), Ep-0 (N1140), Gr-3 (N1202),** Gü-1 (N1214), Ha-0 (N1218), **Hl-0 (N1228),** Hn-0 (N1234), Je-0 (N1246), **Jl-5 (N1256),** Mnz-0 (N1370), Wei-0 (N3110).
Compacta	Limbo ondulado	Col-3 (N908), Bu-9 (N1022), Bu-11 (N1024), Bu-13 (N1026), Bu-19 (N1040), Gö-2 (N1196), Gr-1 (N1198), Jl-4 (N1254), Kn-0 (N1286), Lc-0 (N1306), Li-8 (N1332), Lip-0 (N1336).
Suelta	Limbo ondulado	Mh-0 (N904), RLD1 (N913), Je54 (N924), Petergof (N926), Sn(5)-1 (N930), Aa-0 (N934), An-1 (N944), Bch-3 (N958), Bl1 (N968), Bu-5 (N1014), Col-0 (N1092), Ct-1 (N1094), Db-0 (N1100), Db-2 (N1104), Dra-2 (N1120), En-1 (N1136), Fr-3 (N1170), Fr-5 (N1174), Gd-1 (N1184), Gö-0 (N1194), Gr-2 (N1200), Gr-4 (N1204), In-0 (N1238), Kl-4 (N1282), Kr-0 (N1296), Kro-0 (N1300), Li-7 (N1330), Kas-1 (N1358), Mh-0 (N1366), Mrk-0 (N1374), Np-0 (N1396).
Compacta	Margen aserrado	Kas-1 (N903), Ms-0 (N905), Estland (N911), Shadara (N928), Col-4 (N933), Bu-3 (N1010), Dra-1 (N1118), En-2 (N1138), Est-0 (N1148), Fi-1 (N1158), **Ga-0 (N1180),** Gü-0 (N1212), Gy-0 (N1256), **Hl-2 (N1230)**, Mt-0 (N1380), Mz-0 (N1382).
Suelta	Margen aserrado	S96 (N914), Condara (N916), Enk-D (N920), Rubez-1 (N927), Ang-1 (N950), **Be-1 (N966),** Bla-4 (N976), Bla-11 (N984), Bs-5 (N1000), Bu-0 (N1006), Bu-2 (N1008), Bu-8 (N1020), Bu-24 (N1050), Cl-0 (N1082), Co-1 (N1084), Da-0 (N1098), Db-1 (N1102), Di-0 (N1106), Di-2 (N1110), Fr-6 (N1176), Ga-2 (N1182), Kl-1 (N1276), **Kä-0 (N1266),** La-0 (N1298), Nd-0 (N1390), Ws-1 (N2223).
Compacta	Margen revoluto	Bu-18 (N1038), Fe-1 (N1184), **Fi-0 (N1156).**
Suelta	Margen revoluto	Dijon-G (N910), Ws (N915), Abd-0 (N932), Eil-0 (N1132), El-0 (N1134), Fr-4 (N1172), Hh-0 (N1224), Jl-1 (N1248), Ma-2 (N1358), Nie-0 (N1392), Ws-2 (N1601).
Compacta	Margen involuto	Bs-1 (N996), Bu-14 (N1032).
Suelta	Margen involuto	Bay-0 (N954), Bu-7 (N1012), Cal-0 (N1062), Fr-7 (N1178).

[a]Véase el pie de la Tabla 6, en la página 65. Se destacan en negrita los ecotipos que manifiestan en un grado máximo el rasgo que define a su grupo fenotípico, que fueron utilizados posteriormente para el estudio del modo de herencia de alguno de sus caracteres.

Tabla 12.- Ritmo de aparición de las hojas en ecotipos

Días desde la siembra	Organos observados en la mayoría de los ecotipos estudiados[a]	Otras situaciones observadas[a]	Ecotipos	Número de ecotipos
6	2 C, 2 P			188
9	2 C, 2 H			185
		2 C, 2 P	Bla-1 (N970), Bla-2 (N972), Bla-3 (N974).	3
12	2 C, 4 H			178
		2 C, 2 H, 2 P	Dijon G (N910), Estland (N911), Condara (N916), Bla-1 (N970), Bla-2 (N972), Bla-3 (N974), Cvi-0 (N1096).	7
		2 C, 4 H, 1 P	Do-0 (N1112), Hl-0 (N1228), Kn-0 (N1286).	3
15	2 C, 5 H, 1 P			172
		2 C, 4 H, 1 P	Dijon G (N910), Estland (N911), Bla-1 (N970), Bla-2 (N972), Bla-3 (N974), Bla-6 (N980), Cvi-0 (N1096), Lm-2 (N1344), Ws-1 (N2223).	9
		2 C, 3 H, 1 P	S96(N914), Condara (N916), Abd-0 (N932).	3
		2 C, 6-7 H, 1 P	Do-0 (N1112), Hl-0 (N1228), Kä-0 (N1266), Kn-0 (N1286).	4
18	2 C, 7 H, 1 P			165
		2 C, 6 H, 1 P	Dijon G (N910), Estland (N911), RLD1 (N913), Bla-6 (N980), Bla-10 (N982), Bla-11 (N984), Co-3 (N1088), Fi-0 (N1156), Jl-4 (N1254), Lm-2 (N1344).	10
		2 C, 5 H, 1 P	S96 (N914), Condara (N916), Abd-0 (N932), Bla-1 (N970), Bla-2 (N972), Bla-3 (N974), Cvi-0 (N1096), Ws-1 (N2223), Wei-0 (N3110).	9
		2 C, 8-9 H, 1 P	Do-0 (N1112), Hl-0 (N1228), Kä-0 (N1266), Kn-0 (N1286).	4

[a]C: Cotiledones; H: Hojas vegetativas; P: Primordios foliares. El dígito que acompaña a cada una de estas iniciales indica el número de órganos observado.

A la vista de los resultados reflejados en la Tabla 12 se puede afirmar que una gran mayoría de los ecotipos manifiestan un ritmo similar de desarrollo vegetativo cuando son cultivados en idénticas condiciones. Con respecto a los que mostraron un comportamiento atípico, distinto del mayoritario, hemos intentado establecer la eventual existencia de alguna correlación entre sus pautas de desarrollo y las condiciones ambientales de su hábitat natural de origen, recabando, para ello, la información que se recoge en la Tabla 13. No se constató ninguna relación obvia entre tales pautas de desarrollo y sus condiciones ambientales respectivas.

Tabla 13.- Características del hábitat natural de ecotipos con pautas atípicas de desarrollo vegetativo

Ecotipo	Hábitat	Altitud (m)	Longitud/Latitud	Temperatura media en primavera/otoño (°C)	Precipitación media en primavera/otoño (mm)
Abd-0 (N932)	Aberdeen, UK.	D	D	D	D
Bla (N970-N988)	Blanes, España.	1-100	E3/N41-42	17/11	40-50/40-50
Condara (N916)	Khurmatov, Tadjikistán.	D	D	D	D
Cvi (N1096)	Islas Cabo Verde, Portugal. Montaña rocosa con musgos.	1200	W23-25/N15-17	D	D
Di-G (N910)	Dijon, Francia.	300-400	E5/N47-48	7-8/11-12	30-40/30-40
Do-0 (N1112)	Donsbach, Alemania. Suelo arenoso y rocoso.	200-300	E8/N50-51	D	D
Est (N911)	Estland, Rusia.	100-200	E23-28/N58-59	3-4/<5-6	20-30/30-40
Fi-0 (N1156)	Frickhofen, Alemania.	300-400	E8-9/N50-51	D	D
Co-3 (N1088)	Coimbra, Portugal. Jardín botánico.	100-200	W8-9/N40-41	11/17	60-70/30-40
Hl-0 (N1228)	Holtensen, Alemania. Plantación de centeno.	300-400	E9-10/N52-53	D	D
Kn-0 (N1286)	Kaunas, Lituania.	1-100	E23-24/N54-55	3/9	30-40/20-30
Lm-2 (N1344)	Le Mans, Francia. Campo de trigo.	1-100	E0-1/N48	9/13	20-30/30-40
Kä-0 (N1266)	Kärnten, Austria.	900-1000	E14-15/N46-47	3/5	90-100/80-90
RLD1 (N913)	Rschew, Rusia.	100-200	E34/N56-57	<0-2/7-8	D
S96(N914)	Holanda.	D	D	D	D
Wei-0 (N3110)	Weiningen, Suiza.	D	D	D	D
Ws-1 (N2223)	Wassilewskija, Rusia.	100-200	E30/N52-53	3-4/<5-6	D

La información reflejada en la Tabla se ha tomado de Anderson, 1993. D: Dato desconocido.

IV.2.3.- Estudio de la transmisión de las variantes en la morfología foliar observadas en los ecotipos de la colección del AIS

Los resultados expuestos en los apartados anteriores demuestran la existencia de una considerable variabilidad en la forma y el tamaño de las hojas de la roseta basal, así como en la estructura de ésta, que en absoluto parece relacionarse con diferencias en el ritmo del desarrollo vegetativo, afirmación que es válida para la práctica totalidad de los ecotipos estudiados. A continuación, nos propusimos determinar la eventual naturaleza monogénica o poligénica de los rasgos morfológicos observados, cuya base genética podría establecerse con mucha mayor facilidad en caso de ser cierto el primero de estos dos supuestos. Aunque se ha asumido tradicionalmente que los caracteres que

muestran variación continua en las poblaciones son de naturaleza poligénica, son varios los genes responsables de rasgos aparentemente cuantitativos que han sido identificados merced al estudio de ecotipos de *Arabidopsis thaliana* con un comportamiento muy alejado de la norma predominante. Tal es el caso de algunos genes que controlan el momento de la transición floral (véase la página 58). Con esta perspectiva, se eligieron algunos ecotipos de varias de las clases definidas en la Tabla 11, con la intención de llevar a cabo cruzamientos entre los que manifestaran un determinado carácter de dos maneras extremas y opuestas. Se estudió de este modo la transmisión de los tres rasgos siguientes: la longitud del peciolo (largo o corto), la estructura del margen de la hoja (liso o aserrado) y la forma del limbo (alargado o redondeado). Las estirpes sometidas a estudio se indican en la Tabla 14, algunas de las cuales aparecen en más de un grupo, dado que manifiestan en formas extremas varios caracteres morfológicos. La Figura 19 incluye imágenes de los fenotipos de estos ecotipos.

BIBLIOTECA VIRTUAL

Tabla 14.- Ecotipos elegidos para el estudio de la base genética de la variabilidad natural en la morfología de la hoja

Carácter a estudio		Ecotipos
Peciolo	largo	Bla-1 (N970), Cvi-0 (N1096), Gr-3 (N1202), Jl-5 (N1256), Li-5-3 (N1324)
	corto	Bla-14 (N988), Fi-0 (N1156), Ga-0 (N1180), Hl-2 (N1230)
Margen	liso	Aa-0 (N900), Bd-0 (N962), Bla-14 (N988), Cvi-0 (N1096)
	aserrado	Be-1 (N966), Ga-0 (N1180), Kä-0 (N1266)
Limbo	alargado	Cvi-0 (N1096), Ep-0 (N1140), Hl-0 (N1228), Jl-5 (N1256)
	redondeado	Bd-0 (N962), Bla-14 (N988), La-1 (N1302)

Tras realizar los cruzamientos recíprocos entre las estirpes relacionadas en la Tabla 14, se estudió el fenotipo de su descendencia F_1, tal como recogen las Tablas 15, 16 y 17. Se analizaron al menos 20 plantas de cada F_1, constatándose una considerable homogeneidad fenotípica entre individuos de idéntico genotipo. Los resultados que aparecen en las Tablas 15, 16 y 17 indican modos de herencia de cada uno de los caracteres a estudio que en muchos casos corresponden claramente a desviaciones de lo esperado para un carácter monogénico con sólo dos variantes alélicas. En primer lugar, se observa que se obtienen diferentes resultados, en cuanto a la dominancia de un determinado rasgo, cuando se comparan todos los cruzamientos en los que participa una estirpe determinada. Esto fue así casi siempre, con la única excepción de los cruzamientos en los que se implicó al ecotipo Li-5-3 (de peciolo largo; véase Tabla 15).

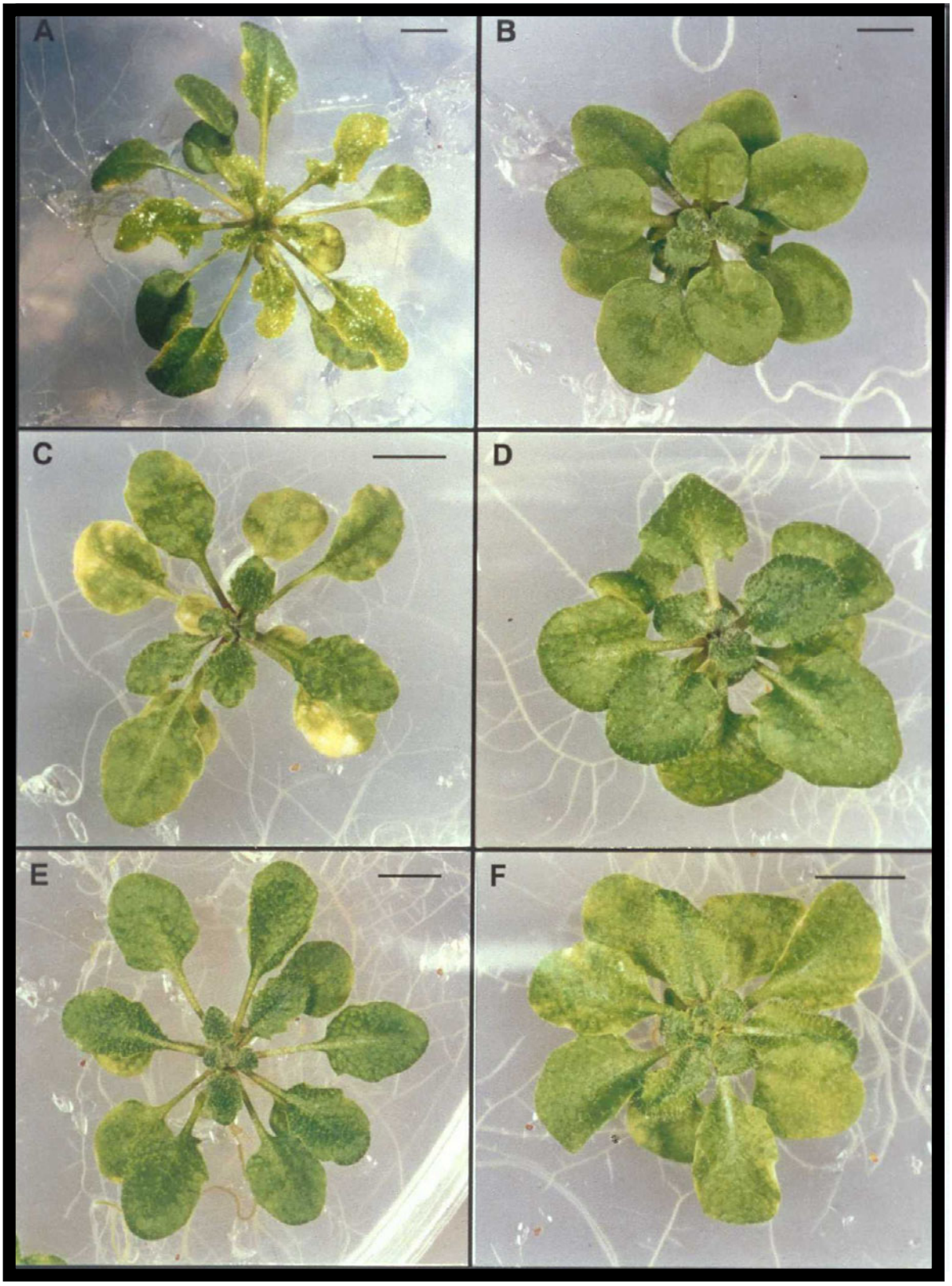


Figura 19.- Individuos representativos de los ecotipos elegidos para el estudio del modo de herencia de la variabilidad natural en la morfología de la hoja. (A) Bla-1, (C) Gr-3, y (E) Li-5-3, con peciolo largo; (B) Bla-14, (D) Fi-0, y (F) Hl-2, con peciolo corto. Las fotografías se obtuvieron 30 días después de la siembra. Las barras de escala indican 5 mm.

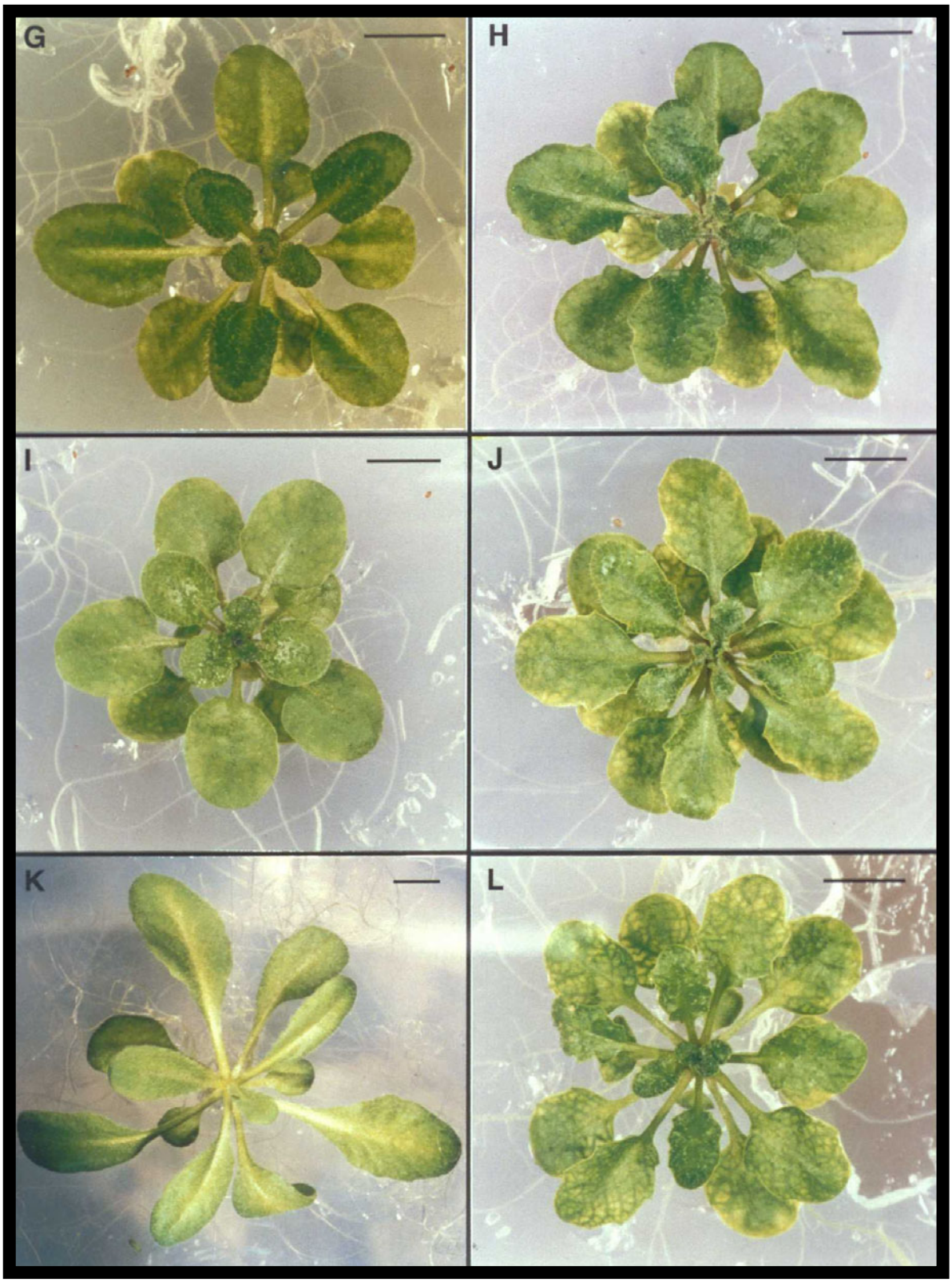


Figura 19 (continuación).- Individuos representativos de los ecotipos elegidos para el estudio del modo de herencia de la variabilidad natural en la morfología de la hoja. (G) Aa-0, (I) Bd-0 y (K) Cvi-0, con margen liso; (H) Be-1, (J) Ga-0 y (L) Kä-0, con margen aserrado. Las fotografías se obtuvieron 30 días después de la siembra. Las barras de escala indican 5 mm.

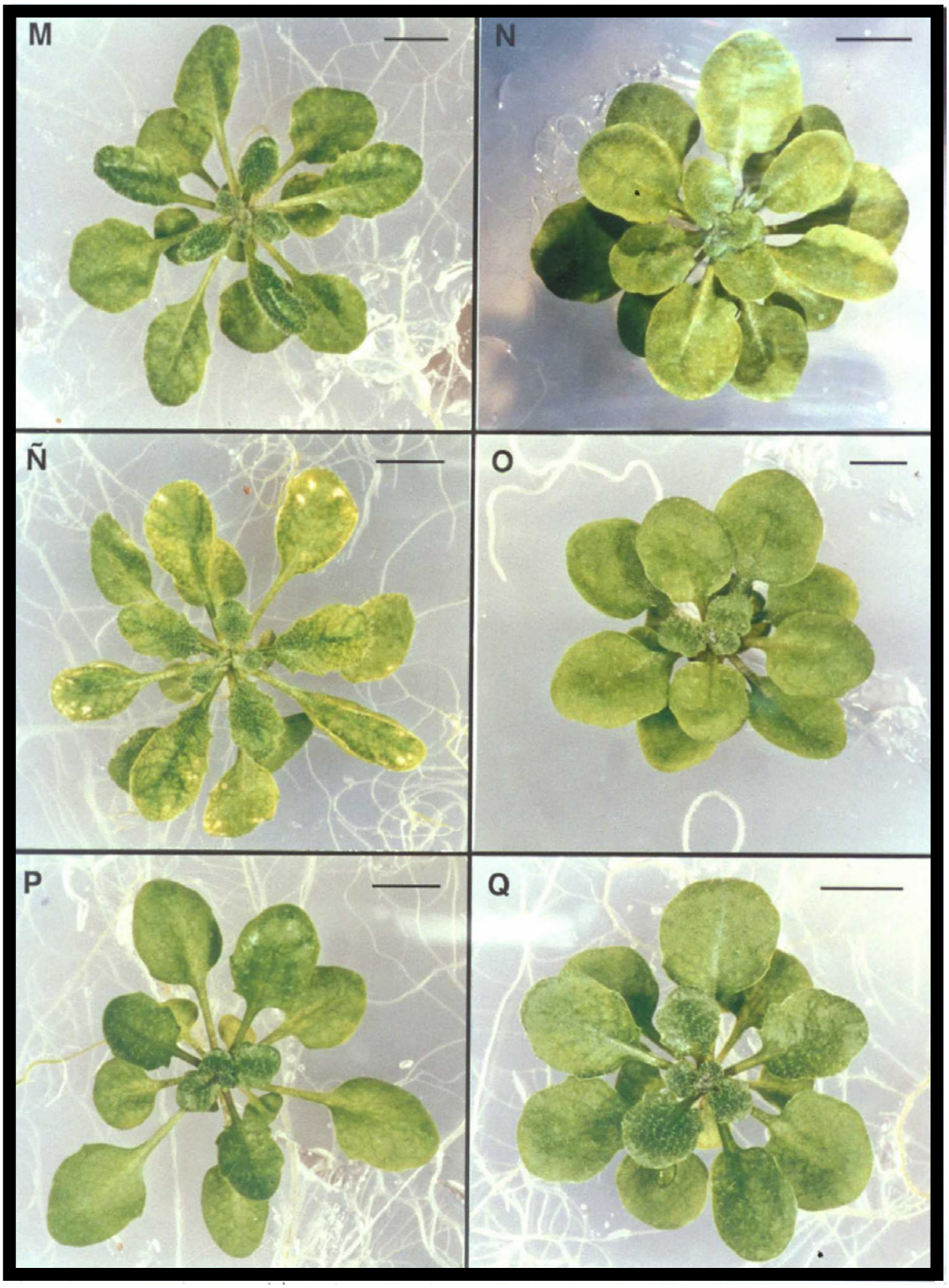


Figura 19 (continuación).- Individuos representativos de los ecotipos elegidos para el estudio del modo de herencia de la variabilidad natural en la morfología de la hoja. (M) Ep-0, (Ñ) Hl-0, y (P) Jl-5, con limbo alargado; (N) Bd-0, (O) Bla-14, y (Q) La-1, con limbo redondeado. Las fotografías se obtuvieron 30 días después de la siembra. Las barras de escala indican 5 mm.

Tabla 15.- Estudio del modo de herencia de la longitud del peciolo en ecotipos

Peciolo largo / Peciolo corto	Bla-1 (N970)	Cvi-0 (N1096)	Gr-3 (N1202)	Jl-5 (N1256)	Li-5-3 (N1324)
Bla-14 (N988)	I / I	/ I	L / L	L / L	L / L
Fi-0 (N1156)	C /				
Ga-0 (N1180)	L /	I / I	C / I		L / L
Hl-2 (N1230)			I / I		L / L

Los resultados se expresan mediante dos letras mayúsculas separadas por una barra. La letra de la izquierda indica el fenotipo de la progenie del cruzamiento en el que el parental femenino es la estirpe que encabeza esa fila y el masculino la que encabeza la columna. La letra de la derecha representa el fenotipo de la progenie del cruzamiento recíproco. I: Fenotipo intermedio; C: Peciolo corto; L: Peciolo largo. Los espacios vacíos indican cruzamientos infructuosos.

Tabla 16.- Estudio del modo de herencia de la estructura marginal de la hoja (aserrada o lisa) en ecotipos

Margen liso / Margen aserrado	Aa-0 (N900)	Bd-0 (N962)	Bla-14 (N988)	Cvi-0 (N1096)
Be-1 (N966)	L / L	I / I	L /	L / L
Ga-0 (N1180)		A / A		A / A
Kä-0 (N1266)	I / I	I /	I /	/ A

Véase el pie de la Tabla 15. I: Fenotipo intermedio; A: Margen aserrado; L: Margen liso.

Tabla 17.- Estudio del modo de herencia de la forma del limbo (redondeado o alargado) en ecotipos

Limbo redondeado / Limbo alargado	Bd-0 (N962)	Bla-14 (N988)	La-1 (N1302)
Cvi-0 (N1096)	/ I	I /	A /
Ep-0 (N1140)		A /	I / I
Hl-0 (N1228)	A /	A / A	I / R
Jl-5 (N1256)	A /	I / I	I / I

Véase el pie de la Tabla 15. I: Fenotipo intermedio; R: Limbo redondeado; A: Limbo alargado.

Ignoramos si cabría decir otro tanto de aquellos casos en los que fue productivo sólo uno de los cruzamientos realizados con un determinado ecotipo. Por otra parte, en al menos dos casos, los de Ga-0 x Gr-3 (Tabla 15) y Hl-0 x La-1 (Tabla 17), se aprecia no reciprocidad de los cruzamientos.

Se intentó a continuación establecer el tipo de segregación fenotípica en la F_2, con el objetivo de determinar el número de genes responsables de los caracteres a estudio. Se sembraron y cultivaron, en las condiciones habituales y en la misma caja de

Petri, varios individuos de los dos ecotipos implicados en cada cruzamiento, junto a 50 de sus descendientes F_2, producto de la autofecundación de una sola planta F_1. Se procedió de este modo con la F_2 de todos los cruzamientos indicados en la Tabla 16, realizados para estudiar la herencia de la forma aserrada o lisa del margen de la hoja, así como con tres de la Tabla 15 [Bla14 x Bla1 (de su F_1 de peciolo de longitud intermedia), Ga-0 x Bla1 (F_1 de peciolo largo) y Ga-0 x Gr-3 (F_1 de peciolo corto)], y otros tres de la Tabla 17, [Hl-5 x Bla14 (F_1 de limbo alargado), La-1 x Hl-0 (F_1 de limbo redondeado) y Jl-5 x Bla14 (F_1 de limbo intermedio)]. Los individuos de la segunda generación filial de estos cruzamientos constituían un continuo de fenotipos, siendo prácticamente imposible la distinción de clases fenotípicas, por lo que se concluyó que la variabilidad natural observada era probablemente de origen poligénico y no se continuó con esta línea de trabajo.

IV.3.- Análisis morfométrico de la expansión de las hojas vegetativas del ecotipo En-2

Más de cien de las estirpes mutantes con hojas de morfología anormal que se han estudiado en esta Tesis (véanse la **Tabla 8** y el apartado **III.3.2**, en las páginas 67 a 73 y 64 a 66) fueron obtenidas por autores anteriores a partir de la estirpe silvestre Enkheim, línea 2 (En-2).

Tabla 18.- Programación de la recolección de hojas de En-2 para su análisis morfométrico

Días desde la siembra	Hojas recolectadas por planta	Hojas analizadas*
10	2	20
12	2	20
14	4	40
16	5	50
18	6	60
20	7	70
22	8	80
24	9	90
26	10	100
28	11	110
30	12	120
32	12	120
TOTAL		880

*Se recolectaron hojas de 10 plantas.

A fin de facilitar la determinación cuantitativa de la naturaleza de las diferencias entre el ecotipo En-2 y los mutantes que derivan de ella, se analizó morfométricamente la evolución temporal de la forma y el tamaño de las hojas vegetativas de esta estirpe silvestre. Para realizar este estudio se practicó la abscisión de hojas vegetativas de En-2, según el programa temporal indicado en la Tabla 18. Las hojas fueron recolectadas, fotografiadas y analizadas morfométricamente según se indica en el apartado **III.4** de Materiales y Métodos, en la página 77, obteniéndose los resultados que se presentan en las Figuras 20 a 25.

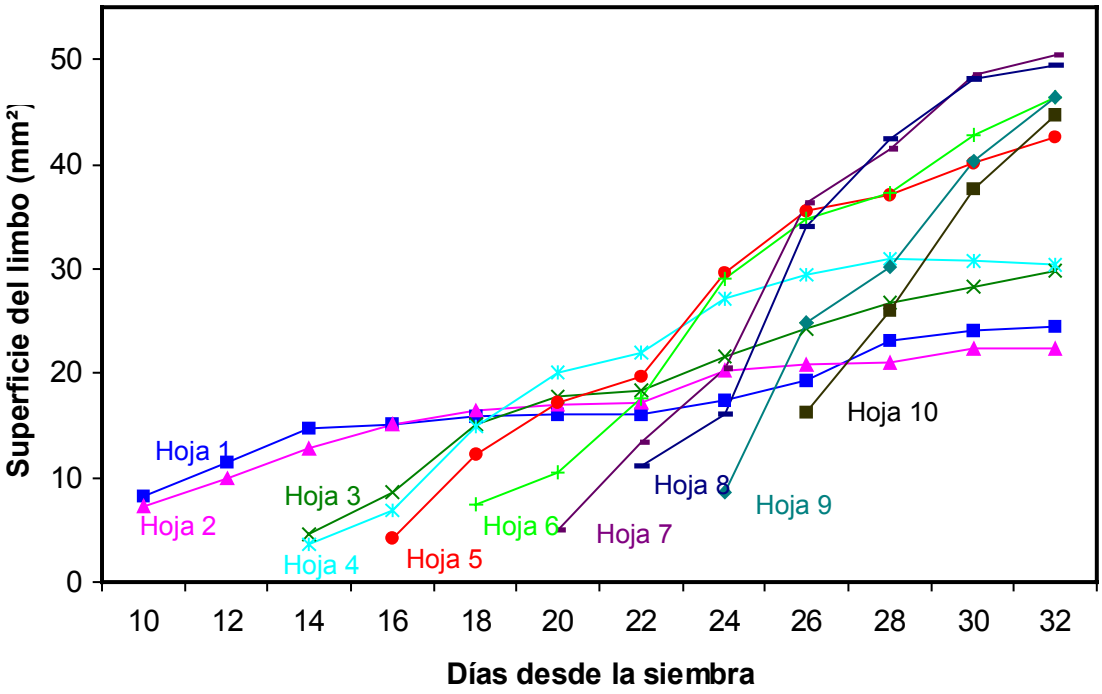


Figura 20.- Variación con respecto al tiempo de la superficie de las hojas vegetativas de En-2.

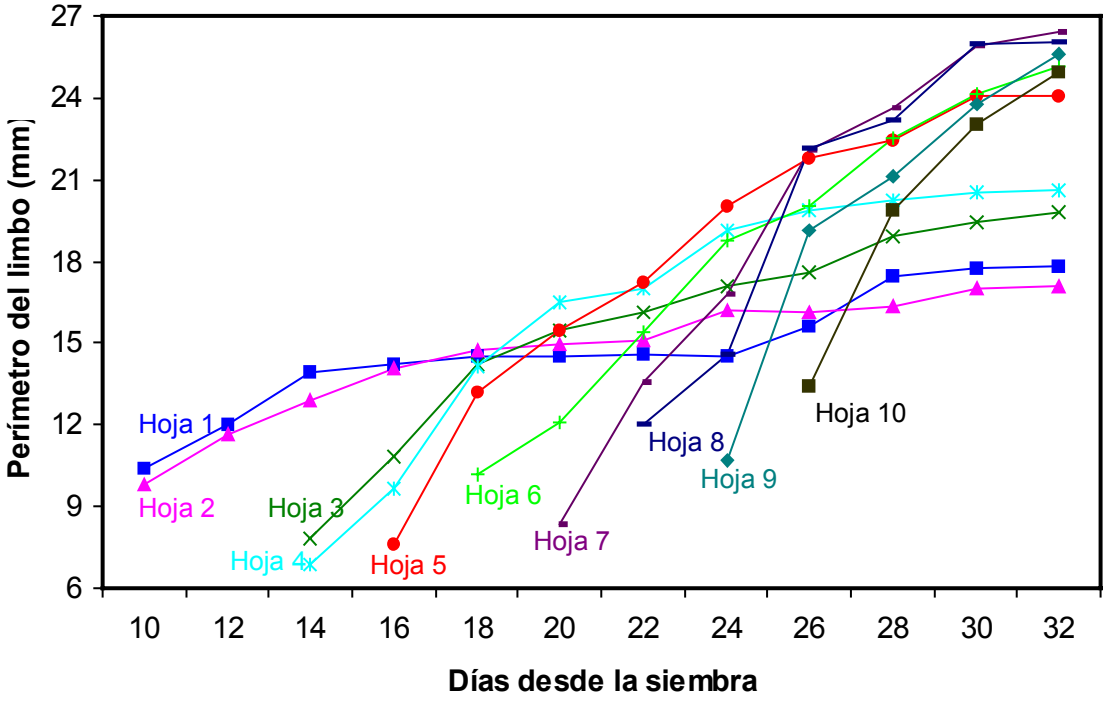


Figura 21.- Variación con respecto al tiempo del perímetro de las hojas vegetativas de En-2.

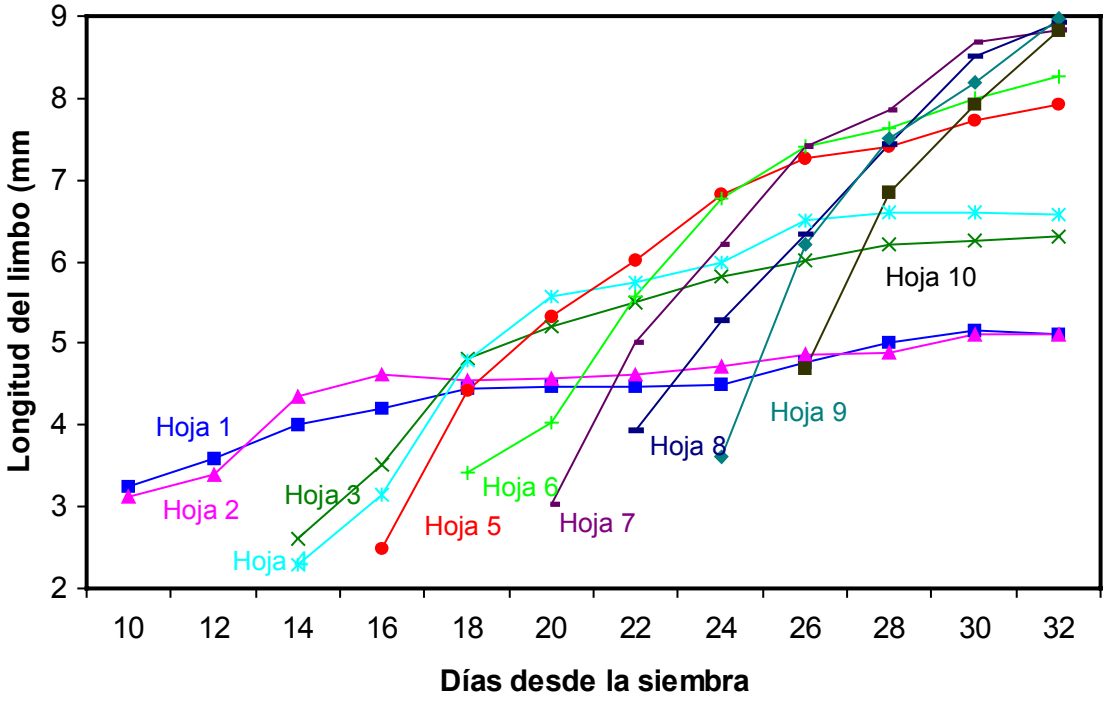


Figura 22.- Variación con respecto al tiempo de la longitud de las hojas vegetativas de En-2.

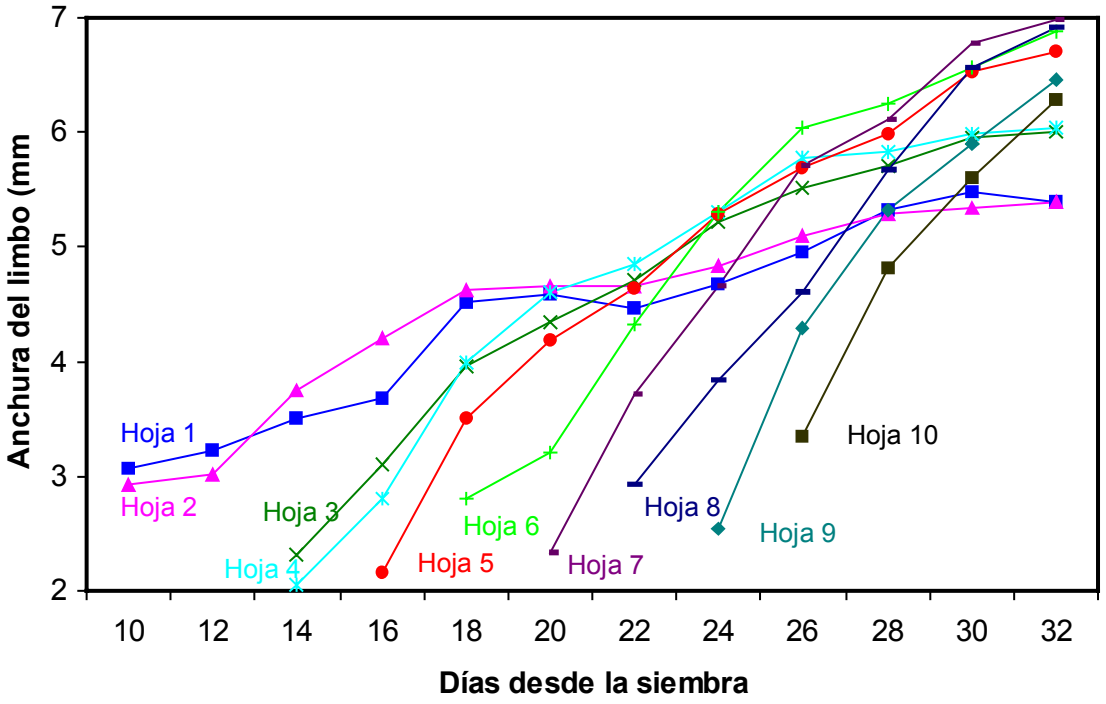


Figura 23.- Variación con respecto al tiempo de la anchura de las hojas vegetativas de En-2.

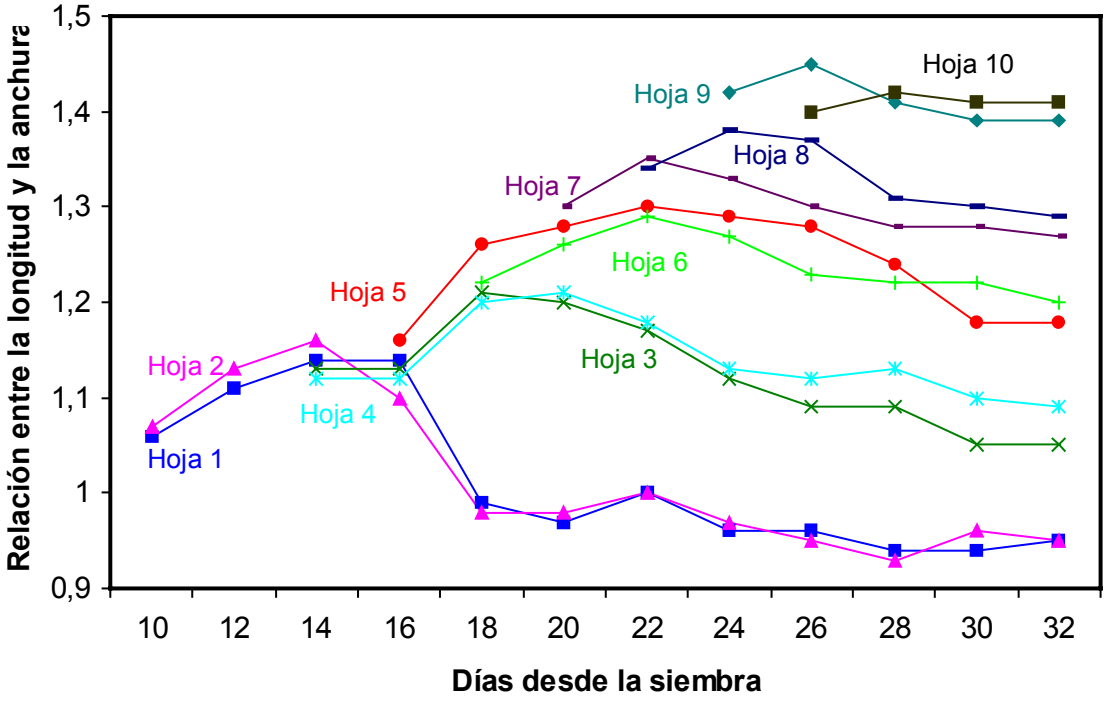


Figura 24.- Variación con respecto al tiempo de la relación entre la longitud y la anchura en las hojas vegetativas de En-2.

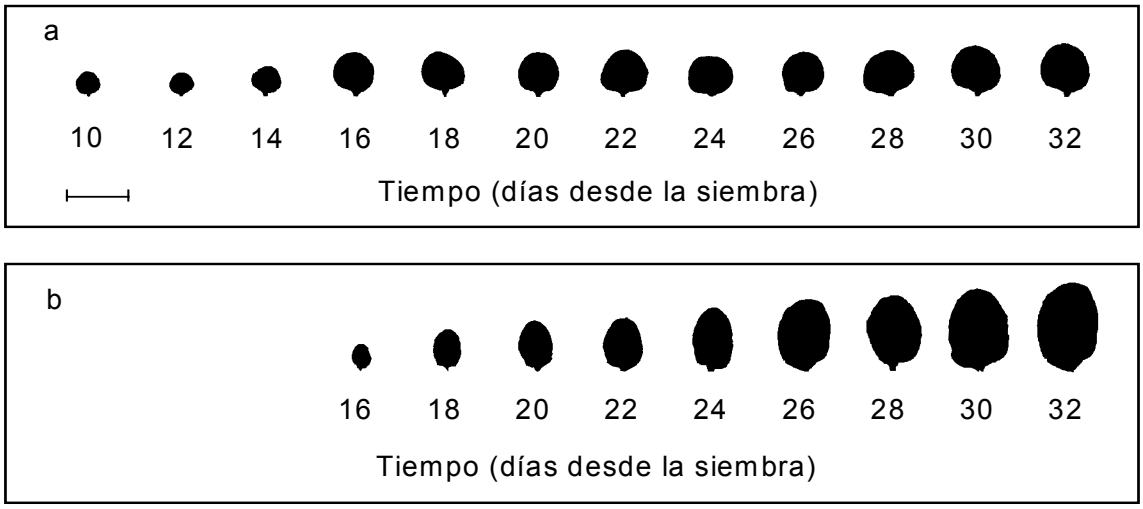


Figura 25.- Variación con respecto al tiempo de la forma y el tamaño de las hojas vegetativas de En-2. Los dibujos corresponden a especímenes representativos de la segunda (a) y la quinta (b) hoja de plantas cultivadas en idénticas condiciones. La barra de escala indica 5 mm.

IV.4.- Clasificación fenotípica de estirpes mutantes

Tal como se ha comentado antes (véanse las páginas 57 y 59) uno de los objetivos iniciales de esta Tesis era la caracterización de mutantes preexistentes. Para ello, se solicitaron del NASC y el ABRC 173 estirpes con alteraciones en la morfología de la hoja, aisladas por autores anteriores, 162 de las cuales forman parte de la colección denominada *Arabidopsis* Information Service Form Mutants, a la que nos referiremos en lo sucesivo como la "colección AIS Form Mutants". Se procedió, en primer lugar, al cultivo de estas estirpes, que fueron clasificadas en grupos fenotípicos en función de las características morfológicas que manifestaron en nuestras condiciones de cultivo, según se recoge en la Tabla 19. Puede comprobarse en esta Tabla que varias decenas de las estirpes no germinaron tras sucesivos intentos o no manifestaron fenotipo mutante alguno en nuestras condiciones de trabajo. El NASC no nos suministró algunos mutantes, que durante más de un año no estuvieron disponibles, lo que pudiera indicar que se han perdido. No recibieron atención las líneas de fenotipos sutilmente diferentes del silvestre, ni las que manifestaron expresividad variable. Con las restantes 116 estirpes se procedió a estudiar la penetrancia y la expresividad de su fenotipo mutante, así como la eventual segregación de varias clases fenotípicas dentro de una línea concreta.

IV.5.- Caracterización de mutantes

Las 116 estirpes elegidas para ser estudiadas exhibieron un fenotipo mutante estable y homogéneo, transmitiéndolo a sus descendientes sin grandes variaciones de expresividad ni penetrancia incompleta. La estabilidad de estos fenotipos mutantes se comprobó a lo largo de dos generaciones sucesivas de autofecundación.

Se describen a continuación los resultados del análisis genético de las líneas estudiadas, que fueron agrupadas en clases definidas subjetivamente, en base al más sobresaliente de sus rasgos fenotípicos, la alteración en la morfología de la hoja. Las denominaciones de estas clases fenotípicas se han tomado de una Tesis previa (Berná Amorós, 1997; Berná, Robles y Micol, pendiente de aceptación), en la que se eligieron palabras en latín que se relacionan con alguna de las características distintivas de la clase fenotípica en cuestión, inspirándose en la medida de lo posible en Stearn (1995), con las siguientes excepciones: Compact rosette, Filiforme y Calyciforme (esta Tesis), Asymmetric leaves (Rédei y Hirono, 1964) y Tortifolia (Reinholz, 1947b).

Tabla 19.- Clasificación fenotípica de las estirpes mutantes con hojas anormales

Carácter fenotípico			Estirpes
Limbo			42
	Involuto (Floración temprana)	N313, N314, N328, N329, N345, N346, N347, N348, N350, N351, N419.	11
	Involuto (Floración normal)	N242, N311, N330, N349, N353, N357, N373, N379, N400, N401, N431.	11
	Revoluto	N423, N424.	2
	Enrollado a lo largo de la vena primaria	CS3397	1
	Rotado en torno al peciolo	N378	1
	Acorazonado	N230, N321, N444, N463, CS3240, CS3250.	6
	Apuntado	N241, N333, N336.	3
	Filiforme	N325, CS3254.	2
	Pequeño y violáceo	N438, N442, N450, N461.	4
	Caliciforme	N324	1
Margen Aserrado		N243, N308, N316, N320, N322, N323, N343, N360, N363, N371, N381, N383, N384, N405, N407, N408, N415, N421, N429, N436, N437, N443, N447, N451, N452, N457, N458, CS3257, CS3138.	29
Roseta			45
	Compacta, con inflorescencia arbustiva	N303, N317, N318, N319, N331, N340, N352, N355, N356, N359, N365, N374, N387, N388, N389, N390, N398, N399, N402, N409, N416, N417.	22
	Compacta, con inflorescencia no arbustiva	N254, N307, N334, N341, N342, N354, N368, N370, N375, N377, N380, N403, N411, N420, N422, N425, N427, N428, N445, N446, N454, N455, N462.	23
Otros			57
	Con aspecto silvestre	N300, N302, N304, N305, N312, N315, N326, N327, N335, N337, N338, N339, N344, N361, N362, N364, N367, N369, N376, N385, N386, N392, N393, N396, N397, N410, N412, N413, N430, N435, N439, N440, N441, N448, N453, N459, N460.	37
	No germinaron	N301, N306, N309, N310, N372, N391, N395, N404, N406, N434.	10
	No disponibles	N332, N358, N382, N394, N414, N418, N432, N449, N456, N464.	10
TOTAL			173

BIBLIOTECA VIRTUAL

IV.5.1.- Clase fenotípica Incurvata

Los 22 mutantes asignados a esta clase, cuya denominación se ha tomado de Berná Amorós (1997), se caracterizan por presentar el margen de las hojas recurvado hacia el haz (involuto; Figura 26 y Figura 30). Varias líneas mostraron además floración temprana, por lo que se establecieron dos grupos de mutantes *incurvata,* en función del momento de la floración.

IV.5.1.1.- Mutantes *incurvata* de floración temprana

Componen este grupo las estirpes N313, N314, N328, N329, N345, N346, N347, N348, N350, N351 y N419, con hojas vegetativas y caulinares más pequeñas que las del tipo silvestre, el limbo involuto y floración muy temprana (Figura 26). Presentan además una dominancia apical fuerte, con un tallo inflorescente poco ramificado. Todas salvo N314 muestran una inflorescencia de poco porte y grosor. Las flores, especialmente las tardías, exhiben sépalos persistentes (que no se pierden tras la fertilización), arqueados, estrechos y frecuentemente transformados en carpelos abiertos, en los que se aprecia tejido estigmático y, ocasionalmente, óvulos. Los pétalos están atrofiados y en ocasiones parcialmente transformados en estambres. Los estambres contienen poco polen y el pistilo está arqueado y en algunos casos abierto.

Existe variación en el grado de la curvatura de la hoja, tanto entre diferentes estirpes *incurvata* como, en menor grado, entre los individuos de cada una de ellas. No obstante, el fenotipo de estos mutantes es siempre claramente distinguible del silvestre. El fenotipo Incurvata de las líneas N313, N328, N419 y N345 es extremo, y está acompañado en las tres primeras por un color amarillento. El fenotipo Incurvata es más débil en las líneas N351 y N329. Esta última presenta ocasionalmente hojas con el limbo arrugado y sólo sutilmente recurvado. La floración ocurre a los 15 días de la siembra.

Las hojas del mutante N314 son oscuras y no están recurvadas en la región apical. Su floración es temprana, en torno a los 20 días de la siembra. Muestra una disposición alterada de los meristemos inflorescentes, que son varios y en verticilo, y no presenta alteraciones homeóticas en las flores, que contienen escaso polen. Su fertilidad es baja, observándose desorganización de los órganos florales.

Los cruzamientos de estas estirpes *incurvata* por los ecotipos En-2 y L*er*, rindieron una progenie F_1 de fenotipo silvestre. La segregación observada en la descendencia F_2 de la autofecundación de los individuos F_1 indicó en todos los casos el carácter monogénico y recesivo del fenotipo mutante (Tabla 20).

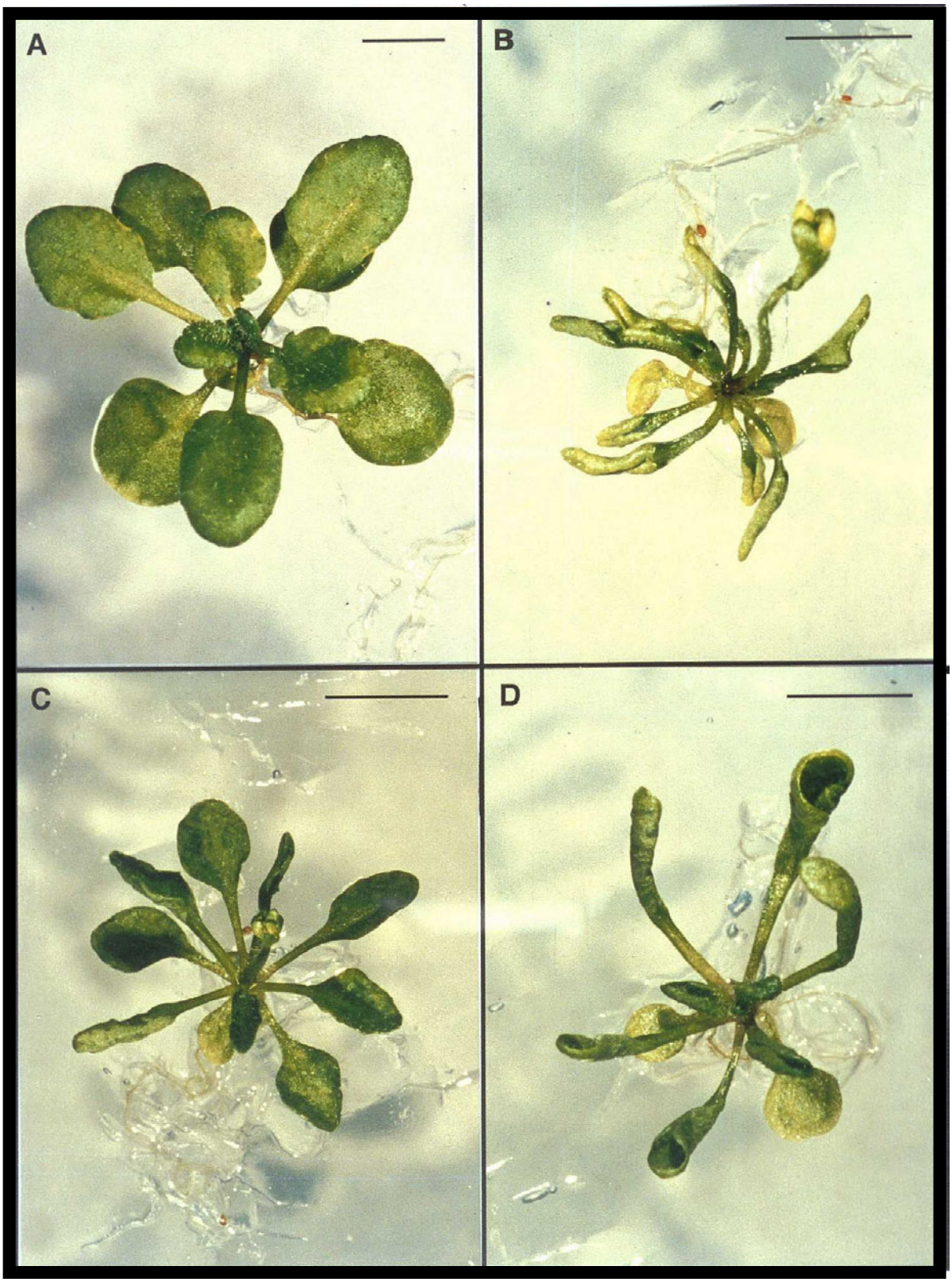


Figura 26.- Individuos representativos de la clase fenotípica Incurvata de floración temprana. La imagen A corresponde al ecotipo En-2. Los mutantes ilustrados en las fotografías son los siguientes: (B) N345 (*icu1-3/icu1-3*), (C) N329 (*icu2/icu2*) y (D) N314 (*icu3/icu3*). Las fotografías se obtuvieron 21 días después de la siembra. Todas las barras de escala indican 5 mm.

Tabla 20.- Estudio del modo de herencia del fenotipo Incurvata de floración temprana

Cruzamiento[a]	F_1[b]		F_2[b]		Segregación[c]	
(**f** x **m**)	Silvestre	Mutante	Silvestre	Mutante	χ^2	P[d]
N313[e] x En-2	21	0	152	45	0,38	0,5-0,7
N313 x L*er*	15	0	75	23	0,05	0,8-0,9
N314 x En-2	6	0	89	31	0,01	0,9-0,95
N314 x L*er*	13	0	78	23	0,16	0,5-0,7
N328[e] x En-2	30	0	125	35	0,68	0,3-0,5
N328 x L*er*	10	0	82	22	0,63	0,3-0,5
N329 x En-2	6	0	49	18	0,04	0,8-0,9
N329 x L*er*	34	0	77	30	0,38	0,5-0,7
En-2 x N329	9	0	54	16	0,08	0,7-0,8
N345 x En-2	6	0	92	24	0,93	0,3-0,5
N346 x En-2	20	0	86	24	0,44	0,5-0,7
N346 x L*er*	12	0	84	25	0,15	0,7
N347 x En-2	4	0	105	26	1,59	0,3-0,5
N347 x L*er*	30	0	78	24	0,05	0,8-0,9
N350 x En-2	29	0	94	32	0,00	> 0,95
N350 x L*er*	11	0	80	18	1,96	0,1-0,2
N351 x En-2	9	0	70	22	0,01	0,9-0,95
En-2 x N351	12	0	74	19	0,81	0,3-0,5
N351 x L*er*	22	0	83	19	1,88	0,1-0,2
N419[e] x En-2	14	0	149	45	0,25	0,3-0,5
En-2 x N419	10	0	25	6	0,27	0,5-0,7
N419 x L*er*	22	0	73	28	0,27	0,5-0,7

[a]Las líneas mutantes sometidas a estudio se denotan con su número de catálogo del NASC o el ABRC (véanse las Tablas 7 a 9, en la página 66 y siguientes). La Tabla 60, en la página 152, recoge las equivalencias entre los números de catálogo y las denominaciones de alelo, definidas una vez finalizado el análisis de complementación de cada clase fenotípica.

[b]Se indica el número de individuos con fenotipo silvestre o mutante que aparecieron en las generaciones F_1 y F_2.

[c]Se expresa el valor de χ^2 obtenido al contrastar la hipótesis de que los datos observados en F_2 se ajustan a la segregación fenotípica propuesta, en este caso 3:1 (silvestre:mutante), destacándolo en cursiva cuando indicó el rechazo de la hipótesis. El valor por encima del cual hemos considerado rechazable la hipótesis nula es el correspondiente a un nivel de significación del 95%, es decir $\chi^2_{0,95}$ = 3,84 (GL = 1) en este caso y 5,99 (GL = 2), o 7,82 (GL = 3) en otras tablas de esta Tesis. Se empleó la corrección de Yates cuando existieron sólo dos clases fenotípicas.

[d]Se indica el nivel de significación, expresado en tanto por uno, correspondiente al valor de χ^2 obtenido.

[e]En la F_2 de estos cruzamientos se encontró un 25% de plantas verde amarillentas, carácter que segregaba de forma independiente a la malformación de la hoja.

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

Las tres líneas de fenotipo Incurvata más extremo y color amarillento resultaron ser dobles mutantes, ya que estos dos caracteres, la malformación de la hoja y la pigmentación anómala, segregaron independientemente en la F_2 de sus cruzamientos por estirpes silvestres. Algunos de los retrocruzamientos por En-2 se efectuaron de las dos formas recíprocas posibles, sin que se constatasen diferencias significativas. No se obtuvo descendencia de la autofecundación de N348 ni de los cruzamientos en los que participó. Esta estirpe no ha vuelto a estar disponible en la colección del NASC.

El procedimiento usual para determinar el número de genes a los que corresponden los mutantes obtenidos en una búsqueda es el análisis de complementación (Lewis, 1951; Benzer, 1957), llevando a cabo cruzamientos entre ellos y estudiando el fenotipo de su F_1. Una vez comprobado que el fenotipo Incurvata de las estirpes de este grupo se heredaba según un patrón monogénico y recesivo, se llevó a cabo su análisis de complementación, con los resultados que aparecen en la Tabla 21.

Tabla 21.- Complementación entre los mutantes *incurvata* de floración temprana

f	N313	N314	N328	N329	N345	N346	N347	N350	N351	N419
N313			-			-			-	
N314										
N328	-	+		+	-					
N329		+			+	+	+	+	+	
N345		+		+			-		-	-
N346	-	+		+	-		-	-		
N347					-	-				
N350				+	-	-	-		-	-
N351				+			-			
N419					-			-	-	

El signo + indica ausencia de fenotipo mutante en la descendencia de un cruzamiento (complementación). El signo - indica que toda la progenie del cruzamiento muestra fenotipo mutante (no complementación). Los símbolos m y f indican estirpes empleadas como parental masculino y femenino, respectivamente.

De los resultados obtenidos se deduce que existen tres grupos de complementación en esta clase fenotípica. El grupo *ICU1* incluye las estirpes N313 (*icu1-1*), N328 (*icu1-2*), N345 (*icu1-3*), N346 (*icu1-4*), N347 (*icu1-5*), N350 (*icu1-6*), N351 (*icu1-7*) y N419 (*icu1-8*). Por su parte, los genes *ICU2* e *ICU3* cuentan con un solo alelo mutante, el presente en las líneas N329 (*icu2*) y N314 (*icu3*).

Unas tres o cuatro semanas después de su siembra, se transplantaron a maceta algunas plantas de la progenie F_1 de los cruzamientos realizados para el análisis de complementación que mostraron fenotipo silvestre. Se permitió que estas plantas, presuntas dobles heterocigotas para mutaciones en dos genes *INCURVATA* distintos, completasen su ciclo de vida y se autofecundasen. Se recolectaron sus semillas F_2, que fueron sembradas en las condiciones habituales, a fin de estudiar la segregación de los fenotipos Incurvata, tal como se recoge en la Tabla 22.

Tabla 22.- Segregación fenotípica en la descendencia de cruzamientos entre mutantes *incurvata* de floración temprana

Cruzamiento	F_1		F_2							Segregación[a]	
(**f** x **m**)	+	Icu	+	Icu1	Icu2	Icu3	Icu1 Icu2	Icu1 Icu3	Icu2 Icu3	χ^2	P
N328 (*icu1-2*) x N329 (*icu2*)	5	0	60	15	16		5			1,56	0,5-0,7
N345 (*icu1-3*) x N329 (*icu2*)	7	0	54	21	16		7			0,83	0,8-0,9
N329 (*icu2*) x N345 (*icu1-3*)	9	0	54	17	19		5			0,27	> 0,95
N346 (*icu1-4*) x N329 (*icu2*)	12	0	106	40	36		10			0,81	0,8-0,9
N329 (*icu2*) x N346 (*icu1-4*)	10	0	56	19	17		6			0,14	> 0,95
N329 (*icu2*) x N347 (*icu1-5*)	4	0	53	16	13		6			1,05	0,7-0,8
N350 (*icu1-6*) x N329 (*icu2*)	10	0	48	16	13		6			0,60	0,8-0,9
N329 (*icu2*) x N350 (*icu1-6*)	6	0	52	22	20		4			1,77	0,5-0,7
N329 (*icu2*) x N351 (*icu1-7*)	8	0	64	15	16		4			3,05	0,3-0,5
N328 (*icu1-2*) x N314 (*icu3*)	8	0	60	14		11		5		4,34	0,2-0,3
N345 (*icu1-3*) x N314 (*icu3*)	8	0	89	29		32		10		0,18	> 0,95
N329 (*icu2*) x N314 (*icu3*)	7	0	71		17	15			5	4,07	0,2-0,3

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 20, en la página 99. [a]Se expresa el valor de χ^2 obtenido al contrastar la hipótesis de que los datos observados en F_2 se ajustan a la segregación fenotípica 9:3:3:1. El signo + indica fenotipo silvestre.

En todos los casos fue posible distinguir inequívocamente en la F_2 entre los individuos homocigóticos para una u otra de las dos mutaciones *incurvata* implicadas y los presuntos dobles mutantes, dado el fenotipo extremo de estos últimos. En todos los casos estudiados se encontraron cuatro clases fenotípicas en F_2, cuyas proporciones se ajustaron aceptablemente a la segregación esperada de un cruzamiento dihíbrido, la 9:3:3:1, en donde 9/16 corresponden al fenotipo silvestre. Se distinguieron a este respecto dos situaciones distintas (Figura 27). En algunos casos, la clase minoritaria (los dobles mutantes *icu1 icu3* e *icu2 icu3*) manifestó de manera meramente aditiva los rasgos fenotípicos de las otras dos clases mutantes. Por el contrario, en los dobles

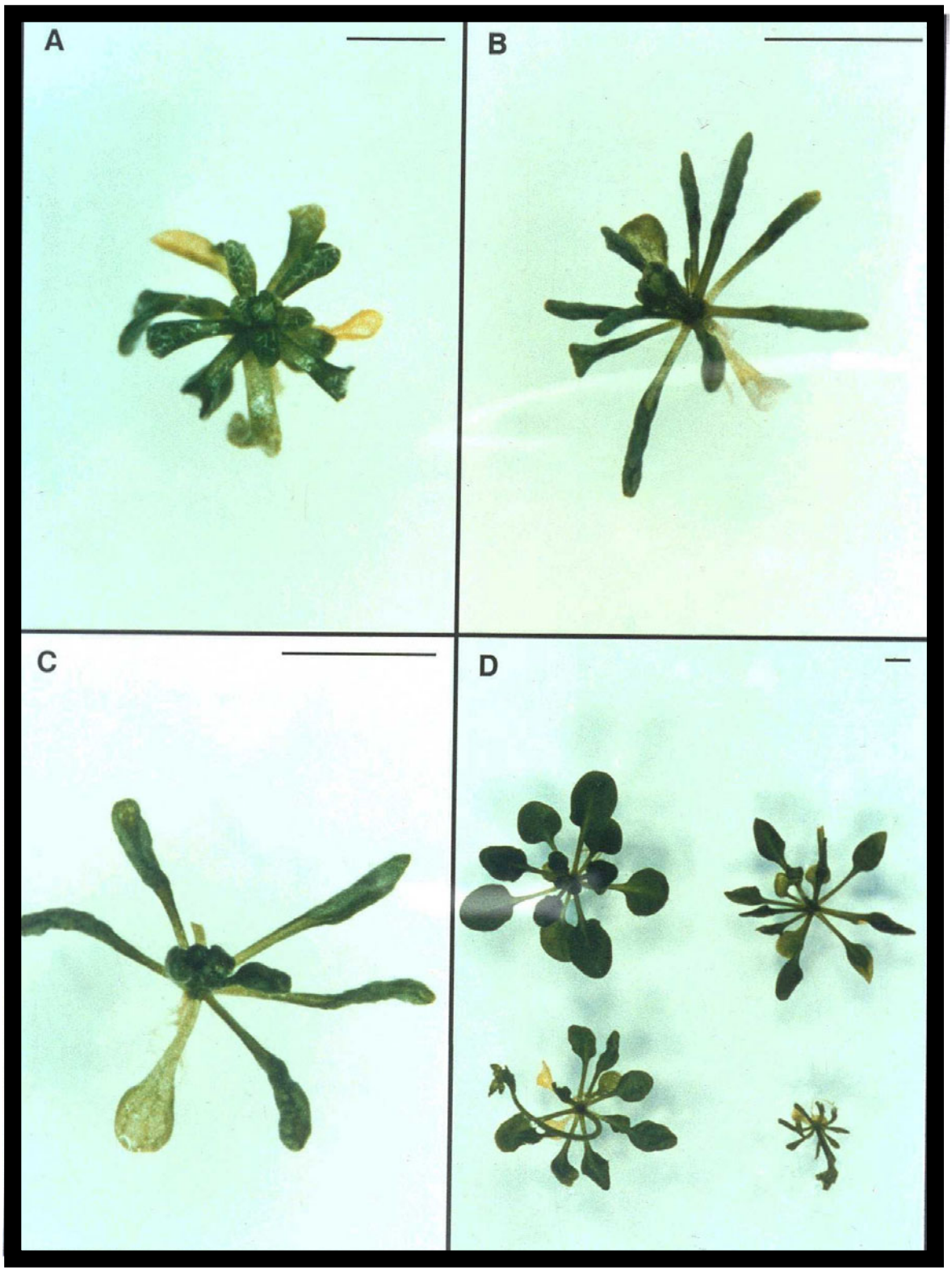


Figura 27.- Individuos representativos del fenotipo de los dobles mutantes *incurvata*. (A) *icu1-3*/*icu1-3*;*icu2*/*icu2*, (B) *icu1-3*/*icu1-3;icu3*/*icu3*, (C) *icu2*/*icu2;icu3*/*icu3*, y (D) En-2 (arriba, a la izquierda), *icu1-3*/*icu1-3* (arriba, a la derecha), *icu2*/*icu2* (abajo, a la izquierda) e *icu1-3*/*icu1-3*; *icu2*/*icu2* (abajo, a la derecha). Las fotografías se obtuvieron 20 días después de la siembra. Todas las barras de escala indican 5 mm.

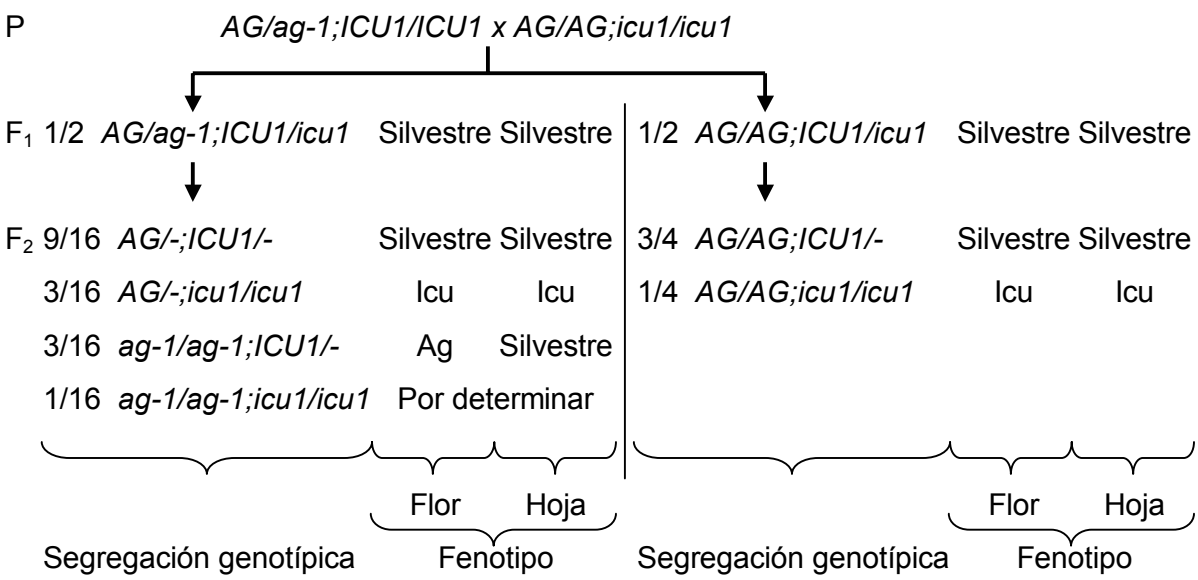
mutantes *icu1 icu2* se observa una clara sinergia entre estas dos mutaciones, ya que el fenotipo es extremo, con hojas muy pequeñas, floración muy temprana (12 días tras la siembra) y severas alteraciones en las flores, patentes tanto en las tardías como en las tempranas. No se encontraron diferencias significativas entre cruzamientos recíprocos. La intensidad del fenotipo de los dobles mutantes portadores de un alelo *icu1* se correspondió con lo observado en los mutantes individuales.

IV.5.1.1.1.- Estudio de la relación entre los genes *INCURVATA* y *AGAMOUS*

El fenotipo pleiotrópico asociado a las mutaciones en los genes *ICU1* e *ICU2* incluye entre otros algunos rasgos similares a los descritos para las mutaciones *apetala2* (Bowman *et al*., 1989), concretamente, la transformación homeótica de los sépalos en carpelos y de los pétalos en estambres o pétalos estaminoides, que se han observado también tras la expresión constitutiva del gen *AGAMOUS* en toda la planta (Mizukami y Ma, 1992). En este segundo caso las plantas transgénicas muestran, además del fenotipo Apetala2 en la flor, una alteración de la estructura de las hojas vegetativas consistente en su curvatura. Estos indicios nos llevaron a plantearnos la posibilidad de que el fenotipo Incurvata pudiera deberse a la desrepresión ectópica de *AGAMOUS* en la hoja, un órgano en el que este gen no se expresa en los individuos del tipo silvestre (Yanofsky *et al*., 1990). De ser cierta esta hipótesis, la represión de *AG* en la hoja y en otros órganos sería una de las funciones de los genes *ICU1* e *ICU2*, cuyas mutaciones causan un fenotipo similar al Apetala2. Se sigue de esta hipótesis la predicción de que el fenotipo Incurvata debe normalizarse, o incluso desaparecer, en los dobles mutantes *icu ag*, en los que la ausencia de la función *AG* impide, obviamente, su desrepresión.

IV.5.1.1.1.1.- Análisis de las interacciones entre *ICU1* y *AG*

A fin de verificar la hipótesis propuesta en el apartado anterior, se cruzaron individuos de la estirpe mutante N345 (*icu1-3/icu1-3*) por otros de la estirpe NW25, que es portadora de las mutaciones recesivas *ag-1* y *erecta* (*er*; véase la **Tabla 9**, en la página 75). Dado que los individuos *ag-1*/*ag-1* son estériles, es necesario cruzar varios individuos NW25 fenotípicamente silvestres, cuyo genotipo puede ser *AG*/*AG* o *AG*/*ag-1*, ya que proceden de la autofecundación de un heterocigoto. El procedimiento se indica a continuación para aquellos individuos NW25 que son heterocigotos para el alelo mutante *ag-1*:



La obtención de dobles mutantes *ag-1/ag-1;icu1-3/icu1-3* debería permitirnos establecer la eventual existencia de interacciones entre estos dos genes. En efecto, la presencia simultánea de los fenotipos Agamous e Incurvata en estos individuos indicaría la ausencia de interacción entre los genes *AG* e *ICU1*. Una reducción de la intensidad de uno o los dos fenotipos mutantes sugeriría la existencia de interacciones y podría constituir un indicio de la validez de la hipótesis del papel represor del gen *ICU1* sobre *AG*.

Se efectuaron varios cruzamientos entre individuos *icu1-3*/*icu1-3* y NW25, cuya descendencia F_1 presentó, en su totalidad, hojas y flores normales. Se eligieron cuatro plantas al azar, cada una de ellas procedente de un cruzamiento distinto, a fin de estudiar la segregación fenotípica en la progenie F_2 resultante de su autofecundación, que se recoge en la Tabla 23.

Tabla 23.- Segregación fenotípica en la descendencia F_2 de cruzamientos entre mutantes *icu1-3* y *ag-1*

Familia F_2	Hoja silvestre y flor silvestre	Hoja Incurvata y flor Incurvata	Hoja silvestre y flor Agamous	Hoja Incurvata y flor Agamous	Presunto genotipo del progenitor F_1
1	15	3	5	0	*AG/ag-1;ICU1/icu1-3*
2	29	4	4	0	*AG/ag-1;ICU1/icu1-3*
3	20	5	0	0	*AG/AG;ICU1/icu1-3*
4	30	7	0	0	*AG/AG;ICU1/icu1-3*

Todos los individuos de la F_1 de los cuatro cruzamientos mostraron fenotipo silvestre.

Se aprecia en la Tabla 23 que no se obtuvieron plantas que presentasen simultáneamente hojas Incurvata y flores Agamous. La explicación de este hecho es

trivial para las familias F_2 con los números 3 y 4, ya que la ausencia de individuos con flores Agamous indica que su progenitor F_1 no era portador de la mutación *ag-1*. Sin embargo, la ausencia de plantas con los dos fenotipos mutantes en las familias 1 y 2 apoya la hipótesis que se pretendía contrastar. En efecto, si el fenotipo de hoja Incurvata se debe a la expresión ectópica de *AGAMOUS* en este órgano, la homocigosis de este gen para uno de sus alelos mutantes, *ag-1*, debería corregir total o parcialmente la aberración morfológica. No obstante, la observación puede también explicarse de otros dos modos alternativos: (a) por el número de plantas estudiadas, que era relativamente bajo, por lo que la probabilidad de encontrar un doble mutante sería pequeña, y/o (b) por la eventual existencia de ligamiento entre los *loci ICU1* y *AG*, lo que determinaría que la frecuencia de dobles mutantes fuera bastante menor de lo esperado para su segregación independiente, ya que en los cruzamientos realizados las mutaciones a estudio se encuentran en fase de repulsión. Se decidió, en consecuencia, establecer familias F_3 con la descendencia resultante de la autofecundación de varias plantas F_2 de las familias 1 y 2 de la Tabla 23, seleccionando para ello algunos individuos de fenotipo silvestre y otros con fenotipo Incurvata. Se excluyeron de dicho seguimiento las plantas con fenotipo Agamous, ya que son estériles, tal como antes se mencionó. Se recogen en la Tabla 24 los resultados de la siembra de estas semillas F_3, indicándose aquellos casos en los que se observó además la aparición del fenotipo Erecta, correspondiente a otra de las mutaciones presentes en el genoma de NW25.

Los datos contenidos en la Tabla 24 permiten afirmar que se habían obtenido en las plantas F_2 todas las posibles combinaciones genéticas que se perseguían. La casuística encontrada en el análisis de la descendencia de los individuos F_2 de fenotipo silvestre corresponde a los tres tipos de familias F_3 que se comentan a continuación.

(a) Aquéllas que, como la 1.7 y la 2.8, incluyeron una sola clase fenotípica, integrada por individuos de fenotipo silvestre, lo que nos hizo suponer que su progenitor F_2 era homocigótico para los alelos silvestres de los genes *ICU1* y *AG*.

(b) Las que presentaron dos clases fenotípicas: silvestre y Agamous (2.2 y 2.30), cuyo parental F_2 debía ser *AG*/*ag-1*;*ICU1*/*ICU1,* o silvestre e Incurvata (como la 1.3 y 2.3), presuntamente descendientes de una planta F_2 de genotipo *AG*/*AG*;*ICU1*/*icu1-3*.

Tabla 24.- Segregación fenotípica en las familias F_3 obtenidas a partir de cruzamientos entre mutantes *icu1-3* y *ag-1*

Familia[a]	Fenotipo del progenitor F_2	F_3 Hoja silvestre y flor silvestre	F_3 Hoja Incurvata y flor Incurvata	F_3 Hoja silvestre y flor Agamous	Presunto genotipo del progenitor F_2
1.1	Silvestre	57	19	0	*AG/AG;ICU1/icu1-3*
1.2	Silvestre	51	13	21	*AG/ag-1;ICU1/icu1-3*
1.3	Silvestre	66	30	0	*AG/AG;ICU1/icu1-3*
1.4[c]	Silvestre	32	0	0	*AG/AG;ICU1/ICU1*
1.5	Silvestre	22	5	8	*AG/ag-1;ICU1/icu1-3*
1.6	Silvestre	40	12	0	*AG/AG;ICU1/icu1-3*
1.7[c]	Silvestre	94	0	0	*AG/AG;ICU1/ICU1*
1.8[c]	Silvestre	50	0	0	*AG/AG;ICU1/ICU1*
1.9	Silvestre	54	16	19	*AG/ag-1;ICU1/icu1-3*
1.10[c]	Silvestre	20	3	0	*AG/AG;ICU1/icu1-3*
1.11[b]	Incurvata	0	38	14[e]	*AG/ag-1;icu1-3/icu1-3*
1.12[b]	Silvestre	40	7	0	*AG/AG;ICU1/icu1-3*
1.13[c]	Silvestre	61	0	0	*AG/AG;ICU1/ICU1*
1.14[b]	Incurvata	0	15	0	*AG/AG;icu1-3/icu1-3*
2.1	Silvestre	66	15	0	*AG/AG;ICU1/icu1-3*
2.2[c]	Silvestre	63	0	17	*AG/ag-1;ICU1/ICU1*
2.3	Silvestre	40	10	0	*AG/AG;ICU1/icu1-3*
2.4	Silvestre	20	7	0	*AG/AG;ICU1/icu1-3*
2.5	Silvestre	12	4	0	*AG/AG;ICU1/icu1-3*
2.6	Silvestre	57	14	19	*AG/ag-1;ICU1/icu1-3*
2.7	Silvestre	92	0	0	*AG/AG;ICU1/ICU1*
2.8[c]	Silvestre	103	0	0	*AG/AG;ICU1/ICU1*
2.9[c]	Silvestre	59	0	0	*AG/AG;ICU1/ICU1*
2.10	Silvestre	13	3	0	*AG/AG;ICU1/icu1-3*
2.11[c]	Silvestre	72	26[d]	0	*AG/AG;ICU1/icu1-3*
2.12[c]	Silvestre	15	0	0	*AG/AG;ICU1/ICU1*
2.13	Silvestre	28	9	0	*AG/AG;ICU1/icu1-3*
2.14	Silvestre	20	3	0	*AG/AG;ICU1/icu1-3*
2.15[c]	Silvestre	54	0	0	*AG/AG;ICU1/ICU1*
2.16[b]	Silvestre	14	4	0	*AG/AG;ICU1/icu1-3*
2.17[c]	Silvestre	12	5[d]	0	*AG/AG;ICU1/icu1-3*
2.18	Silvestre	30	7	0	*AG/AG;ICU1/icu1-3*
2.19	Silvestre	30	8	0	*AG/AG;ICU1/icu1-3*
2.20[b]	Silvestre	19	6	0	*AG/AG;ICU1/icu1-3*
2.21	Silvestre	30	6	0	*AG/AG;ICU1/icu1-3*
2.22	Silvestre	54	16	23	*AG/ag-1;ICU1/icu1-3*
2.23	Silvestre	4	3	0	*AG/AG;ICU1/icu1-3*
2.24	Silvestre	8	2	0	*AG/AG;ICU1/icu1-3*

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

Tabla 24 (continuación).- Segregación fenotípica en las familias F_3 obtenidas a partir de cruzamientos entre mutantes *icu1-3* y *ag-1*

Familia[a]	Fenotipo del progenitor F_2	F_3			Presunto genotipo del progenitor F_2
		Hoja silvestre y flor silvestre	Hoja Incurvata y flor Incurvata	Hoja silvestre y flor Agamous	
2.25	Silvestre	6	2	0	*AG/AG;ICU1/icu1-3*
2.26	Silvestre	8	4	0	*AG/AG;ICU1/icu1-3*
2.27	Incurvata	0	68	19[e]	*AG/ag-1;icu1-3/icu1-3*
2.28[b]	Incurvata	0	21	0	*AG/AG;icu1-3/icu1-3*
2.29	Incurvata	0	14	5[e]	*AG/ag-1;icu1-3/icu1-3*
2.30[c]	Silvestre	30	0	12	*AG/ag-1;ICU1/ICU1*
2.31[c]	Silvestre	18	0	0	*AG/AG;ICU1/ICU1*
2.32	Silvestre	7	1	0	*AG/AG;ICU1/icu1-3*

[a]Las familias se denotan con dos números separados por un punto, el primero de los cuales indica el individuo F_1 del que derivan (véase la primera columna de la Tabla 23). [b]No aparecieron plantas con fenotipo Erecta en la F_3. [c]Todas las plantas de la F_3 presentan fenotipo Erecta. [d]La floración de las plantas que manifiestan a la vez los fenotipos Incurvata y Erecta no es tan temprana como la de las que son Incurvata pero no son Erecta. [e]Todas las plantas son de floración temprana y con hoja aserrada.

(c) Las que incorporaban tres clases fenotípicas, con individuos silvestres, Agamous o Incurvata (1.2, 1.9, 2.6 y 2.22). En estas familias, las proporciones relativas de los fenotipos de hoja silvestre y de hoja Incurvata se ajustan aceptablemente a una segregación mendeliana 3:1, pero lo hacen aún mejor a la proporción 13:3, la correspondiente a una epistasia con interacción entre genes dominantes y recesivos (véase la Tabla 25), hipótesis que implica asumir que la morfología de las hojas en los individuos de genotipos *AG/-;ICU1/-*, *ag-1/ag-1;ICU1/-* y *ag-1/ag-1;icu1-3/icu1-3* son normales. No cabe, en este caso, justificar la ausencia de individuos con ambos fenotipos mutantes por el bajo número de plantas estudiados.

Tabla 25.- Segregación del fenotipo Incurvata en las familias F_3 obtenidas a partir de cruzamientos entre mutantes *icu1-3* y *ag-1*

Familia[a]	Hoja silvestre	Hoja Incurvata	χ^2 (3:1)	P (3:1)	χ^2 (13:3)	P (13:3)
1.2	72	13	3,77	0,05-0,1	0,46	0,5
1.9	73	16	1,98	0,2-0,1	0,00	> 0,95
2.6	76	14	3,79	0,05-0,1	0,41	0,5-0,7
2.22	77	16	2,61	0,2-0,1	0,06	0,8

Todos los progenitores F_2 eran silvestres.

En cuanto a las plantas F_2 con fenotipo Incurvata, al menos dos, las fundadoras de las familias 1.14 y 2.28, resultaron ser *AG/AG;icu1-3/icu1-3*, lo que se deduce del hecho de que toda su descendencia presentó, sin excepción, flores y hojas Incurvata, sin ninguna otra alteración estructural.

Ninguno de los resultados de la Tabla 24 comentados hasta aquí es suficientemente informativo en lo referente al contraste de la hipótesis antes propuesta acerca de la represión que *ICU1* ejerce sobre *AG*. No cabe decir lo mismo acerca de las familias 1.11, 2.27 y 2.29, cuyo parental F_2 mostraba fenotipo Incurvata. En efecto, un 25% de sus miembros presentó hojas casi totalmente normales, ligeramente aserradas, floración temprana y flores Agamous, mientras que los individuos del 75% restante mostraban las características típicas del fenotipo Incurvata de su progenitor. Estos resultados apoyan inequívocamente nuestra hipótesis inicial, ya que todos los miembros de las familias 1.11, 2.27 y 2.29 son, necesariamente, homocigóticos para el alelo mutante *icu1-3,* y la explicación más simple al hecho de que 1/4 de ellos no presenten fenotipo Incurvata es la epistasia de *AG* sobre *ICU1*. La condición de dobles mutantes de estos últimos individuos se ve confirmada por el fenotipo Agamous de la flor, consecuencia de la homocigosis para *ag-1*, y su floración temprana, un efecto de la homocigosis para *icu1-3*. Esta suposición se ve confirmada si se establecen cuatro clases fenotípicas entre los miembros de las familias que incluyen individuos con flor Agamous, las que se indican en la Tabla 26. En esta Tabla se recogen los resultados del contraste de la hipótesis de que las mutaciones *icu1-3* y *ag-1* segregan independientemente, según las proporciones fenotípicas que cabe esperar de un cruzamiento dihíbrido para mutaciones en dos genes independientes que no interaccionan entre sí.

Tabla 26.- Segregación del fenotipo presuntamente doble mutante en las familias F_3 obtenidas a partir de cruzamientos entre mutantes *icu1-3* y *ag-1*

Familia	Hoja silvestre y flor silvestre	Hoja Incurvata y floración temprana	Hoja silvestre y flor Agamous	Hoja casi silvestre, floración temprana y flor Agamous	Segregación	
					χ^2	P
1.2	51	13	19	2	2,65	0,3-0,5
1.9	54	16	14	5	0,83	0,8-0,9
2.6	57	14	14	5	1,85	0,5-0,7
2.22	54	16	16	7	0,53	0,9-0,95

Se expresa el valor de χ^2 obtenido al contrastar la hipótesis de que los datos observados en F_3 se ajustan a la segregación 9:3:3:1.

Otra de las conclusiones que se pueden extraer de los datos de la Tabla 24 es que el carácter Erecta (roseta compacta y tallos inflorescentes rígidos) aparece con mucha más frecuencia entre los individuos con hojas completamente normales que en los de fenotipo Incurvata, lo que indica que el gen *ICU1* pertenece al mismo grupo de ligamiento que *ER*, que se ubica en el cromosoma 2 (Rédei y Hirono, 1964). Además, las plantas que muestran a la vez los rasgos Incurvata y Erecta presentan floración temprana, pero no tanto como las *icu1-3/icu1-3*, lo que sugiere que la mutación *erecta*, o alguna otra en un gen cercano a *ER* y presente en el ecotipo L*er*, modifica el efecto de floración temprana que produce la mutación *incurvata1-3*.

Con el fin de confirmar de manera definitiva la hipótesis de la represión de *AG* por *ICU1*, se completó el análisis genético de la interacción entre estos dos genes continuando el estudio en la generación F_4 de los cruzamientos entre mutantes *icu1-3* y *ag-1*. Para ello, se recogieron semillas de plantas F_3, en unos casos individualmente y en otros agrupando a todos los individuos de una misma familia. Estas últimas agrupaciones se utilizaron como control en familias supuestamente homocigotas, en las que no cabía esperar segregación alguna. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 27. Los datos de esta Tabla confirman la hipótesis de partida, al aportar más ejemplos de presuntos dobles mutantes *icu1-3 ag-1* con hojas casi totalmente normales y flores Agamous.

Los resultados comentados hasta aquí nos llevaron a considerar suficientemente establecido que *icu1-3*, la mutación en el gen *ICU1* de la que es portadora la estirpe N345, se comporta como un alelo hipomorfo o nulo de un gen que actúa como un represor de *AGAMOUS* (Figura 28A). Se intentó, a continuación, demostrar que no existía especificidad de alelo en dicha relación funcional, en otras palabras, que el comportamiento de *icu1-3* en sus interacciones con *ag-1* se reproducía con otros alelos del gen *ICU1*, resultando ser, en consecuencia, una propiedad de este gen y no una peculiaridad de sólo uno de sus alelos. Para ello, se realizaron cruces entre NW25 y N347, homocigótica para el alelo *icu1-5*, cuya descendencia F_1 presentó fenotipo silvestre, como era de esperar, tanto en lo referente a la hoja como a la flor. Tras la siembra de semillas F_2 procedentes de la autofecundación de tres de estas plantas F_1 se encontraron las segregaciones fenotípicas que recoge la Tabla 28. No se observaron diferencias entre *icu1-3* e *icu1-5* en sus interacciones con *ag-1*, ya que los resultados de la Tabla 28 son análogos a los de la Tabla 23 (véase la página 104). También fueron

Tabla 27.- Segregación fenotípica en las familias F_4 obtenidas a partir de cruzamientos entre mutantes *icu1-3* y *ag-1*

Familia	Fenotipo del progenitor F_3	F_4			Presunto genotipo del progenitor F_3
		Hoja silvestre y flor silvestre	Hoja Incurvata y flor Incurvata	Hoja silvestre y flor Agamous	
1.7[d]	Silvestre	52	0	0	*AG/AG;ICU1/ICU1*
1.14[d]	Incurvata	0	30	0	*AG/AG;icu1-3/icu1-3*
2.28[d]	Incurvata	0	55	0	*AG/AG;icu1-3/icu1-3*
2.31[d]	Silvestre	59	0	0	*AG/AG;ICU1/ICU1*
1.9.1	Silvestre	24	6	12	*AG/ag-1;ICU1/icu1-3*
1.9.2	Silvestre	18	15	0	*AG/AG;ICU1/icu1-3*
1.9.3	Silvestre	24	7	13	*AG/ag-1;ICU1/icu1-3*
1.9.4	Silvestre	31	4	13	*AG/ag-1;ICU1/icu1-3*
1.9.5	Silvestre	13	3	5	*AG/ag-1;ICU1/icu1-3*
1.9.6	Silvestre	40	0	0	*AG/AG;ICU1/ICU1*
1.9.7	Silvestre	36	10	14	*AG/ag-1;ICU1/icu1-3*
1.9.8	Silvestre	32	6	10	*AG/ag-1;ICU1/icu1-3*
1.9.9	Silvestre	46	0	0	*AG/AG;ICU1/ICU1*
1.9.10	Silvestre	31	0	14	*AG/ag-1;ICU1/ICU1*
1.9.11	Silvestre	32	0	10	*AG/ag-1;ICU1/ICU1*
1.9.12	Silvestre	50	0	0	*AG/AG;ICU1/ICU1*
1.9.13	Silvestre	16	3	7	*AG/ag-1;ICU1/icu1-3*
1.9.14	Silvestre	29	0	8	*AG/ag-1;ICU1/ICU1*
1.9.15	Silvestre	32	0	9	*AG/ag-1;ICU1/ICU1*
1.9.16	Silvestre	20	5	8	*AG/ag-1;ICU1/icu1-3*
1.9.17	Silvestre	12	4	0	*AG/AG;ICU1/icu1-3*
1.9.18	Silvestre	12	0	0	*AG/AG;ICU1/ICU1*
1.9.19	Incurvata	0	10	5[a]	*AG/ag-1;icu1-3/icu1-3*
1.9.20	Silvestre	7	0	1	*AG/AG;ICU1/ICU1*
1.11.1	Incurvata	0	39	12[a]	*AG/ag-1;icu1-3/icu1-3*
1.11.2	Incurvata	0	41	0	*AG/ag-1;icu1-3/icu1-3*
1.11.3	Incurvata	0	39	7[a]	*AG/ag-1;icu1-3/icu1-3*
1.11.4	Incurvata	0	30	13[a]	*AG/ag-1;icu1-3/icu1-3*
1.11.5	Incurvata	0	12	0	*AG/AG;icu1-3/icu1-3*
1.11.6	Incurvata	0	30	0	*AG/AG;icu1-3/icu1-3*
1.11.7	Incurvata	0	12	6[a]	*AG/ag-1;icu1-3/icu1-3*
1.11.8	Incurvata	0	46	17[a]	*AG/ag-1;icu1-3/icu1-3*
1.11.9	Incurvata	0	51	0	*AG/AG;icu1-3/icu1-3*
1.11.10	Incurvata	0	53	19[a]	*AG/ag-1;icu1-3/icu1-3*
1.11.11	Incurvata	0	48	0	*AG/AG;icu1-3/icu1-3*
1.11.12	Incurvata	0	46	16[a]	*AG/ag-1;icu1-3/icu1-3*
1.11.13	Incurvata	0	58	0	*AG/AG;icu1-3/icu1-3*
1.11.14	Incurvata	0	12	0	*AG/AG;icu1-3/icu1-3*

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

Tabla 27 (continuación).- Segregación fenotípica en las familias F_4 obtenidas a partir de cruzamientos entre mutantes *icu1-3* y *ag-1*

Familia	Fenotipo del progenitor F_2	F_3			Presunto genotipo del progenitor F_3
		Hoja silvestre y flor silvestre	Hoja Incurvata y flor Incurvata	Hoja silvestre y flor Agamous	
1.11.15	Incurvata	0	26	16[a]	*AG/ag-1;icu1-3/icu1-3*
1.11.16	Incurvata	0	24	13[a]	*AG/ag-1;icu1-3/icu1-3*
1.11.17	Incurvata	0	37	13[a]	*AG/ag-1;icu1-3/icu1-3*
1.11.18	Incurvata	0	13	10[a]	*AG/ag-1;icu1-3/icu1-3*
2.27.1	Incurvata	0	24	8[a]	*AG/ag-1;icu1-3/icu1-3*
2.27.2	Incurvata	0	14	2[a]	*AG/ag-1;icu1-3/icu1-3*
2.27.3	Incurvata	0	38	0	*AG/AG;icu1-3/icu1-3*
2.27.4	Incurvata	0	22	13[a]	*AG/ag-1;icu1-3/icu1-3*
2.27.5	Incurvata	0	43	0	*AG/AG;icu1-3/icu1-3*
2.27.6	Incurvata	0	25	13[b]	*AG/ag-1;icu1-3/icu1-3*
2.27.7	Incurvata	0	27	0	*AG/AG;icu1-3/icu1-3*
2.27.8	Incurvata	0	22	13[a]	*AG/ag-1;icu1-3/icu1-3*
2.27.9	Incurvata	0	5	0	*AG/AG;icu1-3/icu1-3*
2.27.10[c]	Incurvata				
2.27.11[c]	Incurvata				
2.27.12	Incurvata	0	28	14[a]	*AG/ag-1;icu1-3/icu1-3*
2.27.13	Incurvata	0	30	10[a]	*AG/ag-1;icu1-3/icu1-3*
2.27.14	Incurvata	0	38	0	*AG/AG;icu1-3/icu1-3*
2.27.15	Incurvata	0	26	0	*AG/AG;icu1-3/icu1-3*
2.27.16	Incurvata	0	15	12[a]	*AG/ag-1;icu1-3/icu1-3*
2.27.17	Incurvata	0	46	14[a]	*AG/ag-1;icu1-3/icu1-3*
2.27.18	Incurvata	0	11	3[a]	*AG/ag-1;icu1-3/icu1-3*
2.27.19	Incurvata	0	29	6[a]	*AG/ag-1;icu1-3/icu1-3*
2.27.20	Incurvata	0	22	5[a]	*AG/ag-1;icu1-3/icu1-3*
2.27.21[c]	Incurvata				
2.27.22	Incurvata	0	12	0	*AG/AG;icu1-3/icu1-3*
2.27.24	Incurvata	0	19	0	*AG/AG;icu1-3/icu1-3*
2.29.1	Incurvata	0	34	14[a]	*AG/ag-1;icu1-3/icu1-3*
2.29.2	Incurvata	0	13	0	*AG/AG;icu1-3/icu1-3*
2.29.3	Incurvata	0	13	6[a]	*AG/ag-1;icu1-3/icu1-3*
2.29.4	Incurvata	0	6	1[a]	*AG/ag-1;icu1-3/icu1-3*
2.29.5	Incurvata	0	33	14[a]	*AG/ag-1;icu1-3/icu1-3*
2.29.6[c]	Incurvata				
2.29.7[c]	Incurvata				

[a]Todos los individuos presentaron hoja aserrada y floración temprana; [b]Todos presentaron floración muy temprana, pero la hoja no era aserrada; [c]No germinó ninguna semilla; [d]Se recolectaron y mezclaron las semillas de todas las plantas de este grupo, puesto que eran presuntamente idénticas en cuanto a los rasgos a estudio.

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

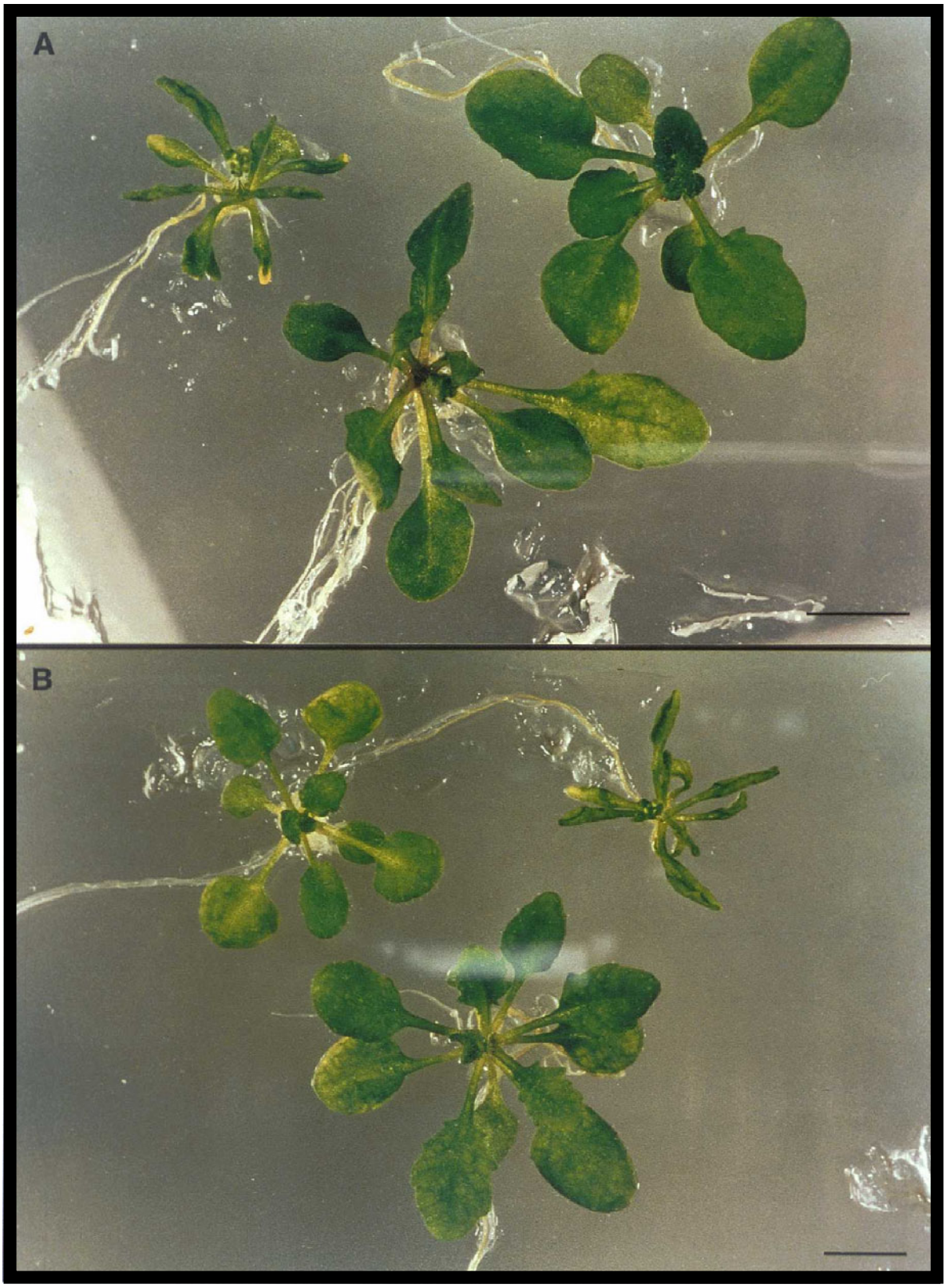


Figura 28.- Individuos representativos de los fenotipos que indican la interacción entre las mutaciones en *ICU1* y *AG*. (A) En-2 (arriba, a la derecha), *icu1-3*/*icu1-3* (arriba, a la izquierda), e *icu1-3*/*icu1-3;ag-1*/*ag-1* (abajo); (B) En-2 (arriba, a la izquierda), *icu1-5*/*icu1-5* (arriba, a la derecha), e *icu1-5*/*icu1-5;ag-1*/*ag-1* (abajo). Las fotografías se obtuvieron 24 días después de la siembra. Las barras de escala indican 5 mm.

semejantes los resultados obtenidos para los dos alelos del gen *ICU1* al analizar la progenie F_3 de sus cruzamientos con el mutante *ag-1*, lo que puede comprobarse comparando los resultados de la Tabla 29 con los de la Tabla 24, en la página 106.

Tabla 28.- Segregación fenotípica en la descendencia F_2 de cruzamientos entre mutantes *icu1-5* y *ag-1*

Familia F_2	Hoja silvestre y flor silvestre	Hoja Incurvata y flor Incurvata	Hoja silvestre y flor Agamous	Presunto genotipo del progenitor F_1
1	82	33	38	*AG/ag-1;ICU1/icu1-5*
2	42	16	18	*AG/ag-1;ICU1/icu1-5*
3	30	12	0	*AG/AG;ICU1/icu1-5*

Tabla 29.- Segregación fenotípica en las familias F_3 obtenidas a partir de cruzamientos entre mutantes *icu1-5* y *ag-1*

Familia	Fenotipo del progenitor F_2	F_3			Presunto genotipo del progenitor F_1
		Hoja silvestre y flor silvestre	Hoja Incurvata y flor Incurvata	Hoja silvestre y flor Agamous	
1.1	Silvestre	32	8	14	*AG/ag-1;ICU1/icu1-5*
1.2[b]	Incurvata				
1.3	Incurvata	0	11	5[a]	*AG/ag-1;icu1-5/icu1-5*
1.4	Incurvata	0	34	8[a]	*AG/ag-1;icu1-5/icu1-5*
1.5	Incurvata	0	20	4[a]	*AG/ag-1;icu1-5/icu1-5*
1.6	Silvestre	31	5	11	*AG/ag-1;ICU1/icu1-5*
1.7	Silvestre	30	11	15	*AG/ag-1;ICU1/icu1-5*
1.8	Silvestre	21	4	8	*AG/ag-1;ICU1/icu1-5*
1.9	Silvestre	36	13	0	*AG/AG;ICU1/icu1-5*
1.10	Silvestre	23	5	7	*AG/ag-1;ICU1/icu1-5*
2.1	Silvestre	40	10	0	*AG/AG;ICU1/icu1-5*
2.2	Silvestre	40	0	0	*AG/AG;ICU1/icu1-5*
2.3	Silvestre	33	6	0	*AG/AG;ICU1/icu1-5*
2.4	Silvestre	29	0	0	*AG/AG;ICU1/icu1-5*
2.5	Silvestre	37	4	10	*AG/ag-1;ICU1/icu1-5*
2.6	Silvestre	41	9	0	*AG/AG;ICU1/icu1-5*
2.7	Silvestre	33	3	9	*AG/ag-1;ICU1/icu1-5*
2.8	Incurvata	0	2	0	*AG/AG;icu1-5/icu1-5*

[a]Todos estos individuos presentaban hojas ligeramente aserradas y una floración más temprana que la del tipo silvestre; [b]No germinó ninguna semilla.

IV.5.1.1.1.2.- Análisis de las interacciones entre *ICU2* y *AG*

Los resultados comentados en el apartado anterior validan la hipótesis de que el fenotipo Incurvata, la alteración de la morfología foliar asociada a las mutaciones en el

gen *INCURVATA1,* está asociada a la expresión ectópica del gen *AGAMOUS* en la hoja. Dadas las semejanzas entre las malformaciones que se observan en las flores de los mutantes *icu1* e *icu2*, y la sinergia de sus fenotipos, nos propusimos establecer si también el gen *INCURVATA2* se comportaba como un represor de *AGAMOUS*. Con este fin, se realizaron varios cruzamientos en los que se empleó la estirpe N329 (*icu2*/*icu2*) como receptora del polen de NW25, cuya progenie F_1 mostró fenotipo silvestre, tanto para la hoja como para el resto de la planta. Se estudió la descendencia de la autofecundación de 4 de estas plantas F_1, con los resultados que aparecen en la Tabla 30. En todas las familias segregó el carácter Incurvata, pero sólo en la 2, 3 y 4 segregó el fenotipo Agamous, probablemente porque la primera procedía de una planta F_1 heterocigótica para *incurvata2* y homocigótica para el alelo silvestre de *AGAMOUS*.

Tabla 30.- Segregación fenotípica en la descendencia F_2 de cruzamientos entre mutantes *icu2* y *ag-1*

Familia F_2	Hoja silvestre y flor silvestre	Hoja Incurvata y flor Incurvata	Hoja silvestre y flor Agamous	Presunto genotipo del progenitor F_1
1	41	11	0	*AG/AG;ICU2/icu2*
2	28	7	12	*AG/ag-1;ICU2/icu2*
3	26	7	14	*AG/ag-1;ICU2/icu2*
4	30	9	11	*AG/ag-1;ICU2/icu2*

En la Tabla 30 se constata la ausencia de la clase fenotípica de los individuos con hoja Incurvata y flor Agamous. Esta observación es compatible con la idea de que el fenotipo de hoja Incurvata se debe a la desrepresión ectópica de *AG* en dicho órgano, como consecuencia de una lesión en *ICU2*, cuya función sería la de reprimir a aquél. En el doble mutante, la desrepresión no podría darse, por lo que cabría esperar un fenotipo de hoja normal. Sin embargo, no puede descartarse que la ausencia de dobles mutantes sea debida a un tamaño de población bajo o a un estrecho ligamiento entre ambas mutaciones.

Para contrastar la hipótesis de la desrepresión de *AGAMOUS* como causa del fenotipo Incurvata2, se recolectaron semillas de algunas plantas F_2 de la Tabla 30, para formar familias F_3, que fueron estudiadas según recoge la Tabla 31. Los resultados obtenidos apoyan inequívocamente la hipótesis de que el gen *ICU2*, al igual que *ICU1*, reprime a *AG* en la hoja, ya que la eliminación de la función de este último en los dobles mutantes *ag-1 icu2* conlleva la normalización del fenotipo foliar característico de *icu2*,

Tabla 31.- Segregación fenotípica en las familias F_3 obtenidas a partir de cruzamientos entre mutantes *icu2* y *ag-1*

Familia	Fenotipo del progenitor F_2	F_3			Presunto genotipo del progenitor F_2
		Hoja silvestre y flor silvestre	Hoja Incurvata y flor Incurvata	Hoja silvestre y flor Agamous	
1.1	Incurvata	0	28	0	*AG/AG;icu2/icu2*
1.2	Incurvata	0	40	0	*AG/AG;icu2/icu2*
1.3	Incurvata	0	32	0	*AG/AG;icu2/icu2*
1.4	Incurvata	0	37	0	*AG/AG;icu2/icu2*
1.5	Incurvata; Erecta	0	30[a]	0	*AG/AG;icu2/icu2*
1.6	Incurvata	0	36	0	*AG/AG;icu2/icu2*
1.7	Incurvata; Erecta	0	35[a]	0	*AG/AG;icu2/icu2*
1.8	Incurvata	0	35	0	*AG/AG;icu2/icu2*
1.9	Incurvata	0	40	0	*AG/AG;icu2/icu2*
1.10	Incurvata; Erecta	0	37[a]	0	*AG/AG;icu2/icu2*
2.1	Incurvata; Erecta	0	30[a]	8[b]	*AG/ag-1;icu2/icu2*
2.2	Incurvata; Erecta	0	28[a]	14[b]	*AG/ag-1;icu2/icu2*
2.3	Silvestre	23	9	0	*AG/AG;ICU2/icu2*
2.4	Incurvata; Erecta	0	36[a]	11[b]	*AG/ag-1;icu2/icu2*
2.5	Incurvata	0	26	6[b]	*AG/ag-1;icu2/icu2*
2.6	Incurvata	0	22	11[b]	*AG/ag-1;icu2/icu2*
3.1	Incurvata	0	31	10[b]	*AG/ag-1;icu2/icu2*
3.2	Incurvata	0	28	7[b]	*AG/ag-1;icu2/icu2*
3.3	Incurvata	0	33	0	*AG/AG;icu2/icu2*
3.4	Incurvata	0	21	7[b]	*AG/ag-1;icu2/icu2*
3.5	Incurvata	0	28	10[b]	*AG/ag-1;icu2/icu2*
3.6	Incurvata	0	16	6[b]	*AG/ag-1;icu2/icu2*
3.7	Incurvata	0	40	0	*AG/AG;icu2/icu2*
3.8	Silvestre	67	20	0	*AG/AG;ICU2/icu2*
4.1	Incurvata	0	23	9[b]	*AG/ag-1;icu2/icu2*
4.2	Incurvata	0	30	8[b]	*AG/ag-1;icu2/icu2*
4.3	Incurvata	0	21	8[b]	*AG/ag-1;icu2/icu2*
4.4	Incurvata	0	36	0	*AG/AG;icu2/icu2*
4.5	Incurvata	0	26	9[b]	*AG/ag-1;icu2/icu2*
4.6	Incurvata	0	37	0	*AG/AG;icu2/icu2*
4.7	Incurvata; Erecta	0	22[a]	9[b]	*AG/ag-1;icu2/icu2*
4.8	Incurvata; Erecta	0	34[a]	0	*AG/AG;icu2/icu2*
4.9	Incurvata	0	51	8[b]	*AG/ag-1;icu2/icu2*

[a]Todos los individuos con fenotipo Incurvata manifestaron también el rasgo Erecta. Sus alteraciones en la hoja son menos extremas que en los mutantes *icu2* y su floración no es tan temprana como la de estos últimos. [b]Todas estas plantas mostraron floración más temprana que la del tipo silvestre.

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

aunque no ocurre otro tanto con el momento de la floración, que resulta algo más temprano que en el silvestre. Se observa también en este caso, como en el de *ICU1*, que la presencia de la mutación *erecta* (o la de algún gen próximo a *ER*) reduce la intensidad del fenotipo Incurvata2.

IV.5.1.1.2.- Complementación entre los mutantes *icu* y *pif*

El fenotipo de algunas líneas *incurvata*, especialmente las homocigóticas para los alelos mutantes del gen *ICU1*, es similar al de los mutantes *pif-1* (*photoperiod insensitive flowering-1*) y *pif-2*, obtenidos en el laboratorio de José Miguel Martínez Zapater (CIT-INIA, Madrid), que muestran hojas involutas y floración temprana, así como malformaciones en las flores con un cierto parecido a las que son características de las mutaciones *apetala2*. Estas estirpes *pif* fueron aisladas durante una búsqueda de mutantes con alteraciones en el tiempo de floración, y son alélicas del gen *CURLY LEAF* (*CLF*), que fue clonado en el laboratorio de George Coupland (John Innes Centre, Norwich, Reino Unido) a partir de un alelo mutante, asociado a una inserción del transposón Ds. Tras conocer estas semejanzas fenotípicas (Martínez-Zapater, comunicación personal), se realizó un análisis de complementación entre las mutaciones *icu1-3*, *icu2*, *pif-1* y *pif-2*, las dos últimas cedidas por J.M. Martínez Zapater. Los resultados de dicho análisis de complementación evidenciaron la existencia de alelismo entre *icu1-3*, *pif-1* y *pif-2*.

Tabla 32.- Complementación entre los mutantes *icu1-3*, *icu2*, *pif-1* y *pif-2*

f	*icu1-3/icu1-3*	*icu2/icu2*	*pif-1/pif-1*	*pif-2/pif-2*
icu1-3/icu1-3		+ [a]	-	-
icu2/icu2	+ [a]			
pif-1/pif-1		+		- [b]
pif-2/pif-2	-	+	- [b]	

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 21, en la página 100. [a]Resultados obtenidos previamente (véase la Tabla 21). [b]Resultados del laboratorio de J.M. Martínez Zapater.

IV.5.1.1.3.- Modulación del fenotipo de floración temprana de los mutantes *incurvata*

En los apartados anteriores se ha constatado repetidas veces que el fenotipo Incurvata1 comprende al menos tres efectos pleiotrópicos de las mutaciones *incurvata1*: la curvatura del margen de la hoja, la floración temprana y la flor Apétala. Sin embargo, algunas observaciones nos hicieron pensar que algún otro gen pudiera estar

modificando el momento de la floración en las plantas homocigóticas para mutaciones *icu1* o *icu2*. Por un lado, los individuos *icu*/*icu*;*er*/*er* presentan una alteración de la morfología de la hoja y un tiempo de floración intermedios entre los de los mutantes *icu/icu* y el tipo silvestre. Por otro, los individuos *icu2/icu2;er/er* presentan hojas con un fenotipo mutante suave, en ocasiones difícilmente distinguible del silvestre, lo que puede que justifique el que no se hayan obtenido alelos mutantes de este gen a partir de Landsberg *erecta*. Son ejemplos de esta última afirmación las familias 2.10, 2.11 y 2.17 de la Tabla 24, en la página 106. Para confirmar esta última observación, se recolectaron por separado semillas de diferentes plantas de la familia 2.11, todas las cuales eran homocigotas para la mutación *erecta* y para el alelo silvestre de *AG*, con el fin de constituir familias F_4, y estudiar su segregación fenotípica, con los resultados que aparecen en la Tabla 33.

Tabla 33.- Segregación fenotípica en las familias F_4 obtenidas a partir de un cruzamiento entre *icu1-3* y *ag-1*

Familia	Fenotipo del progenitor F_3	F_4	
		Hoja silvestre y flor silvestre	Hoja Incurvata y flor Incurvata
2.11.1	Silvestre, Erecta	22	8
2.11.2	Silvestre, Erecta	31	10
2.11.3	Silvestre, Erecta	50	0
2.11.4	Silvestre, Erecta	15	0
2.11.5	Silvestre, Erecta	16	4
2.11.6	Silvestre, Erecta	20	0
2.11.7	Silvestre, Erecta	31	9
2.11.8	Incurvata, Erecta	0	9
2.11.9[a]	Incurvata, Erecta		
2.11.10	Silvestre, Erecta	22	8
2.11.11	Silvestre, Erecta	34	6
2.11.12[a]	Incurvata, Erecta		
2.11.13	Silvestre, Erecta	20	0
2.11.14	Silvestre, Erecta	10	0
2.11.15	Silvestre, Erecta	26	8
2.11.16	Silvestre, Erecta	13	5
2.11.17	Silvestre, Erecta	30	8
2.11.18	Silvestre, Erecta	21	9
2.11.19	Silvestre, Erecta	11	4
2.11.20	Silvestre, Erecta	20	6
2.11.21	Silvestre, Erecta	30	0
2.11.22	Silvestre, Erecta	12	6

[a]No germinó ninguna de sus semillas.

Se comprobó en todos los casos que las plantas cuyo presunto genotipo era *icu1-3/icu1-3;er/er* presentaban una floración no tan temprana como la de las *icu1-3/icu1-3;ER/ER,* que se sembraron a la vez que aquéllas. Parece por tanto que en el genoma de L*er* puede existir algún alelo modificador del tiempo de floración cuyo efecto se hace patente en el fenotipo Incurvata. El gen correspondiente debe estar íntimamente ligado a *ERECTA*, a juzgar por las segregaciones observadas en las generaciones F_3 y F_4 estudiadas.

Figura 29.- Individuos representativos de los fenotipos que indican la interacción entre las mutaciones en *ICU1* y *ER*. La planta de la derecha es *icu1-3*/*icu1-3;ER/ER*, y la de la izquierda *icu1-3*/*icu1-3;er/er*. La transición floral ha ocurrido antes en la planta de la derecha, por lo que muestra más flores y un tallo más desarrollado que la de la izquierda. La fotografía se obtuvo 27 días después de la siembra. La barra de escala indica 5 mm.

IV.5.1.2.- Otros mutantes *incurvata*

Constituyen un grupo mucho menos homogéneo que el de las estirpes *incurvata* de floración temprana. Lo componen las líneas N242, N311, N330, N349, N353, N357, N373, N379, N400, N401 y N431, que se caracterizan por la curvatura del margen de sus hojas vegetativas, rasgo que en estos casos no está asociado a floración temprana.

Algunas de estas estirpes muestran una coloración verde clara (N330 y N353), floración tardía (N357 y N431), hojas pequeñas (N373) o roseta compacta (N379). La estirpe N379 ha sido caracterizada a nivel morfológico por Rüffer-Turner y Napp-Zinn (1980), quienes constataron que el número de estomas y de células epidérmicas por unidad de superficie de la hoja era considerablemente mayor en este mutante que en el ecotipo del que deriva (En-2). El modo de herencia de los fenotipos de estos mutantes se estudió según recoge la Tabla 34, cruzando cada estirpe por el ecotipo del que procede.

Tabla 34.- Estudio del modo de herencia del fenotipo Incurvata sin floración temprana

Cruzamiento	F_1		F_2		Segregación		
(**f** x **m**)	Silvestre	Mutante	Silvestre	Mutante	Hipótesis	χ^2	P
N242 x S96	20	0	47	14	3:1	0,05	0,8-0,9
N311 x En-2	51	0	26	7	3:1	0,09	0,7-0,8
N330 x En-2	8	0	30	5	3:1	1,61	0,2-0,3
N349 x En-2	5	0	45	8	3:1	2,27	0,1-0,2
N353 x En-2	20	0	125	38	3:1	0,17	0,5-0,7
N357 x En-2	10	0	48	13	3:1	0,27	0,5-0,7
N373[a] x En-2							
N379 x En-2	0	15	43	118	1:3	0,17	0,5-0,7
N400 x En-2	0	15[b]	51	142[c]	1:2:1	2,04	0,3-0,5
N401 x En-2	0	10[b]	28	108[d]	1:2:1	1,59	0,3-0,5
N431 x En-2	14	0	81	16	3:1	3,30	0,05-0,1

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 20, en la página 99. [a]Todos los cruzamientos resultaron infructuosos; [b]El fenotipo de los heterocigotos es más débil que el de los homocigotos; [c, d]Un total de [c]87 y [d]70 plantas, presuntamente heterocigotas, presentaron un fenotipo mutante más suave que el de las homocigotas.

Según se indica en la Tabla 34, todas las mutaciones *icu* de las estirpes estudiadas son recesivas, con las excepciones de las de N400 y N401, que son semidominantes, y la de N379, que presenta dominancia completa. Los mutantes fueron sometidos a análisis de complementación según se indica en la Tabla 35, en la que puede comprobarse que en los cruzamientos realizados se incluyeron representantes de los genes *ICU1*, *ICU2 e ICU3*, antes descritos.

La semidominancia de N400 y N401 y la dominancia completa de N379 suponen una complicación para el análisis de complementación. Para extraer conclusiones relativas a la complementación no basta en este caso con la observación de los individuos de la F_1 de los cruzamientos realizados, requiriéndose el análisis de su descendencia F_2. En las estirpes portadoras de mutaciones semidominantes se

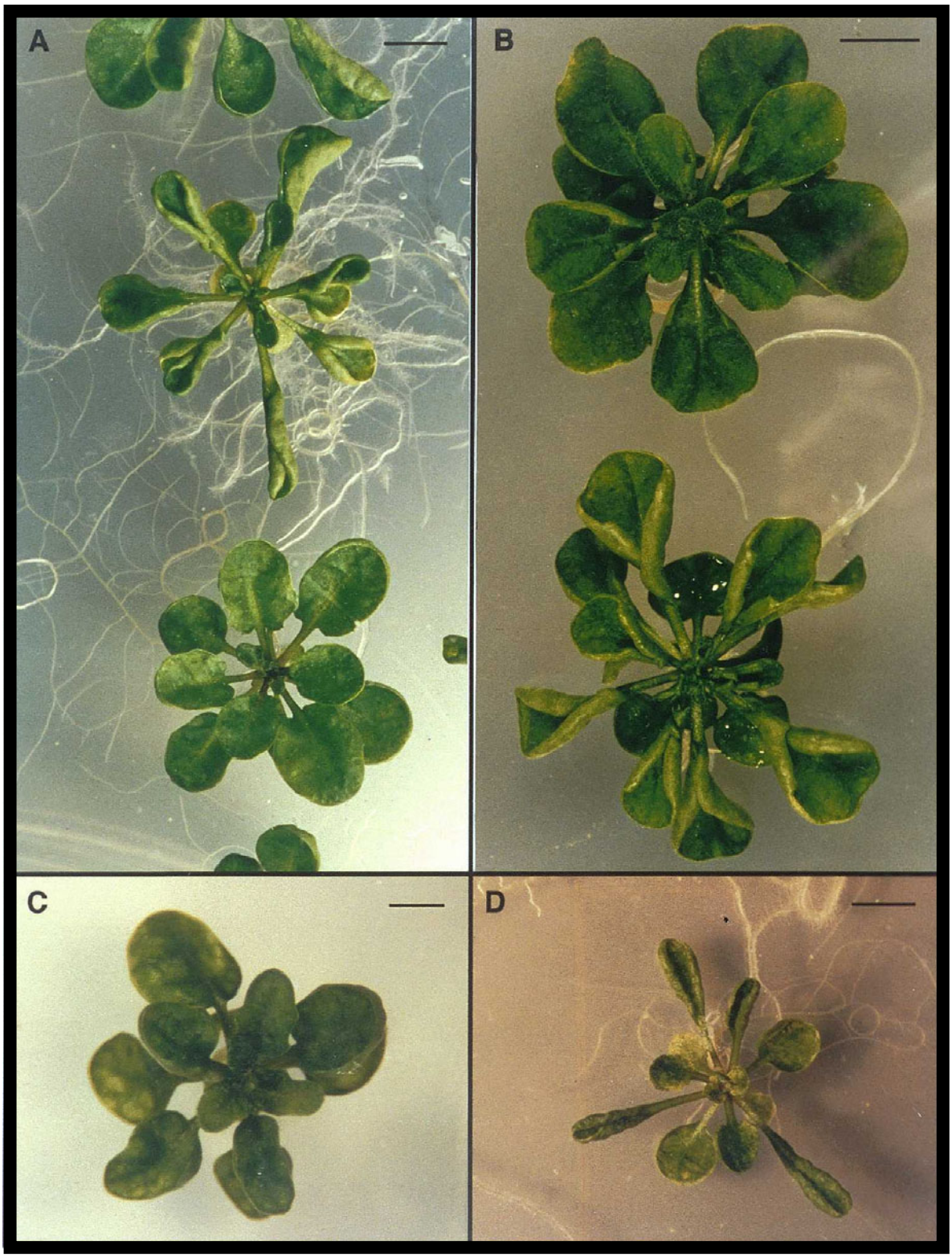


Figura 30.- Individuos representativos de la clase fenotípica Incurvata sin alteraciones en el tiempo de floración. Los mutantes ilustrados en las fotografías son: (A) *icu4-1/icu4-1* (N400), arriba, e *ICU4*/*icu4-1*, abajo; (B) *icu5/icu5* (*N379*), arriba, e *ICU4*/*icu4-1;ICU5/icu5*, abajo; (C) *icu13/icu13* (N349); y (D) *icu14-1/icu14-1* (N353). Las fotografías se obtuvieron 32 (A), 31 (B) y 24 (C y D) días después de la siembra. Todas las barras de escala indican 5 mm.

determinó la no complementación en base a la aparición en la F_1 de un fenotipo mutante más suave que el del parental de fenotipo semidominante, así como a la presencia de individuos silvestres en la F_2. En cuanto a N379, se determinó la no complementación en base a la aparición de individuos silvestres en la generación F_2.

Tabla 35.- Complementación entre los mutantes *incurvata*

f	N345	N329	N314	N242	N311	N330	N349	N353	N357	N379	N400	N401	N431
N345		+	+		+		+		+	-*	-*		
N329	+		+		+		+			-*		-*	
N314					+		+			-*	-*	-*	+
N242	+	+	+		+	+	+			-*	-*		
N311							+	+		-*	-*		+
N330													+
N349					+			+		-*	-*	-*	+
N353	+	+	+		+	-	+			-*	-*		
N357		+		+						-*			-
N379													
N400					-*		-*	-*		-*		-	
N401	-*		-*							-*	-		
N431									-		-*		

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 21, en la página 100. Los genotipos de las estirpes N345, N329 y N314 son, respectivamente, *icu1-3/icu1-3*, *icu2/icu2*, e *icu3/icu3*. *Se observó un fenotipo distinto del silvestre, como consecuencia de la semidominancia de N400 y N401, o la dominancia completa de N379.

De los resultados obtenidos se deduce que existen en esta clase fenotípica siete grupos de complementación. El grupo *ICU4* incluye las estirpes N400 (*icu4-1*) y N401 (*icu4-2*), mientras que los genes *ICU5*, *ICU11*, *ICU12* e *ICU13* cuentan con un solo alelo mutante, los presentes en las líneas N379 (*icu5*), N242 (*icu11*), N311 (*icu12*) y N349 (*icu13*). Por último, cada uno de los genes *ICU14* e *ICU15* cuenta con dos alelos, los correspondientes a las estirpes N330 (*icu14-1*), N353 (*icu14-2*), N357 (*icu15-1*) y N431 (*icu15-2*). Las denominaciones *ICU11* a *ICU15* son provisionales, ya que no se ha llevado a cabo el análisis de complementación entre las correspondientes estirpes y los mutantes *incurvata* obtenidos por G. Berná y P. Robles, a los que se han asignado las denominaciones *icu6* a *icu10*.

IV.5.2.- Clase fenotípica Transcurvata

Sólo dos líneas componen este grupo, N423 y N424, que muestran plegamiento del limbo hacia el envés, oblicuamente al nervio central (Figura 31A, B). La estirpe N423

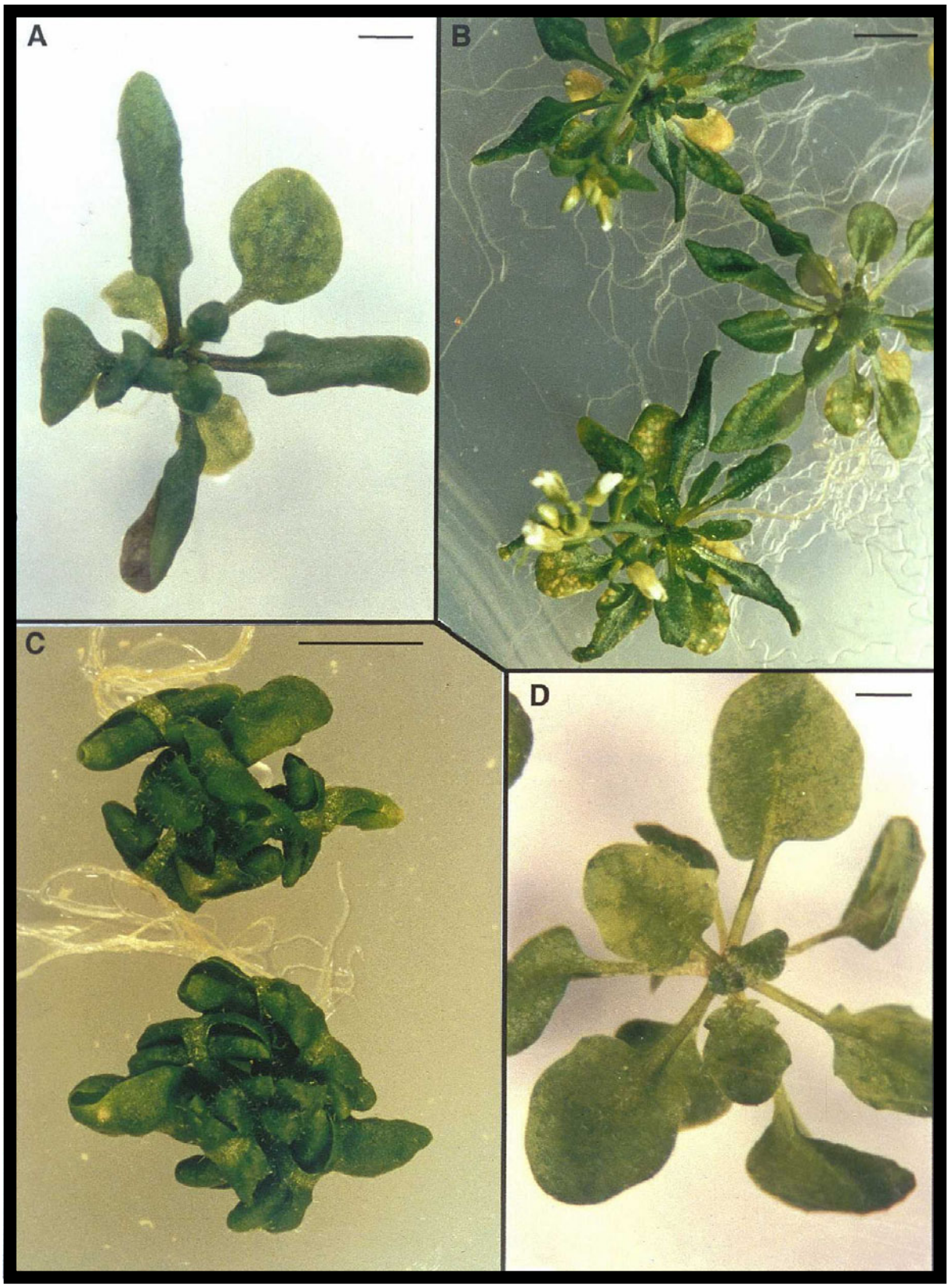


Figura 31.- Individuos representativos de las clases fenotípica Transcurvata, Ultracurvata y Tortifolia. Los mutantes ilustrados en las fotografías son: (A) N423 (*tcu4/tcu4*), (B) N424 (un mutante con fenotipo Transcurvata), (C) CS3397 (*inl*/*inl*), y (D) N378 (un mutante con fenotipo Tortifolia). Las fotografías se obtuvieron 25 (A), 32 (B), 35 (C) y 28 (D) días después de la siembra. Todas las barras de escala indican 5 mm.

presenta hojas glabras, alargadas y aserradas, mientras que N424, de floración temprana, muestra hojas de forma triangular, como consecuencia del plegamiento del limbo, que es ostensible desde el ápice a la base. Dado que no se obtuvo descendencia de los cruzamientos de N424 por el tipo silvestre, sólo puede proponerse la existencia de un gen, *TRANSCURVATA4* (*TCU4*), representado por N423 (*tcu4*), cuya denominación es provisional, ya que no se han realizado cruzamientos con otros mutantes semejantes, obtenidos previamente en el laboratorio de J.L. Micol.

Tabla 36.- Estudio del modo de herencia del fenotipo Transcurvata

Cruzamiento	F_1		F_2		Segregación[a]	
(**f** x **m**)	Silvestre	Mutante	Silvestre	Mutante	χ^2	P
N423 x En-2	18	0	81	23	0,32	0,5-0,7
N424[b] x En-2						

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 20, en la página 99. [a]Se expresa el valor de χ^2 obtenido al contrastar la hipótesis de que los datos observados en F_2 se ajustan a la segregación fenotípica 3:1. [b]No se obtuvo descendencia viable de los cruzamientos realizados.

IV.5.3.- Clase fenotípica Ultracurvata

A esta clase fenotípica se asigna una sola estirpe, la CS3397 (Figura 31C), que deriva del ecotipo Col-1. Este mutante fue inicialmente denominado *invalida* por Rédei (Varios autores, 1995) y presenta hojas vegetativas y caulinares con el limbo enrollado hacia el envés, a lo largo de la vena primaria. El fenotipo de este mutante se debe a una mutación recesiva, según puede deducirse de los resultados de su cruzamiento por el ecotipo Col-1 (Tabla 37).

Dada la semejanza entre las hojas de CS3397 y las de los mutantes denominados *ultracurvata*, aislados por G. Berná (1997) en el laboratorio de J.L. Micol, se procedió a determinar la existencia de eventuales relaciones de alelismo, efectuando el correspondiente análisis de complementación. Las estirpes *ultracurvata* incluidas en los cruzamientos realizados fueron P1 4.5, P9 36.1 y P9 42.1, cuyos genotipos, establecidos por G. Berná con posterioridad a nuestro análisis, son *ucu1-1*/*ucu1-1*, *ucu1-2a/ucu1-2a* y *ucu1-2b*/*ucu1-2b*. Dado que estas estirpes son portadoras de alelos semidominantes del gen *ULTRACURVATA1* (dos de los cuales, *ucu1-2a* y *ucu1-2b*, son probablemente idénticos), se utilizaron individuos heterocigóticos *UCU1*/*ucu1* en los cruzamientos por CS3397 (Tabla 38). Se concluyó que la mutación de la que es portadora la línea CS3397 no es un alelo del gen *UCU1*, ya que los resultados obtenidos

son los que cabría esperar de un cruzamiento entre individuos de fenotipo Ultracurvata1 (*UCU1*/*ucu1*) y el tipo silvestre (*UCU1*/*UCU1*). En consecuencia, se asignó la denominación *INVALIDA* (*INL*) al grupo de complementación representado por CS3397 (*inl*). No se ha determinado su eventual alelismo con otra mutación *ultracurvata*, *ucu2*, obtenida por P. Robles, que afecta a un gen distinto de *UCU1*.

Tabla 37.- Estudio del modo de herencia del fenotipo Ultracurvata en CS3397

Cruzamiento	F_1		F_2		Segregación[a]	
(**f** x **m**)	Silvestre	Mutante	Silvestre	Mutante	χ^2	P
CS3397 x Col-1	8	0	68	21	0,03	0,8-0,9

Se siguen las pautas de la Tabla 20, en la página 99. [a]Se expresa el valor de χ^2 obtenido al contrastar la hipótesis de que los datos observados en F_2 se ajustan a la segregación fenotípica 3:1.

Tabla 38.- Complementación entre los mutantes *ultracurvata* e *invalida*

Cruzamiento	F_1		Segregación[a]	
(**f** x **m**)	Silvestre	Mutante	χ^2	P
CS3397 x *UCU1*/*ucu1-1*	15	8[b]	1,57	0,2-0,3
CS3397 x *UCU1*/*ucu1-2a*	4	7[c]	0,36	0,5-0,7
CS3397 x *UCU1*/*ucu1-2b*	8	13[d]	0,76	0,3-0,5

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 20, en la página 99. [a]Se expresa el valor de χ^2 obtenido al contrastar la hipótesis de que los datos observados en F_1 se ajustan a la segregación fenotípica 1:1. [b]Fenotipo semejante al de los parentales *UCU1*/*ucu1-1*. [c]Fenotipo semejante al de los parentales *UCU1*/*ucu1-2a*. [d]Fenotipo semejante al de los parentales *UCU1*/*ucu1-2b*.

IV.5.4.- Clase fenotípica Tortifolia

Se asigna a este grupo la línea N378 (Figura 31D), cuyo fenotipo se corresponde con el que Reinholz (1947b) denominó Tortifolia. Presenta floración tardía y tanto el peciolo como las propias hojas giran progresivamente en sentido antihorario, a lo largo de su crecimiento. No pudo determinarse el modo de herencia de este fenotipo, ya que todos los intentos de cruzarla por su ecotipo de procedencia resultaron infructuosos en nuestras condiciones de trabajo.

IV.5.5.- Clase fenotípica Asymmetric leaves

Los mutantes de este grupo son semejantes en fenotipo a los previamente descritos por Rédei y Hirono, 1964, quienes emplearon la denominación Asymmetric leaves, que hemos aplicado. El grupo está formado por seis mutantes, N230, N321,

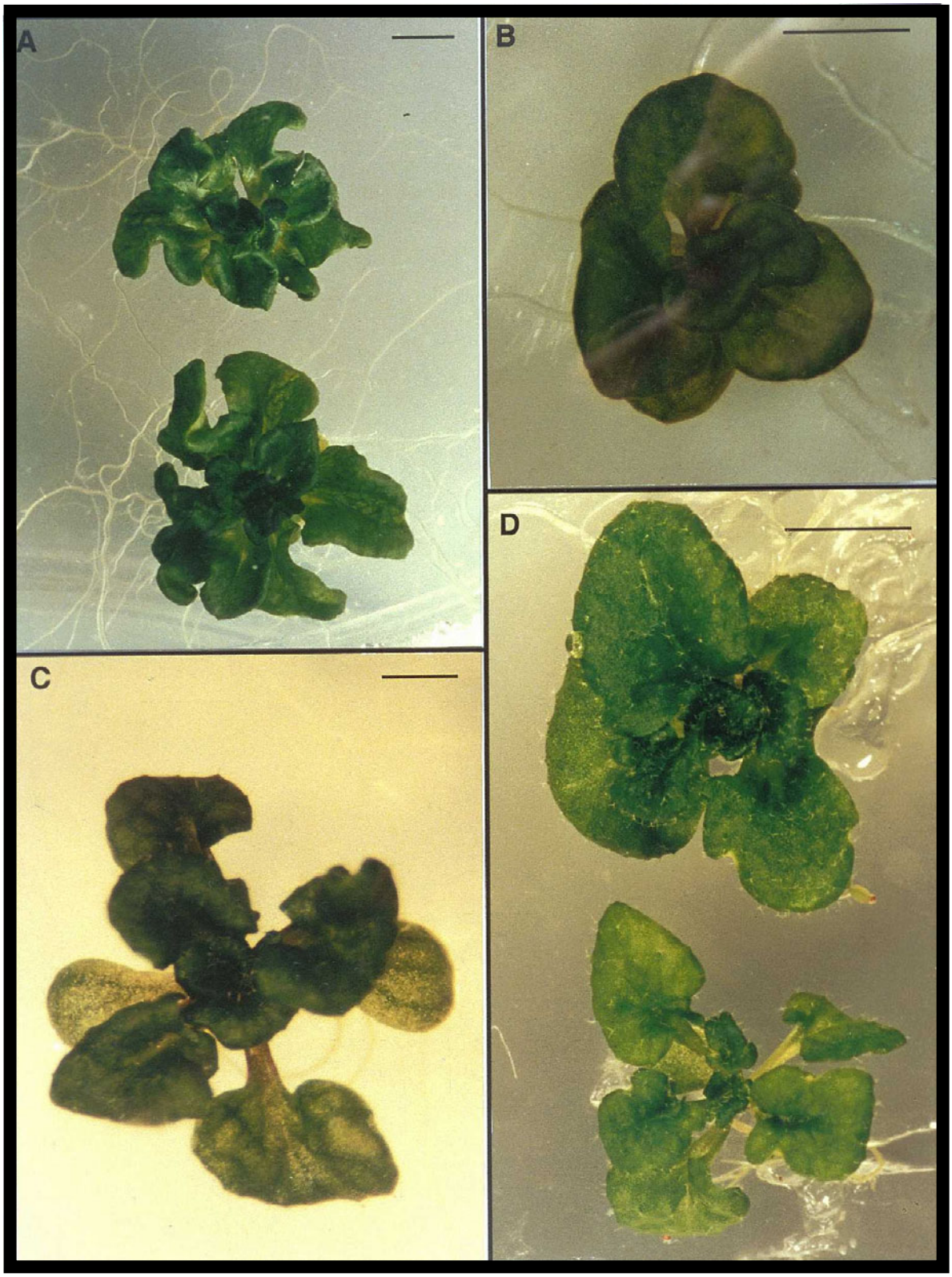


Figura 32.- Individuos representativos de la clase fenotípica Asymmetric leaves. Los mutantes ilustrados en las fotografías son: (A) N444 (*as1-15*/*as1-15*); (B) N321 (*as1-14*/*as1-14*); (C) N463 (*as2-12*/*as2-12*); y (D) N321 (*as1-14*/*as1-14*), arriba, y un doble mutante *as1 as2*, cuyo genotipo es *as1-14*/*as1-14;as2-12*/*as2-12*, abajo. Las fotografías se obtuvieron 31 (A), 20 (B), 24 (C) y 26 (D) días después de la siembra. Todas las barras de escala indican 5 mm.

N444, N463, CS3240 y CS3250, cuyos fenotipos son muy similares (Figura 32), caracterizándose por la presencia de hojas vegetativas y caulinares de limbo ancho y márgenes ligeramente recurvados hacia el envés. Esta curvatura no es uniforme a lo largo de todo el perímetro de la hoja, lo que determina una ligera, aunque apreciable, perturbación de la simetría bilateral con respecto a la vena primaria. Este fenotipo mutante es fácilmente distinguible del silvestre, resultando las hojas vegetativas adultas más lobuladas y asimétricas que las juveniles. Se aprecian arrugas en el limbo de estos mutantes, cuya vena primaria es conspicua. Muestran alteraciones en las flores, consistentes en la presencia de pétalos cortos y un pistilo prominente, claramente apreciable antes de la apertura de los estambres, lo que reduce su fertilidad. La inflorescencia es enmarañada y los frutos están arqueados. Todas ellas son similares a los mutantes, previamente descritos, *as1* y *as2* (véase la **Tabla 9**, en la página 75).

Pueden distinguirse dos grupos en esta clase fenotípica. El primero de ellos lo integran N321, N444, CS3240 y CS3250, que presentan roseta compacta y hojas con peciolo corto y una curvatura del margen uniforme a lo largo de todo el perímetro del limbo. Pertenecen al segundo grupo N230 y N463, que presentan una roseta poco densa y hojas con un peciolo de longitud normal, así como un margen recurvado de forma desigual, siendo la zona apical del limbo la más ostensiblemente revoluta.

Tabla 39.- Estudio del modo de herencia del fenotipo Asymmetric leaves

Cruzamiento	F_1		F_2		Segregación[a]	
(**f** x **m**)	Silvestre	Mutante	Silvestre	Mutante	χ^2	P
N230 x En-2	10	0	50	18	0,02	0,9
N321 x En-2	15	0	102	29	0,43	0,5-0,7
N444 x En-2	23	0	125	47	0,38	0,5-0,7
N463 x En-2	32	0	140	42	0,26	0,5-0,7
CS3240 x Col-1	42	0	82	19	1,87	0,1-0,2
CS3250 x Col-1	38	0	74	28	0,28	0,5-0,7

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 20, en la página 99. [a]Se expresa el valor de χ^2 obtenido al contrastar la hipótesis de que los datos observados en F_2 se ajustan a la segregación fenotípica 3:1.

Tal como recoge la Tabla 39, tras cruzar las líneas mutantes por el ecotipo del que derivan, se comprobó que los individuos de la F_1 presentaban fenotipo silvestre, así como que su autofecundación producía una descendencia F_2 en la que el fenotipo Asymmetric leaves reaparecía según una segregación fenotípica 3:1 (silvestre:mutante). Una vez demostrado que todas las líneas de esta clase heredaban su fenotipo mutante

de modo monogénico y recesivo, se llevó a cabo el correspondiente análisis de complementación, con los resultados que aparecen en la Tabla 40.

Tabla 40.- Complementación entre los mutantes *asymmetric leaves*

f / m	NW146	NW151	N321	N444	CS3374	CS3283	CS3240	CS3250	CS3117	N230	N463
NW146					-	-			+		
NW151				-					+	+	+
N321	-			-			-	-	+	+	+
N444			-						+	+	+
CS3374										+	
CS3283					-				+		
CS3240		-						-			+
CS3250		-					-				+
CS3117					+	+				-	
N230											
N463	+	+	+	+		+	+	+	-	-	

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 21, en la página 100.

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

Puede observarse en la Tabla 40 que se incluyeron en el análisis de complementación las estirpes NW146, NW151, CS3374, CS3283 (homocigóticas para alelos mutantes de *AS1* previamente descritos) y CS3317 (homocigótica para un alelo mutante de *AS2*; véase su descripción en la **Tabla 9**, en la página 75). En base a los resultados obtenidos se clasificó a los mutantes de esta clase fenotípica en dos grupos de complementación, el primero de los cuales comprende los alelos del gen *AS1* [N321 (*as1-14*), N444 (*as1-15*), CS3240 (*as1-16*) y CS3250 (*as1-17*)] y el segundo los de *AS2* [N463 (*as2-12*) y N230 (*as2-13*)].

Con el fin de identificar dobles mutantes, se estudió la progenie F_2 de algunas de las plantas F_1 de fenotipo silvestre, obtenidas a partir de los cruzamientos realizados para el análisis de complementación. No se encontraron individuos de fenotipo extremo a los que pudiese asignarse inequívocamente el carácter de presuntos dobles mutantes. Por el contrario, se observó que el número de individuos con un fenotipo mutante semejante a As2 (cuyo peciolo es manifiestamente más largo que el de los mutantes *as1*, entre otras características diferenciales) era significativamente mayor que el de los que manifestaban un fenotipo As1. Tales resultados, que se presentan en la Tabla 41,

son congruentes con la hipótesis de que las mutaciones *as2* son epistáticas sobre las *as1*, obteniéndose una segregación fenotípica 9:4:3.

Tabla 41.- Estudio de las interacciones entre las mutaciones *asymmetric leaves*

Cruzamiento	F_1		F_2			Segregación[a]	
(**f** x **m**)	Silvestre	Mutante	Silvestre	As2	As1	χ^2	P
as1-14/as1-14 x as2-13/as2-13	15	0	97	33	25	2,52	0,2-0,3
as2-12/as2-12 x as1-14/as1-14	22	0	105	54	39	0,87	0,5-0,7

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 20, en la página 99. [a]Se expresa el valor de χ^2 obtenido al contrastar la hipótesis de que los datos observados en F_2 se ajustan a la segregación fenotípica 9:4:3.

Tabla 42.- Estudio de las familias F_3 obtenidas a partir del cruzamiento *as2-12/as2-12 x as1-14/as1-14*

Familia	F_3		Segregación[a]	
	As1	Doble mutante	χ^2	P
1	39	6	2,67	0,1-0,2
2	39	9	0,69	0,3-0,5
3	42	8	1,71	0,1-0,2
4	47	0		
5	41	12	0,06	0,8
6	50	0		

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 20, en la página 99. [a]Se expresa el valor de χ^2 obtenido al contrastar la hipótesis de que los datos observados en F_3 se ajustan a la segregación fenotípica 3:1 (As1:Doble mutante).

Para confirmar que el aparente exceso de plantas con fenotipo As2 se debe a una epistasia recesiva, se construyeron familias F_3, a partir de 6 de las plantas F_2 que manifestaban fenotipo As1, procedentes del cruzamiento *as2-12*/*as2-12* x *as1-14*/*as1-14* (Tabla 42).

Era razonable suponer que al menos una de dichas plantas F_2 tendría un genotipo *as1-14/as1-14;as2-12*/*AS2* y que en su descendencia F_3 aparecería un 25% de presuntos dobles mutantes, ya que los genes *AS1* y *AS2* están ubicados en cromosomas distintos (el cromosoma 2 y el 1, respectivamente; Koornneef, 1994). Esto es lo que se observó en la descendencia de las familias 1, 2, 3 y 5. El fenotipo de los presuntos dobles mutantes obtenidos era, como se esperaba, más semejante al As2 que al As1. Tales presuntos dobles mutantes F_3, cuyo genotipo más probable era *as1-14/as1-14*;*as2-12/as2-12*, fueron cruzados por individuos *as1-14/as1-14* y *as2-12/as2-*

12, obteniéndose una descendencia que en unos cruzamientos manifestó en su totalidad el fenotipo As1 (de genotipo *as1-14/as1-14*;*as2-12/AS2*), y en otros el fenotipo As2 (*as1-14/AS1*;*as2-12/as2-12*). Sin embargo, en la descendencia de las familias 4 y 6 no aparecieron dobles mutantes, ya que el genotipo del individuo parental de dicha familia, de fenotipo As1, era muy probablemente *as1-14/as1-14*;*AS2/AS2.*

IV.5.6.- Clase fenotípica Angusta

En este grupo se incluyen las líneas N241, N333 y N336, que presentan hojas más estrechas que las del tipo silvestre, aunque de una longitud normal (Figura 33A). La denominación Angusta se ha tomado de un trabajo anterior, en el que se asignó este término a unas estirpes semejantes en morfología de la hoja a las aquí estudiadas (Berná Amorós, 1997). Se estableció que este fenotipo se heredaba de modo monogénico y recesivo, según se muestra en la Tabla 43.

Tabla 43.- Estudio del modo de herencia del fenotipo Angusta

Cruzamiento	F_1		F_2		Segregación[a]	
(**f** x **m**)	Silvestre	Mutante	Silvestre	Mutante	χ^2	P
N241 x S96	10	0	39	15	0,10	0,7-0,8
N333 x En-2	15	0	63	17	0,42	0,5-0,7
N336 x En-2	8	0	35	9	0,27	0,5-0,7

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 20, en la página 99. [a]Se expresa el valor de χ^2 obtenido al contrastar la hipótesis de que los datos observados en F_2 se ajustan a la segregación fenotípica 3:1.

Tabla 44.- Complementación entre los mutantes *angusta*

f \ m	N241	N333	N336	*an-1/an-1*
N241				+
N333	+		+	
N336	+			
an-1/an-1	+	+	+	

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 21, en la página 100.

Las estirpes de este grupo fueron sometidas a análisis de complementación, junto con la línea CS3400, portadora de la mutación *angustifolia* (*an-1*; véase la **Tabla 9**, en la página 75), cuyas hojas son similares a las de los mutantes de este grupo, con los

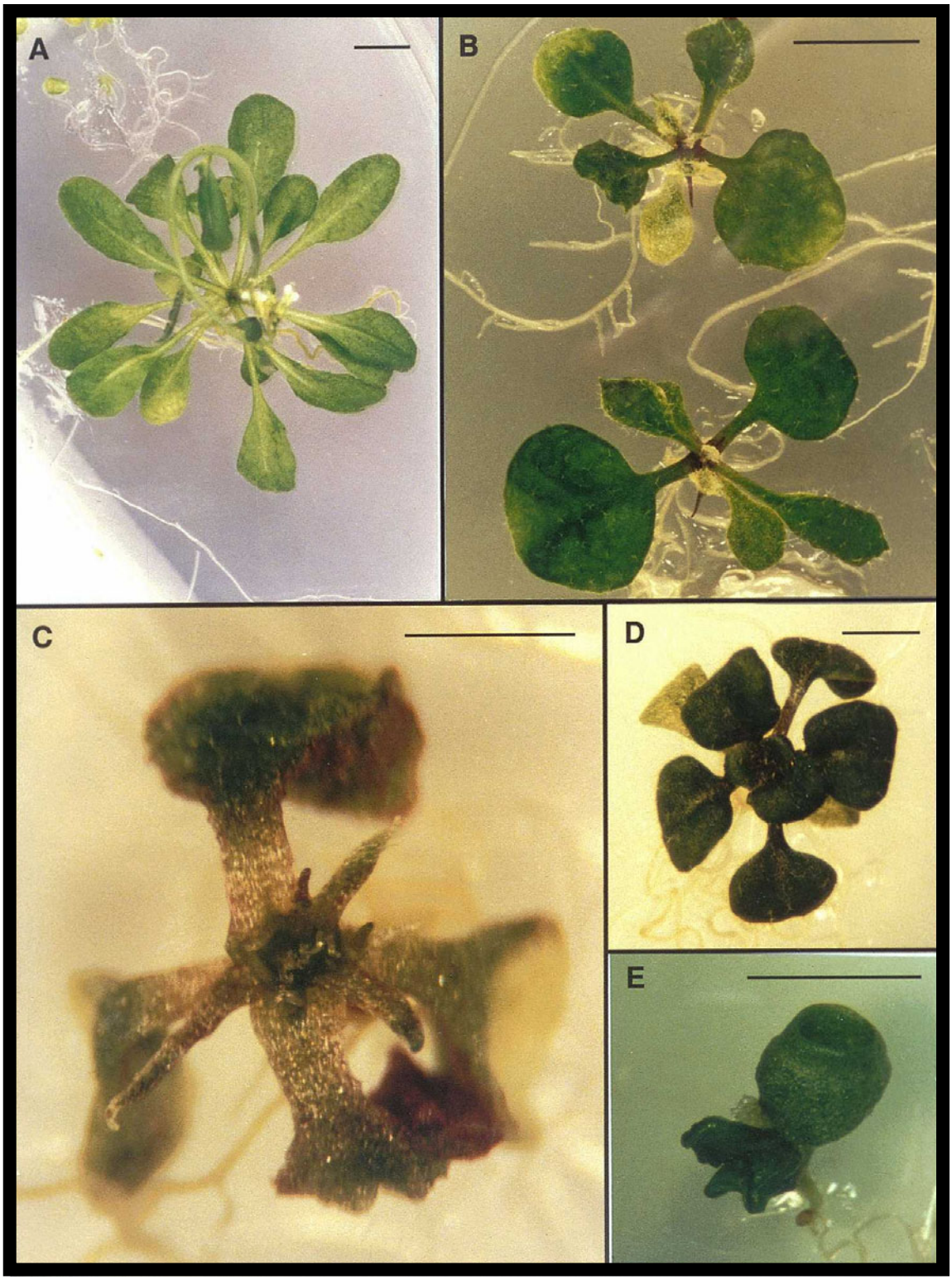


Figura 33.- Individuos representativos de las clases fenotípicas Angusta, Filiforme, Exigua y Calyciforme. Los mutantes ilustrados en las fotografías son: (A) N241 (*ang5*/*ang5*), (B) CS3254 (*flr2*/*flr2*), (C) N325 (*flr1*/*flr1*), (D) N461 (un mutante con fenotipo Exigua), y (E) N324 (*cay*/*cay*). Las fotografías se obtuvieron 42 (A), 15 (B), 26 (C), 24 (D) y 32 (E) días después de la siembra. Todas las barras de escala indican 5 mm.

resultados que recoge la Tabla 44. Se definieron tres grupos de complementación diferentes, a los que se ha denominado *ANG5*, *ANG6* y *ANG7*, cada uno de ellos con un solo alelo, los presentes en las líneas N241 (*ang5*), N333 (*ang6*) y N336 (*ang7*). Estas denominaciones de gen y alelo son provisionales, hasta tanto no se lleven a cabo ensayos de alelismo con otras estirpes de fenotipo similar, aisladas en el laboratorio de J.L. Micol (Berná Amorós, 1997).

IV.5.7.- Clase fenotípica Filiforme

Se incluyeron en este grupo las estirpes N325 y CS3254 (Figura 33B, C). La primera de ellas muestra cotiledones moteados de un pigmento oscuro y sus dos primeras hojas son estrechas, con forma de garfio, y se expanden tardíamente desde la base hacia el ápice para adquirir finalmente una forma cónica. Su envés está pigmentado de rojo y su haz es blanquecino. Las hojas que aparecen en la fase vegetativa adulta son relativamente normales, observándose ocasionalmente la aparición de estructuras filiformes y la fasciación del tallo. Por su parte, la estirpe CS3254, denominada Flavodentata por Rédei (Varios autores, 1995), presenta hojas con el envés rojizo y un haz de margen blanquecino, involuto e inciso. El crecimiento de algunas de las hojas de esta estirpe ocurre inicialmente sólo en el sentido longitudinal, produciéndose después la expansión lateral.

Cada una de estas dos líneas fue cruzada por su ecotipo de origen, con los resultados que aparecen en la Tabla 45, indicativos de un patrón de herencia recesiva. Las segregaciones fenotípicas observadas en la generación F_2 muestran claramente el carácter monogénico del fenotipo mutante de CS3254, mientras que el de N325 parece deberse a la acción concurrente de dos mutaciones en genes independientes o a la baja viabilidad del homocigoto.

Tabla 45.- Estudio del modo de herencia del fenotipo Filiforme

Cruzamiento	F_1		F_2		Segregación		
(**f** x **m**)	Silvestre	Mutante	Silvestre	Mutante	Hipótesis	χ^2	P
N325 x En-2	10	0	90	11	15:1	1,72	0,1-0,2
CS3254 x Col-1	7	0	81	17	3:1	2,67	0,1-0,2

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 20, en la página 99.

Se efectuaron cruzamientos recíprocos entre las dos líneas de esta clase, obteniéndose en ambos casos una descendencia exclusivamente integrada por individuos de fenotipo silvestre. Tampoco se hallaron relaciones de alelismo entre estas

dos estirpes y otras, con las que fueron cruzadas, que presentaban fasciación en el tallo, concretamente *miniature* (*min*), *fasciated* (*fas1* y *fas2*), y *clavata1* (*clv1*; véase la **Tabla 9**, en la página 75). Hemos asignado las denominaciones *FILIFORME (FLR)* y *FLAVODENTATA (FLV)* a los genes de cuyos alelos mutantes *flr* y *flv* son portadoras las estirpes N325 y CS3254, respectivamente. La primera de estas asignaciones es provisional ya que, como se ha dicho antes, la segregación fenotípica obtenida en la F_2 del cruzamiento entre el tipo silvestre y N325 indica que pudiera ser un doble mutante.

IV.5.8.- Clase fenotípica Exigua

Este grupo comprende cuatro estirpes mutantes muy semejantes entre sí: N438, N442, N450 y N461, que comparten la característica de presentar hojas muy pequeñas e inicialmente oscuras, que adquieren una coloración violácea en estados posteriores de su expansión (Figura 33D). Las cuatro son de floración muy tardía, poco fértiles y con una inflorescencia de tipo arbustivo y poco porte. La denominación Exigua se ha tomado de un trabajo anterior, en el que se asignó este término a unas estirpes semejantes en tamaño y morfología de la hoja, aunque no en su pigmentación, a las aquí estudiadas (Berná Amorós, 1997).

Tal como se muestra en la Tabla 46, no fue posible establecer el modo de herencia de las líneas N442, N450 y N461. También fueron infructuosos los cruzamientos realizados para análisis de complementación. Nuestras conclusiones al respecto de este grupo fenotípico se limitan a la naturaleza monogénica y recesiva del fenotipo mutante de N438. El gen correspondiente ha recibido la denominación de *EXIGUA8* (*EXI8*), siendo N438 el alelo mutante *exi8*, denominación provisional hasta tanto no se lleven a cabo ensayos de alelismo con otras estirpes de fenotipo similar, aisladas en el laboratorio de J.L. Micol (Berná Amorós,1997).

Tabla 46.- Estudio del modo de herencia del fenotipo Exigua

Cruzamiento	F_1		F_2		Segregación[a]	
(**f** x **m**)	Silvestre	Mutante	Silvestre	Mutante	χ^2	P
N438 x En-2	4	0	39	14	0,01	0,9-0,95
N442[b] x En-2						
N450[b] x En-2						
N461[b] x F73						

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 20, en la página 99. [a]Se expresa el valor de χ^2 obtenido al contrastar la hipótesis de que los datos observados en F_2 se ajustan a la segregación fenotípica 3:1. [b]Todos los intentos de cruzamiento resultaron fallidos.

IV.5.9.- Clase fenotípica Calyciforme

Esta clase está representada por una sola estirpe, la N324. Nuestra primera siembra de semillas de esta línea mutante nos permitió comprobar su heterogeneidad, ya que consta de dos tipos de individuos. De un total de 33 plantas, 20 (60%) presentaron una roseta más densa que la del tipo silvestre, con hojas redondeadas y en ocasiones fusionadas por parejas, mientras que en las restantes 13 (40%), que resultaron estériles, se observó la fusión total o parcial de los cotiledones, ocasionalmente fasciación del tallo y frecuentemente un número de pistilos superior al normal. Los cotiledones fusionados determinan estructuras con forma de copa, de ahí que se haya elegido para esta clase la denominación Calyciforme (Cay; Figura 33E). Este fenotipo es similar al observado en plantas tratadas con inhibidores del transporte polar de la auxina (Liu *et al.,* 1993), lo que permite proponer un posible papel en dicho proceso para el gen afectado en N324, al que hemos denominado *CAY*.

Tabla 47.- Estudio del modo de herencia del fenotipo Calyciforme

Cruzamiento	F_1		F_2		Segregación[a]	
(**f** x **m**)	Silvestre	Mutante	Silvestre	Mutante	χ^2	P
N324[b] x En-2	10	0	48	9[c]	2,11	0,1-0,2

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 20, en la página 99. [a]Se expresa el valor de χ^2 obtenido al contrastar la hipótesis de que los datos observados en F_2 se ajustan a la segregación fenotípica 3:1. [b]Estos datos hacen referencia a plantas sin cotiledones fusionados. [c]No aparecieron plantas con cotiledones fusionados, sólo con roseta compacta.

IV.5.10.- Clase fenotípica Denticulata

En este grupo se incluyeron todas aquellas estirpes que presentaron alteraciones en el margen del órgano, conformando hojas incisas, dentadas o aserradas (Figura 34): N243, N308, N316, N320, N322, N323, N343, N360, N363, N371, N381, N383, N384, N405, N407, N408, N415, N421, N429, N436, N437, N443, N447, N451, N452, N457, N458, CS3257 y CS3138. Se trata de un grupo amplio y heterogéneo, con algunos miembros con hojas alargadas (N308, N316, N320, N343, N371, N381, N383, N405, N429, N451, N452, N457 y CS3138), de floración tardía (N371, N381, N405, N407, N422, N451, N452), con alteraciones en la pigmentación, manifestando un color claro (N343, N360, N405, N407, N436, N437 y N447), con tallo fasciado (N371), y albinas tras la germinación, que adquieren una coloración verde en etapas posteriores del desarrollo (N415 y N458). Mención aparte requiere el mutante CS3257 (*serrate*), obtenido por

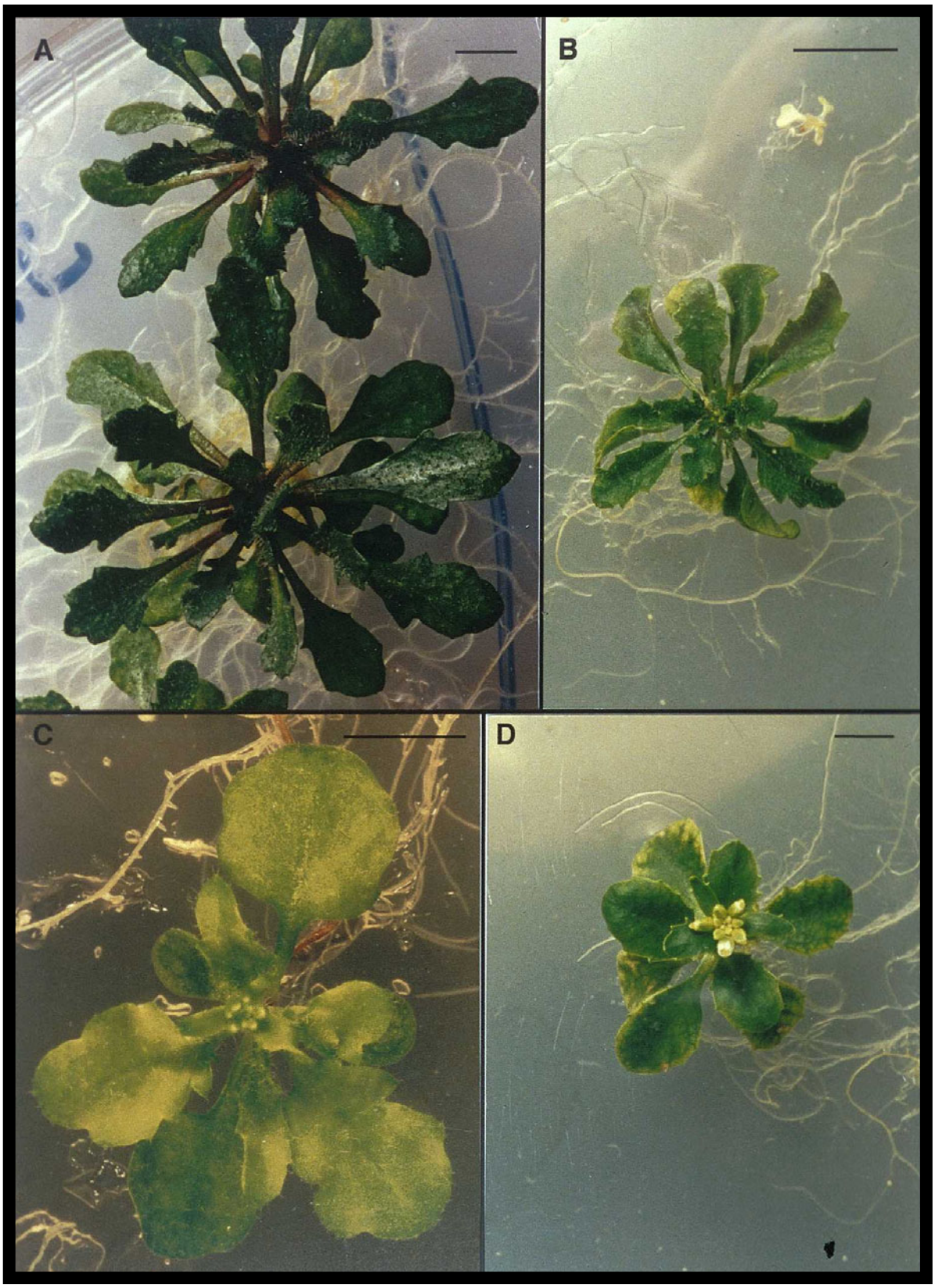


Figura 34.- Individuos representativos de la clase Denticulata. Los mutantes ilustrados en las fotografías son: (A) N371 (*fas1-11*/*fas1-11*), (B) N451 (*den27-1*/*den27-1*), (C) CS3257 (*se*/*se*), y (D) N447 (*yi-2*/*yi-2*). Las fotografías se obtuvieron 59 (A), 32 (B), 22 (C) y 32 (D) días después de la siembra. Todas las barras de escala indican 5 mm.

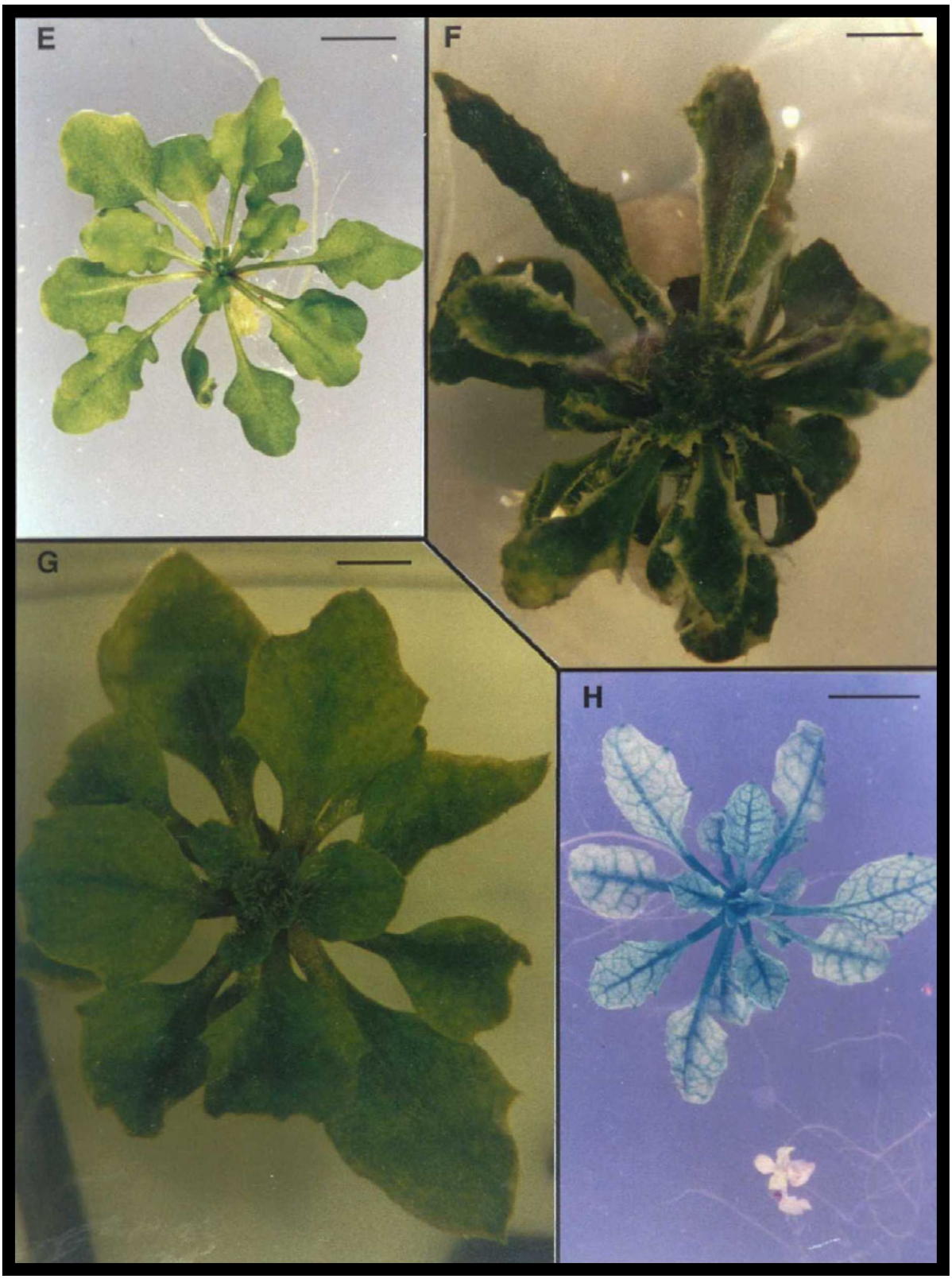


Figura 34 (continuación).- Individuos representativos de la clase Denticulata. Los mutantes ilustrados en las fotografías son: (E) CS3138 (*den28*/*den28*), (F) N323 (*den21*/*den21*), (G) N383, y (H) N384. Las fotografías se obtuvieron 44 (E), 32 (F), 30 (G) y 24 (H) días después de la siembra. Todas las barras de escala indican 5 mm.

Rédei (Varios autores, 1995), de floración temprana, con cotiledones alargados y tricomas en el envés de las hojas vegetativas, incluidas las más tempranas.

El estudio del modo de herencia se llevó a cabo como en los casos anteriores, cruzando cada estirpe mutante por el ecotipo del que procede, obteniéndose los resultados que recoge la Tabla 48.

Tabla 48.- Estudio del modo de herencia del fenotipo Denticulata

Cruzamiento	F_1		F_2		Segregación[a]	
(f x m)	Silvestre	Mutante	Silvestre	Mutante	χ^2	P
N243 x Dijon-G	10	0	64	18	0,26	0,5-0,7
N308 x An-1[b]	20	0				
N316 x En-2	7	0	55	19	0	>0,95
N320 x En-2	25	0	70	21	0,09	0,7-0,8
N322 x En-2[c]						
N323 x En-2	20	0	30	8	0,14	0,7-0,8
N343 x En-2	13	0	64	20	0,02	0,9
N360 x En-2[b]	9	0				
N363 x En-2[c]						
N371 x En-2	5	0	25	8	0,01	0,9-0,95
N381 x En-2[c]						
N383 x En-2[c]						
N384 x En-2[c]						
N405 x En-2	22	0	50	18	0,02	0,9
N407 x En-2	10	0	74	17	1,62	0,2-0,3
N408 x En-2[c]						
N415 x En-2[b]	15	0				
N421 x En-2[c]						
N429 x En-2	8	0	65	18	0,33	0,5-0,7
N436 x En-2[c]						
N437 x En-2[c]						
N443 x En-2	15	0	88	19	2,62	0,1-0,2
N447 x En-2	17	0	65	25	0,24	0,5-0,7
N451 x En-2	12	0	73	21	0,23	0,5-0,7
N452 x En-2	10	0	56	20	0,02	0,9
N457 x En-2[c]						
N458 x En-2[b]	5	0				
CS3257 x Col-1	10	0	89	23	0,96	0,3-0,5
CS3138 x Col-1	5	0	70	20	0,24	0,5-0,7

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 20, en la página 99. [a]Se expresa el valor de χ^2 obtenido al contrastar la hipótesis de que los datos observados en F_2 se ajustan a la segregación fenotípica 3:1. [b]La F_2 obtenida fue heterogénea, no siendo posible discernir entre individuos silvestre y mutantes. [c]No se obtuvo descendencia de ningún cruzamiento

Tabla 49.- Complementación entre los mutantes *denticulata*

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

f \ m	N243	N316	N320	N323	N343	N371	N405	N407	N429	N443	N447	N451	N452	CS3257	CS3138	*yi/yi*	*min/min*	*fas1/fas1*	*fas2/fas2*	*clv1/clv1*
N243			+					+		+	+		+							
N316	+				+			+	+			+					+		+	+
N320		+			+	+		+	+	+	+	+	+			+	+			+
N323	+	+	+		+			+	+	+	+	+	+							
N343	+							+	+	+	+	+	+							
N371	+	+		+	+			+	+		+	+				+				+
N405	+	+	+	+	+	+		+	+	+		+						+		
N407										+	+									
N429	+							+				+								
N443		+				+			+											
N447		+										+	+			-				
N451	+							+					-							
N452		+																		
CS3257	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+					
CS3138	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+						
yi/yi	+	+		+	+			+	+			+	+							
min/min																+		+		+
fas1/fas1						-						+								
fas2/fas2						+						+					+			
clv1/clv1																				

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 21, en la página 100.

Debido a que una de las líneas a estudio poseía tallo fasciado, se incluyeron en el análisis de complementación algunos mutantes con esta característica y obtenidos por otros autores, como *miniature*, *fasciated1*, *fasciated2* y *clavata1*, así como el denominado *yellow inflorescence* (*yi*), que presenta hojas aserradas e inflorescencia amarilla, todos las cuales fueron descritos en la **Tabla 9**, en la página 75. Los resultados obtenidos en el análisis de complementación permiten postular la existencia de los siguientes genes: *DEN18*, representado por N243 (*den18*); *DEN19*, por N316 (*den19*); *DEN20,* por N320 (*den20*); *DEN21* por N323 (*den21*); *DEN22,* por N343 (*den22*); *DEN23,* por N405 (*den23*); *DEN24,* por N407 (*den24*); *DEN25,* por N429 (*den25*); *DEN26,* por N443 (*den26*); *DEN27,* por N451 (*den27-1*) y N452 (*den27-2*); *DEN28,* por CS3138 (*den28*); y *SE,* por CS3257 (*se*). Además, se estableció que N371 es portadora de una mutación (*fas1-11*) alélica del gen *FAS1*, así como que N447 contiene un alelo del gen *YI*, *yi-2*. No se encontraron alelos de los genes *FAS2*, *MIN* o *CLV1.*

La posición del gen *SERRATE* en el cromosoma 2 fue determinada por Rédei e Hirono (1964), quienes no encontraron ningún doble mutante *se er/se er* entre varios cientos de descendientes F_2 de un cruzamiento CS3257 x L*er*, lo que se interpretó como evidencia de un ligamiento íntimo entre *SE* y *ER*. Con el fin de intentar una

determinación más precisa de la posición de *SE* en el mapa genético de *Arabidopsis thaliana*, se sembraron 1.759 semillas de la F_2 de un cruzamiento *se*/*se* x *as1-14*/*as1-14*, obteniéndose 909 plantas de fenotipo silvestre, 413 Serrate, 431 Asymmetric leaves1 y 6 con ambos fenotipos mutantes. Estos datos, analizados con el programa RecF2 (Koornneef y Stam, 1988) conducen a un valor de distancia de mapa de 12,16 $\pm$ 2,34 cM.

Por otra parte, se estudió el efecto de las giberelinas sobre el fenotipo Serrate (Figura 35), ya que se ha propuesto que estas hormonas promueven el cambio de fase y adelanta el comienzo del desarrollo reproductivo en el maíz (Evans y Poethig, 1995). Adicionalmente, se conocen en *Arabidopsis thaliana* mutaciones como *spindly* (Jacobsen y Olszewski, 1993), que causan floración temprana y un fenotipo similar al que manifiesta el tipo silvestre cuando es tratado con giberelinas. Otras mutaciones que afectan a la síntesis o la transducción de las señales de estas hormonas (de *ga1* a *ga5*, así como *gai*; Koornneef y van der Veen, 1980; Koornneef *et al*., 1983) provocan un retraso en el cambio de fase. Se sembraron semillas de *se* y de su ecotipo de procedencia, Col-1, en un medio de cultivo suplementado con ácido giberélico 500 μM, y se estudió el momento en que aparecían los tricomas abaxiales y los primordios florales, con el fin de emplear ambos caracteres como indicadores del estado de desarrollo de las plantas, con los resultados que aparecen en la Tabla 50. Se comprobó que la adición de giberelina al medio adelanta el desarrollo del ecotipo Col-1, fenocopiando parcialmente al mutante *serrate*. Por su parte, los mutantes extreman su fenotipo en presencia de la hormona.

Tabla 50.- Efectos de la giberelina sobre la morfología de las estirpes Col-1 y CS3257

	Col-1		CS3257	
	sin GA_3	con GA_3	sin GA_3	con GA_3
Tamaño y coloración de los cotiledones	Normales y oscuros	Grandes y claros	Alargados	Grandes y alargados
Longitud del hipocotilo	Corto	Mediano	Mediano	Largo
Longitud del peciolo	Normal	Largo	Largo	Largo
Hoja vegetativa en la que aparecen los tricomas abaxiales más tempranos	Sexta	Tercera	Primera	Primera (muy abundantes)
Momento en que aparecen los primeros primordios florales (días desde la siembra)	27	20	20	16
Número de hojas vegetativas	8-10	6-8	5-7	2-4

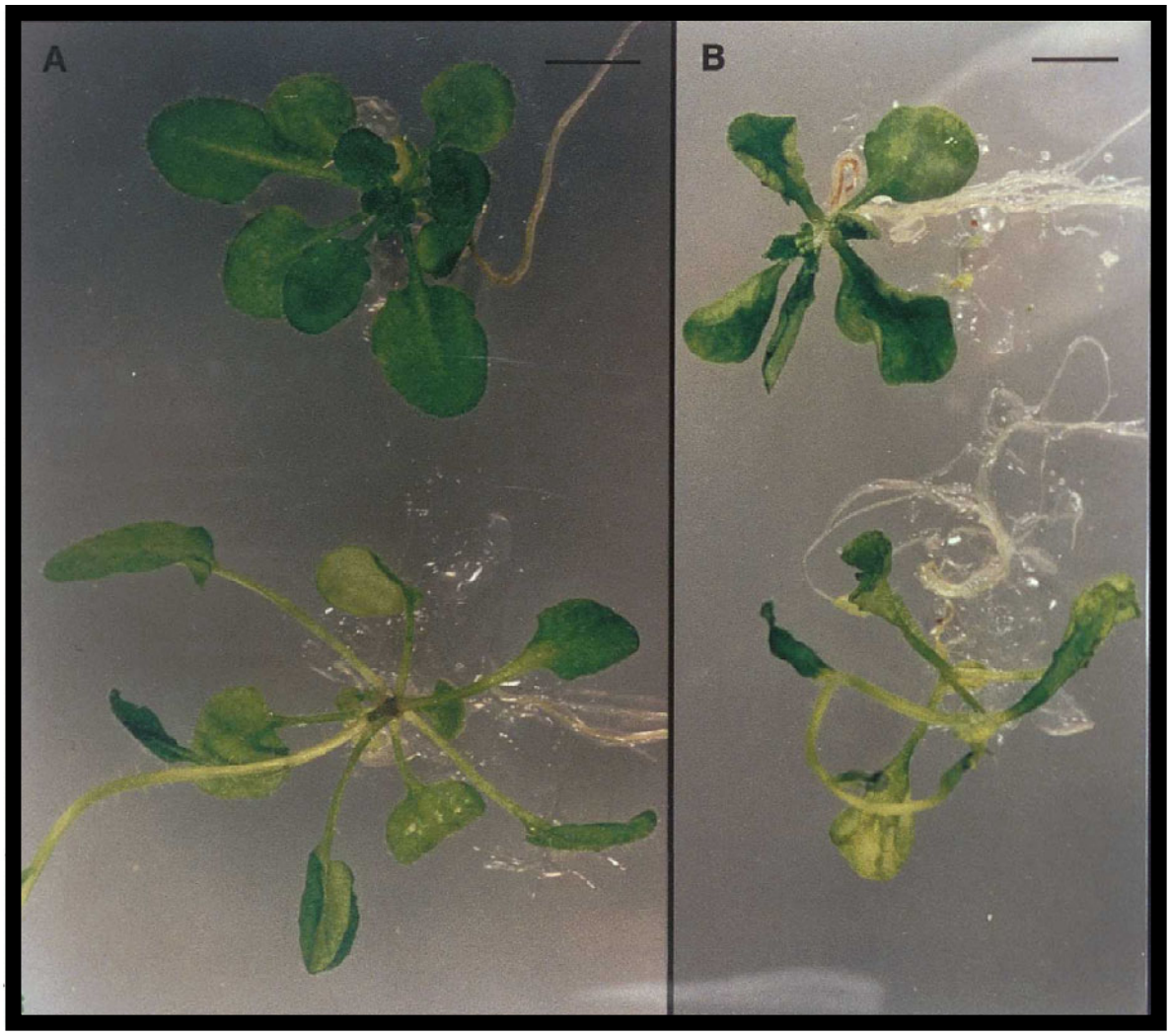


Figura 35.- Efecto de la giberelina sobre el mutante *serrate*. (A) La estirpe silvestre Col-1 en ausencia (arriba) o en presencia (abajo) de giberelina; (B) un individuo *serrate* en ausencia (arriba) o en presencia (abajo) de giberelina. Las fotografías se obtuvieron 26 días después de la siembra. Todas las barras de escala indican 5 mm.

IV.5.11.- Grupo fenotípico Compact rosette

Un grupo muy amplio de los mutantes de la colección del AIS muestra una roseta compacta, debida a la reducida longitud del peciolo de las hojas vegetativas, razón por la que se decidió asignar a esta clase la denominación de Compact rosette (Figura 36). Muchos de estos mutantes presentaban otros rasgos comunes, como la floración tardía y una inflorescencia arbustiva, por lo que fueron agrupados para ser estudiados separadamente, distinguiéndose la clase de fenotipo Compact rosette arbustivo de la correspondiente a los no arbustivos.

IV.5.11.1.- Clase fenotípica de los mutantes *compact rosette* arbustivos

Componen este grupo las líneas N303, N317, N318, N319, N331, N340, N352, N355, N356, N359, N365, N374, N387, N388, N389, N390, N398, N399, N402, N409, N416 y N417, con un fenotipo muy similar y claramente distinguible del silvestre (Figura 36). Presentan una roseta pequeña y muy compacta, con hojas de un color verde intenso. Su floración es tardía, a unos dos meses tras la siembra, apreciándose una inflorescencia de poco porte, con escasa dominancia apical y muchos tallos, muy rígidos, en los que no se observan hojas caulinares ni ramificaciones. Las flores, de fertilidad reducida, muestran un pedicelo colgante, pétalos cortos y un pistilo claramente prominente, apreciable antes de la apertura de los estambres

Tabla 51.- Estudio del modo de herencia del fenotipo Compact rosette arbustivo

Cruzamiento	F_1		F_2		Segregación[a]	
(**f** x **m**)	Silvestre	Mutante	Silvestre	Mutante	χ^2	P
N303 x An-1	14	0	144	56	0,81	0,3-0,5
N317 x En-2	10	0	64	20	0,02	0,9
N318 x En-2	8	0	140	47	0	> 0,95
N319 x En-2	7	0	129	40	0,1	0,7-0,8
N331 x En-2	13	0	136	40	0,1	0,7-0,8
N340[b] x En-2						
N352 x En-2	10	0	119	50	1,16	0,2-0,3
N355 x En-2	16	0	61	23	0,14	0,7-0,8
N356 x En-2	25	0	127	42	0	> 0,95
N359 x En-2	26	0	152	54	0,1	0,7-0,8
N365 x En-2	6	0	141	48	0	> 0,95
N374 x En-2	22	0	168	43	0,17	0,5-0,7
N387 x En-2	17	0	145	50	0,02	0,9
N388 x En-2	6	0	106	31	0,29	0,5-0,7
N389 x En-2	9	0	58	15	0,55	0,3-0,5
N390 x En-2	5	0	152	50	0	> 0,95
N398 x En-2	15	0	147	46	0,08	0,7-0,8
N399 x En-2	5	0	148	53	0,13	0,7-0,8
N402 x En-2	8	0	160	45	0,86	0,3-0,5
N409 x En-2	9	0	80	30	0,19	0,5-0,7
N416 x En-2	10	0	149	50	0	> 0,95
N417 x En-2	29	0	123	42	0	> 0,95

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 20, en la página 99. [a]Se expresa el valor de χ^2 obtenido al contrastar la hipótesis de que los datos observados en F_2 se ajustan a la segregación fenotípica 3:1. [b]No se obtuvo descendencia de sus cruzamientos con En-2.

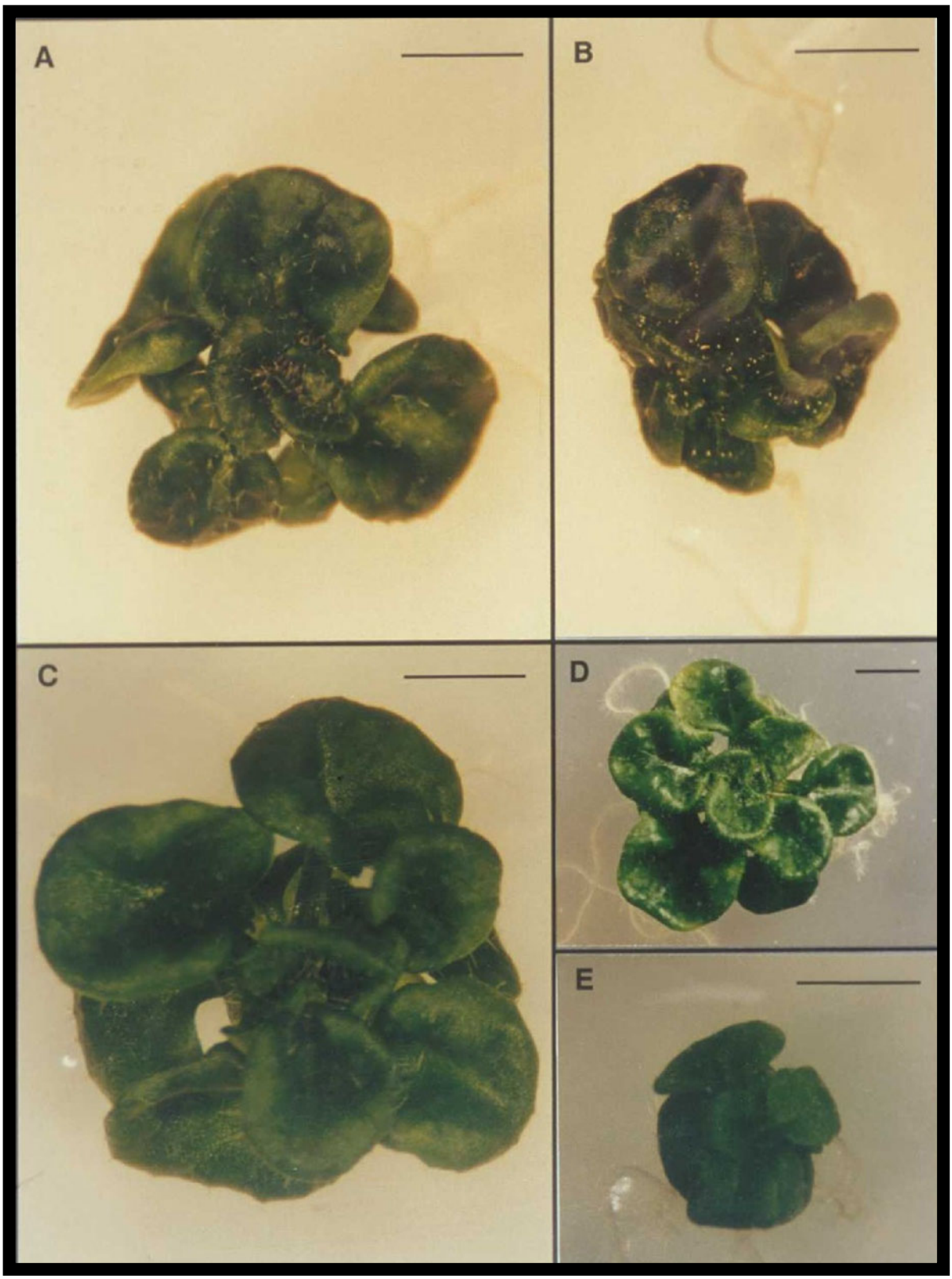


Figura 36.- Individuos representativos del fenotipo Compact rosette arbustivo. Los mutantes ilustrados en las fotografías son: (A) N359 (*cro1-4*/*cro1-4*), (B) N356 (*cro2-3*/*cro2-3*), (C) N399 (*cro5*/*cro5*), (D) N365 (*cro3-1*/*cro3-1*), y (E) N402 (*cro6-2*/*cro6-2*). Las fotografías se obtuvieron 24 (A y B) y 32 (C, D y E) días después de la siembra. Todas las barras de escala indican 5 mm.

Algunas líneas muestran rasgos no compartidos por las restantes del grupo: N319 es glabra y posee semillas amarillas, mientras que los tricomas de N399 no están ramificados. El estudio del modo de herencia del fenotipo Compact rosette arbustivo se realizó como en otros apartados de esta Tesis, mediante cruzamientos con el ecotipo de procedencia, en todos los casos En-2, excepto para N303, que deriva del ecotipo Antwerpen-1 (An-1; Tabla 51). Toda la descendencia F_1 obtenida mostró fenotipo silvestre. En cuanto a las segregaciones fenotípicas observadas en la F_2 resultante de la autofecundación de las plantas F_1, indicaron el carácter monogénico y recesivo de todas las mutaciones causantes de los fenotipos Compact rosette arbustivos a estudio. Dos de las líneas analizadas, N319 y N399, resultaron ser dobles mutantes, portadoras de una mutación adicional y aparentemente no ligada a la causante del fenotipo Compact rosette (Cro), según se recoge en la Tabla 52.

Tabla 52.- Segregación de fenotipos secundarios en estirpes Compact rosette arbustivas

Cruzamiento	F_1		F_2				Segregación[a]	
(**f** x **m**)	Silvestre	Cro	Silvestre	Mutación adicional	Cro	Doble mutante	χ^2	P
N319 x En-2	7	0	90	39[b]	30	10	2,08	0,5-0,7
N399 x En-2	5	0	62	14[c]	16	4	2,96	0,3-0,5

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 20, en la página 99. [a]Se expresa el valor de χ^2 obtenido al contrastar la hipótesis de que los datos observados en F_2 se ajustan a la segregación fenotípica 9:3:3:1 (Silvestre:Fenotipo mutante adicional:Cro:Fenotipo doble mutante). [b]*transparent testa, glabra* (*ttg*): mutación que provoca una coloración amarilla de la semilla y ausencia de tricomas (Koornneef, 1981); [c]*stickle* (*sti*): mutación que provoca que los tricomas no se ramifiquen (Hülskamp *et al.,* 1994).

Tras comprobar que todas las estirpes de este grupo heredaban su fenotipo mutante de un modo monogénico y recesivo, se determinó el número de *loci* cuya alteración causaba el fenotipo Cro, con los resultados que se presentan en la Tabla 53.

El análisis de complementación nos permitió establecer la existencia de siete genes: *CRO1* está representado por las estirpes N303 (*cro1-1*), N319 (*cro1-2*), N352 (*cro1-3*), N359 (*cro1-4*), N387 (*cro1-5*), N389 (*cro1-6*), N390 (*cro1-7*) y N416 (*cro1-8*); *CRO2*, *CRO3* y *CRO4*, con tres alelos cada uno, correspondientes a las estirpes N318 (*cro2-1*), N355 (*cro2-2*), N356 (*cro2-3*), N365 (*cro3-1*), N374 (*cro3-2*), N409 (*cro3-3*), N317 (*cro4-1*), N388 (*cro4-2*) y N417 (*cro4-3*); *CRO5* y *CRO7* con sólo un alelo cada uno, los de las estirpes N399 (*cro5*) y N331 (*cro7*); y finalmente, *CRO6*, que cuenta con dos alelos, los de N398 (*cro6-1*) y N402 (*cro6-2*).

Tabla 53.- Complementación entre los mutantes *compact rosette* arbustivos

m	N303	N317	N318	N319	N331	N352	N355	N356	N359	N365	N374	N387	N388	N389	N390	N398	N399	N402	N409	N416	N417
N303			+	-	+	-	+	+	-		+	-	+			+	+		+	-	+
N317																					
N318		+			+		-	-		+	+		+	+		+			+		+
N319						-											+				+
N331		+				+	+	+				+				+	+				+
N352	-				+		+		-					-	-	+	+	+	+		
N355	+					+			+	+			+		+	+	+		+		+
N356							-			+	+		+			+					
N359	-	+				-	+	+		+							+				
N365					+						-		+		+	+					
N374					+		+									+	+				+
N387	-					-											+		+	-	
N388		-			+										+	+			+		-
N389		+					+									+	+	+	+		
N390		+	+		+			+		+											+
N398		+	+								+		+				+	-			
N399	+	+	+			+	+	+	+	+		+	+	+	+	+		+	+	+	+
N402																					
N409	+	+			+			+		-	-			+	+	+		+			+
N416																			+		
N417		-				+		+		+				+		+		+			

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 21, en la página 100.

Otro aspecto a destacar es la gradación de los efectos fenotípicos de los alelos de *CRO4* (Figura 37). En base a rasgos como la compacidad de la roseta, el porte de la inflorescencia y la fertilidad, puede definirse una serie alélica ordenada, en la que el alelo de fenotipo mutante más extremo es *cro4-2,* siendo el más débil *cro4-1*, y *cro4-3*, intermedio entre las anteriores. Tras los cruzamientos entre dichas líneas para establecer la existencia de alelismo, se pudo comprobar que sus descendientes F_1 manifestaban fenotipos intermedios entre los de sus parentales. Los genotipos obtenidos pueden ordenarse, de mayor a menor intensidad de su fenotipo mutante, del modo siguiente: *cro4-2*/*cro4-2* > *cro4-2*/*cro4-3* > *cro4-2*/*cro4-1* = *cro4-3*/*cro4-3* > *cro4-3*/*cro4-1* > *cro4-1*/*cro4-1.*

Con el fin de obtener dobles mutantes, se estudió la descendencia F_2 resultante de la autofecundación de las plantas F_1 obtenidas a partir de cruzamientos entre estirpes portadoras de mutaciones no alélicas en genes *CRO* (véase la Tabla 54).

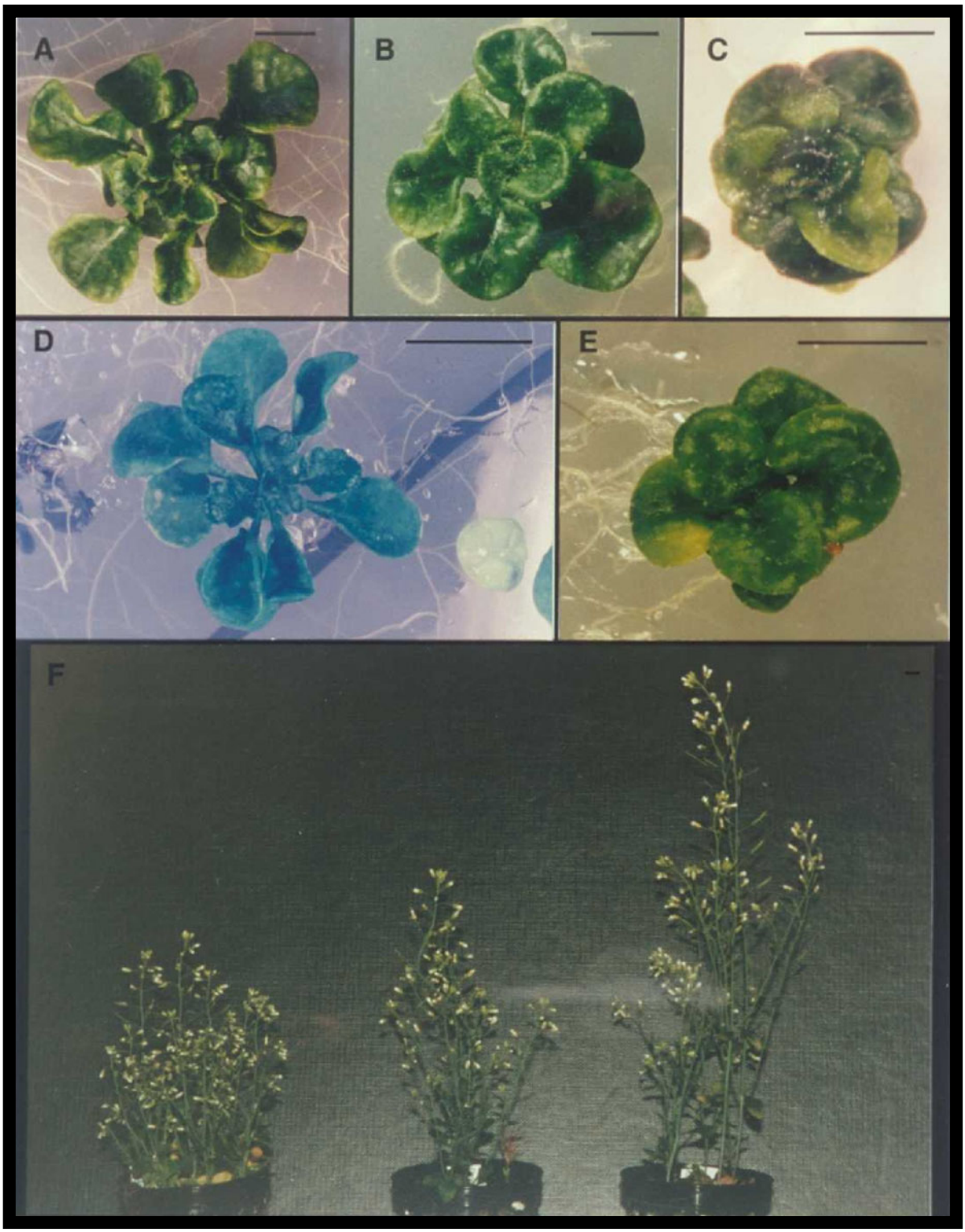


Figura 37.- Individuos representativos de los fenotipos a los que da lugar la serie alélica de *CRO4*. Los mutantes ilustrados en las fotografías son: (A) N317 (*cro4-1*/*cro4-1*), (B) N417 (*cro4-3*/*cro4-3*), (C) N388 (*cro4-2*/*cro4-2*), (D) *cro4-1*/*cro4-3*, y (E) *cro4-2*/*cro4-3*. (F) Plantas con flores, de genotipos *cro4-2*/*cro4-3* (izquierda), *cro4-1*/*cro4-2* (centro), y *cro4-1*/*cro4-3* (derecha). Las fotografías fueron tomadas 27 (A-E) y 45 (F) días después de la siembra. Todas las barras de escala indican 5 mm.

Tabla 54.- Interacciones entre algunas mutaciones *compact rosette*

Cruzamiento	F_1		F_2		Segregación[a]	
(**f** x **m**)	Silvestre	Mutante	Silvestre	Mutante	χ^2	P
cro1-7/cro1-7 x *cro2-3/cro2-3*	23	0	104	94	0,97	0,3-0,5
cro1-3/cro1-3 x *cro3-3/cro3-3*	14	0	51	40	0,00	> 0,95
cro1-2/cro1-2 x *cro4-3/cro4-3*	34	0	84	82	1,93	0,1-0,2
cro1-1/cro1-1 x *cro5/cro5*	22	0	50	40	0,00	> 0,95
cro6-1/cro6-1 x *cro1-8/cro1-8*	20	0	64	42	0,58	0,3-0,5
cro2-3/cro2-3 x *cro3-1/cro3-1*	35	0	102	90	0,64	0,3-0,5
cro2-3/cro2-3 x *cro4-2/cro4-2*	33	0	110	82	0,05	0,8-0,9
cro5/cro5 x *cro2-3/cro2-3*	12	0	76	66	0,33	0,5-0,7
cro3-3/cro3-3 x *cro4-3/cro4-3*	23	0	62	60	1,25	0,2-0,3
cro5/cro5 x *cro3-3/cro3-3*	21	0	61	43	0,16	0,5-0,7
cro5/cro5 x *cro4-3/cro4-3*	15	0	106	70	0,98	0,3-0,5

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 20, en la página 99. [a]Se expresa el valor de χ^2 obtenido al contrastar la hipótesis de que los datos observados en F_2 se ajustan a la segregación fenotípica 9:7.

No se encontraron individuos F_2 con un fenotipo extremo que indicase su condición de presuntos dobles mutantes, ni fue posible establecer inequívocamente si uno de los fenotipos parentales era epistático sobre el otro, dada su gran semejanza. Sin embargo, el análisis de las segregaciones obtenidas en F_2 indica como hipótesis más verosímil la de la existencia de epistasia de genes recesivos duplicados.

El fenotipo de las estirpes *cro* es semejante al de algunos mutantes previamente descritos (Chory *et al*., 1989; 1991), alterados en la respuesta fototrópica, que se caracterizan por la compacidad de su roseta, de color oscuro, así como por no mostrar alargamiento del hipocotilo y desarrollar hojas en la oscuridad. En consecuencia, se intentó establecer si los mutantes *cro* mostraban alteraciones en la respuesta fototrópica, cultivándolos en presencia y ausencia de luz, con los resultados de la Tabla 55. Se comprobó que existen alteraciones en la respuesta fototrópica de todos los mutantes *cro* arbustivos. Para establecer la eventual existencia de relaciones de alelismo, se cruzaron plantas representativas de cada uno de los grupos de complementación *CRO* con estirpes portadoras de mutaciones que alteran la respuesta fototrópica, concretamente *det1*, *det2* y *det3* (Chory *et al*., 1989; 1991; Cabrera y Poch *et al*., 1993). La observación de los fenotipos de estas estirpes en nuestras condiciones de trabajo, tanto en presencia como en ausencia de luz, nos permitieron establecer que únicamente *det2* parecía semejante a alguno de los mutantes *cro*, en especial por el aspecto de su roseta.

Tabla 55.- Respuesta a la luz de los mutantes *compact rosette*

Línea	Compacidad de la roseta (con luz)	Longitud del hipocotilo (en la oscuridad)
En-2	0	4
det1-1/det1-1	0	0, HR
det2-1/det2-1	3	0
det3-1/det3-1	2	0
cro1-1/cro1-1	3	1
cro1-2/cro1-2	3	1
cro1-3/cro1-3	2	1
cro1-4/cro1-4	2	1
cro1-5/cro1-5	2	2
cro1-6/cro1-6	3	1
cro1-7/cro1-7	2	2
cro1-8/cro1-8	4	0
cro2-1/cro2-1	4	0
cro2-2/cro2-2	3	0
cro2-3/cro2-3	4	0
cro3-1/cro3-1	2	2
cro3-2/cro3-2	3	2
cro3-3/cro3-3	2	2
cro4-1/cro4-1	1	3
cro4-2/cro4-2	3	1
cro4-3/cro4-3	2	2
cro5/cro5	2	2
cro6-1/cro6-1	3	2
cro7/cro7	1	2
icu5/icu5	1	3

En la columna en la que aparecen los datos correspondientes a cultivos iluminados se expresa con un 0 el fenotipo silvestre y con los valores 1-4, grados superiores de compacidad de la roseta, según una escala subjetiva. Los datos relativos a los cultivos realizados en la oscuridad expresan el grado de alargamiento del hipocotilo, indicando un 4 la situación silvestre, con un hipocotilo muy largo y cotiledones que no se abren, y correspondiendo el resto de los valores a longitudes del hipocotilo inferiores a la silvestre. En esta columna, un 0 indica una longitud de hipocotilo obtenida en la oscuridad pero similar a la del tipo silvestre cuando crece en presencia de luz. HR indica la aparición de hojas de la roseta.

Se conocen otras estirpes mutantes que también presentan roseta compacta, cuyo fenotipo se normaliza parcialmente en presencia de giberelinas exógenas (*ga1* a *ga5*; Koornneef y van der Veen, 1980). Con el fin de establecer si existía alguna semejanza en cuanto a la respuesta a estas hormonas entre dichas estirpes y los mutantes *cro*, se estudió el efecto de la giberelina sobre estos últimos, con los resultados que recoge la Tabla 56. Puede observarse en dicha tabla que el tratamiento con giberelina no modifica el fenotipo Cro, a diferencia de lo que ocurre con los mutantes *ga*.

Tabla 56.- Respuesta de los mutantes *compact rosette* a la giberelina

Estirpe	Compacidad de la roseta	
	En medio sin giberelina	En medio suplementado con GA_3 500 μM
L*er*	3	2
En-2	3	2
ga1-1/ga1-1	4	3
ga2-1/ga2-1	4	3
ga3-1/ga3-1	4	3
ga4-1/ga4-1	4	3
ga5-1/ga5-1	4	3
gai-1/gai-1	4	4
spy-3/spy-3	2	1
cro1-3/cro1-3	4	4
cro1-6/cro1-6	4	4
cro2-1/cro2-1	4	4
cro3-3/cro3-3	4	4
cro4-3/cro4-3	4	4
cro5/cro5	4	4
cro6-1/cro6-1	4	4

Se emplea una escala subjetiva, distinta a la utilizada en la Tabla 55, en la que un 4 indica el grado mayor de compacidad de la roseta, y un 1, el mínimo, correspondiendo un 3 al fenotipo silvestre.

Tabla 57.- Complementación entre las estirpes *compact rosette* y algunos mutantes con alteraciones en la respuesta fototrópica y a giberelina

f \ m	*ga4-1/ga4-1*	*ga5-1/ga5-1*	*gai-1/gai-1*	*det1-1/det1-1*	*det2-1/det2-1*	*det3-1/det3-1*
cro1-2/cro1-2					-	
cro1-3/cro1-3	+	+	+			
cro1-6/cro1-6				+		
cro2-2/cro2-2	+	+	+		+	
cro2-3/cro2-3				+		
cro3-3/cro3-3	+	+		+	+	+
cro4-3/cro4-3	+	+	+	+	+	+
cro5/cro5	+	+	+	+	+	+
cro6-1/cro6-1				+	+	+
cro7/cro7		+				

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 21, en la página 100.

Se llevaron a cabo cruzamientos entre estirpes representativas de cada uno de los genes *CRO* y los mutantes alterados en la respuesta fototrópica o a la giberelina. Los resultados de este análisis de complementación, que se reflejan en la Tabla 57, confirmaron nuestras observaciones anteriores, ya que se demostró que el grupo de complementación *CRO1* estaba integrado por alelos del gen *DET2*.

IV.5.11.2.- Clase fenotípica de los mutantes *compact rosette* no arbustivos

Las líneas asignadas a este grupo (N254, N307, N334, N341, N342, N354, N368, N370, N375, N377, N380, N403, N411, N420, N422, N425, N427, N428, N445, N446, N454, N455 y N462) presentan una roseta compacta, debida al acortamiento del peciolo (Figura 38). Se trata de un grupo heterogéneo, ya que algunas presentan una coloración muy clara, casi amarillenta (N427 y N428), otras muestran hojas ligeramente onduladas (N334, N368, N403, N411y N462), o floración tardía (N342, N354, N368, N370 y N377). El modo de herencia de sus fenotipos se determinó según recoge la Tabla 58.

Tabla 58.- Estudio del modo de herencia del fenotipo Compact rosette no arbustivo

Cruzamiento	F_1		F_2		Segregación[a]	
(**f** x **m**)	Silvestre	Mutante	Silvestre	Mutante	χ^2	P
N254 x S96	20	0	52	16	0,02	0,9
N307 x An-1[b]						
N334 x En-2	30	0	76	22	0,22	0,5-0,7
N341 x En-2	15	0	20	28[c]		
N342 x En-2	4	0	30	40[c]		
N354 x En-2	20	0	50	52[c]		
N368 x En-2	50	0	72	19	0,62	0,3-0,5
N370 x En-2	13	0	51	36[c]		
N375 x En-2	15	0	16	38[d]		
N377 x En-2	14	0	25	65[e]		
N380 x En-2[b]						
N403 x En-2	15	0	78	24	0,05	0,8-0,9
N411 x En-2	20	0	62	41[f]		
N420 x En-2[b]						
N422 x En-2	17	0	70	30[c, g]		
N425 x En-2	18	0	82	20[c]		
N427 x En-2	20	0	60	38[c]		
N428 x En-2	15	0	65	30[c]		
N445 x En-2	10	0	66	25	0,18	0,5-0,7
N446 x En-2	13	0	69	27	0,35	0,5-0,7
N454 x En-2[b]						
N455 x En-2	20	0	90	15[c]		
N462 x En-2	21	0	75	20	0,59	0,3-0,5

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 20, en la página 99. [a]Se expresa el valor de χ^2 obtenido al contrastar la hipótesis de que los datos observados en F_2 se ajustan a la segregación fenotípica 3:1. [b]Todos los cruzamientos resultaron infructuosos. [c]El fenotipo mutante se manifestó con expresividad muy variable, por lo que fue imposible su distinción inequívoca del tipo silvestre. [d]Se incluyen 5 plantas con hojas alargadas, 19 de roseta compacta, 8 albinas y 6 de roseta muy pequeña. [e]Se incluyen 26 plantas albinas y 4 variegadas. [f]Aparecieron entre ellas 24 plantas albinas y 17 de color muy claro. [g]Segregan para presencia o ausencia de tricomas.

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

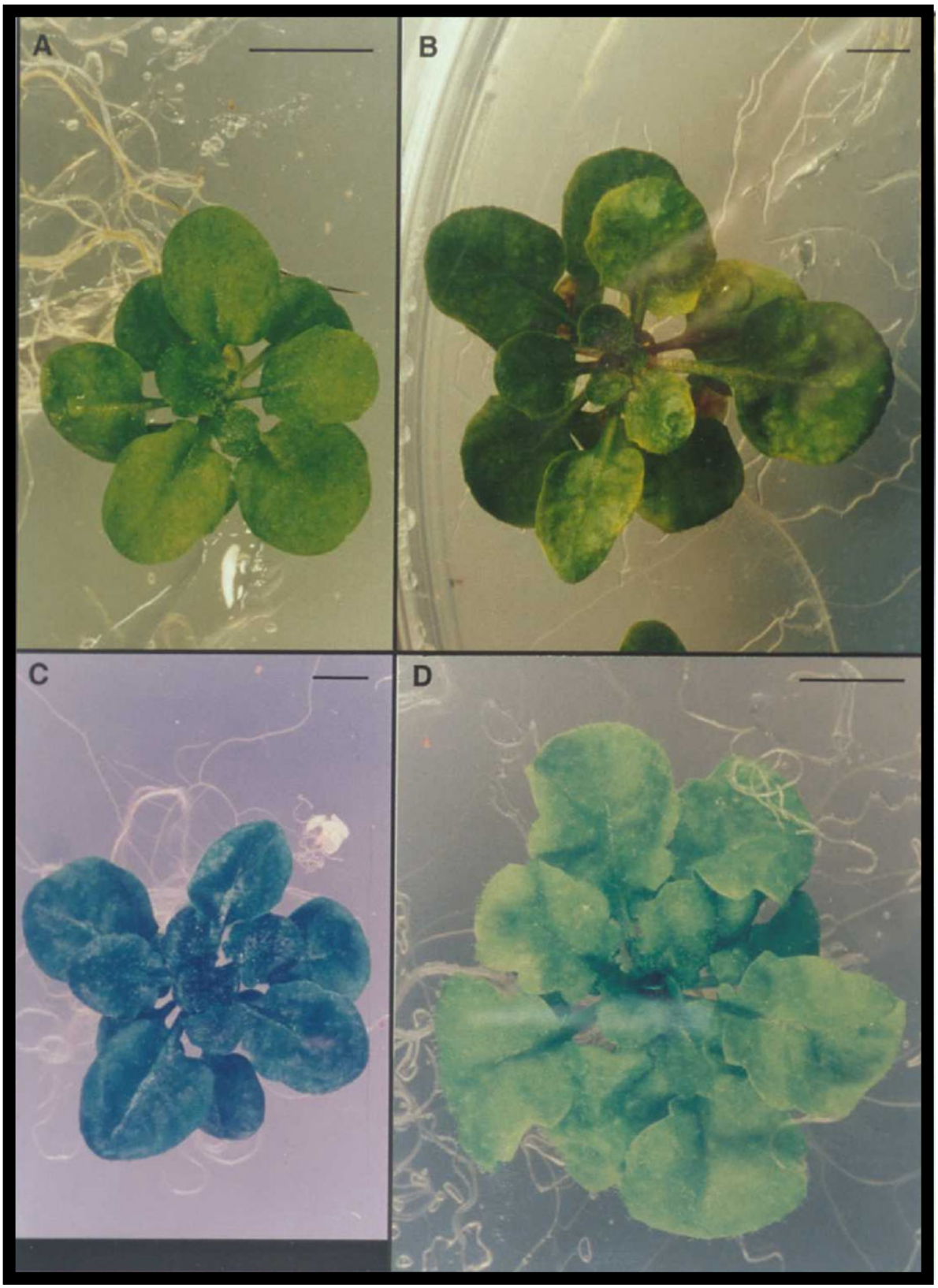


Figura 38.- Individuos representativos del fenotipo Compact rosette no arbustivo. Los mutantes ilustrados en las fotografías son: (A) N254 (*cro10*/*cro10*), (B) N334 (*cro11*/*cro11*), (C) N446 (*cro8-2*/*cro8-2*), y (D) N462 (*cro13*/*cro13*). Las fotografías se obtuvieron 32 días después de la siembra. Todas las barras de escala indican 5 mm.

Puede apreciarse en la Tabla 58 que algunas de las líneas son portadoras de varias mutaciones, y que el fenotipo Cro reapareció en F_2 con expresividad variable. Para el análisis de complementación se emplearon únicamente aquellas estirpes cuyo fenotipo se transmitía de modo genuinamente monogénico y recesivo, incluyendo en las correspondientes series de cruzamientos dos estirpes mutantes de roseta compacta, obtenidas por autores anteriores, *cp2* y *cp3* (Koornneef *et al*., 1983). Se determinó la existencia de seis genes, *CRO8* a *CRO13*, cuyos alelos son los siguientes: *cro8-1* (correspondiente a la estirpe N445), *cro8-2* (N446), *cro9* (N403), *cro10* (N254), *cro11* (N334), *cro12* (N368) y *cro13* (N462).

Tabla 59.- Complementación entre los mutantes *compact rosette* no arbustivos

f \ m	N254	N334	N403	N368	N445	N446	N462	*cp2*/*cp2*	*cp3*/*cp3*
N254		+	+	+			+		
N334	+		+				+		
N403				+	+		+	+	
N368		+	+		+		+		
N445		+				-	+	+	+
N446	+	+	+		-		+		
N462								+	+
cp2/*cp2*									
cp3/*cp3*			+						

Se siguen las pautas de la Tabla 21, en la página 100.

IV.6.- Estudio de interacciones entre mutaciones de diferentes clases fenotípicas

La práctica totalidad de las interacciones genéticas analizadas en este trabajo se estudiaron en dobles mutantes obtenidos en la F_2 de cruzamientos realizados entre líneas de la misma clase fenotípica. Sin embargo, se obtuvieron también algunos dobles mutantes a partir de estirpes pertenecientes a diferentes clases fenotípicas, de fenotipos aparentemente poco relacionados. En la Figura 39 aparecen algunos de tales dobles mutantes, obtenidos mediante la combinación de las mutaciones *serrate* (de la clase Denticulata, véase la página 133), *angustifolia* (de la clase Angusta, véase la página 129), *as1* y *as2* (de la clase Asymmetric leaves, véase la página 124). En todos estos casos se constató la mera aditividad de los fenotipos mutantes, indicativa de la probable independencia de los procesos alterados en cada uno de ellos.

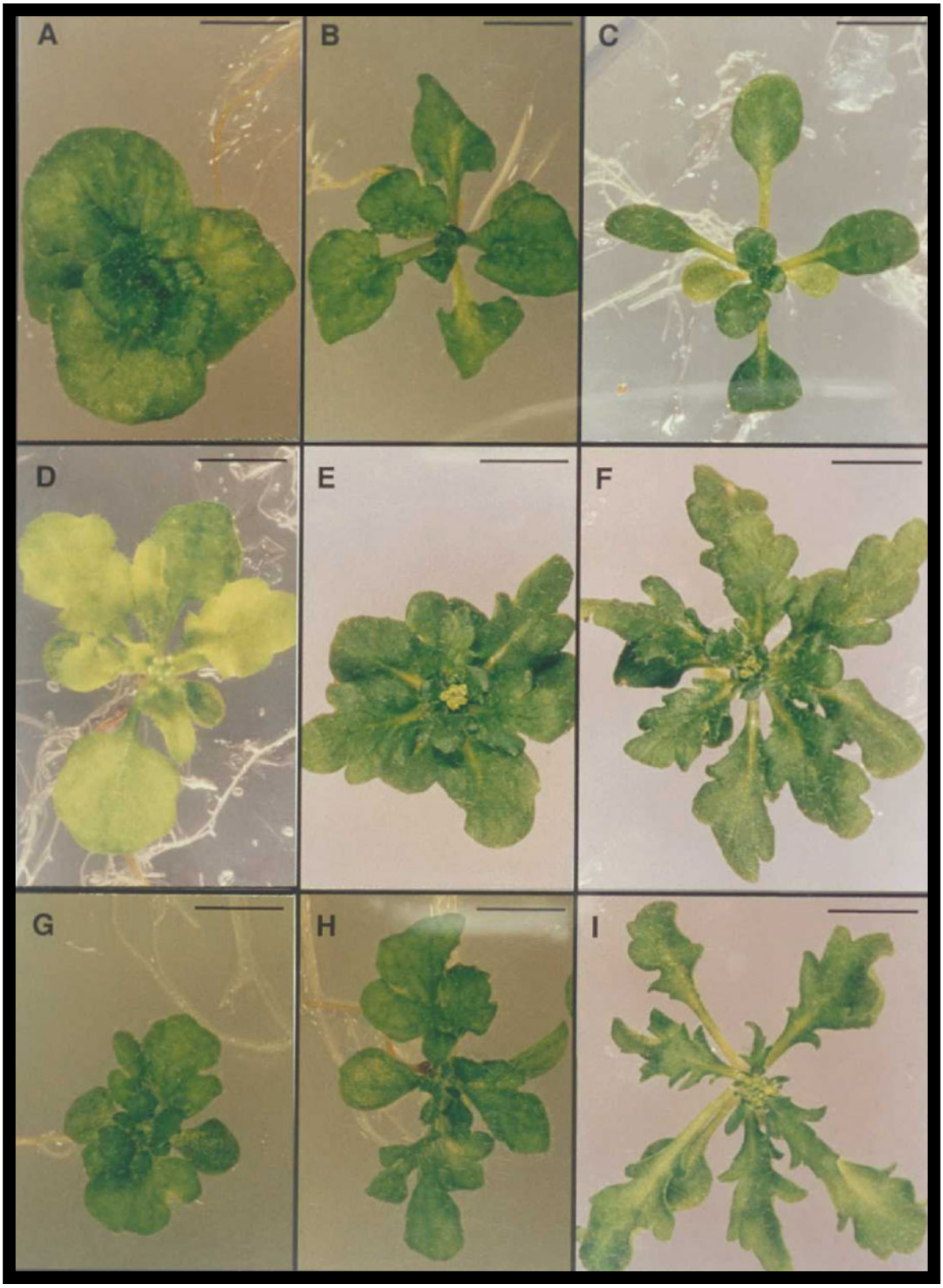


Figura 39.- Individuos representativos de los fenotipos obtenidos en el estudio de las interacciones entre los mutantes *an*, *as1*, *as2* y *se*. Los mutantes ilustrados en las fotografías son (A) *as1*/*as1*, (B) *as2*/*as2*, (C) *an*/*an*, (D) *se*/*se*, (E) *an/an;as1/as1,* (F) *an/an;as2/as2*, (G) *as1/as1;se/se,* (H) *se/se;as2/as2,* e (I) *se/se;an/an.* Las fotografías se obtuvieron 22 (A, B, C, D, G y H) y 34 (D, E e I) días después de la siembra. Todas las barras de escala indican 5 mm.

IV.7.- Asignación de denominaciones de alelo

Las correspondencias entre líneas mutantes y alelos establecidas a lo largo de esta Tesis se resumen en la Tabla 60.

Tabla 60.- Equivalencias entre denominaciones de alelo y números de catálogo de los mutantes

Código	Alelo	Código	Alelo	Código	Alelo	Código	Alelo
N313	*icu1-1*	CS3397	*inl*	N407	*den24*	N409	*cro3-3*
N328	*icu1-2*	N321	*as1-14*	N429	*den25*	N317	*cro4-1*
N345	*icu1-3*	N444	*as1-15*	N443	*den26*	N388	*cro4-2*
N346	*icu1-4*	CS3240	*as1-16*	N451	*den27-1*	N417	*cro4-3*
N347	*icu1-5*	CS3250	*as1-17*	N452	*den27-2*	N399	*cro5*
N350	*icu1-6*	N463	*as2-12*	CS3138	*den28*	N398	*cro6-1*
N351	*icu1-7*	N230	*as2-13*	N447	*yi-2*	N402	*cro6-2*
N419	*icu1-8*	N241	*ang5*	CS3257	*se*	N331	*cro7*
N329	*icu2*	N333	*ang6*	N303	*det2-11*	N445	*cro8-1*
N314	*icu3*	N336	*ang7*	N319	*det2-12*		*cro8-2*
N400	*icu4-1**	N325	*flr*	N352	*det2-13*		
N401	*icu4-2**	CS3254	*flv*	N359	*det2-14*	N403	*cro9*
N379	*icu5***	N438	*exi8*	N387	*det2-15*	N254	*cro10*
N242	*icu11*	N324	*cay*	N389	*det2-16*	N334	*cro11*
N311	*icu12*	N243	*den18*	N390	*det2-17*	N368	*cro12*
N349	*icu13*	N316	*den19*	N416	*det2-18*	N462	*cro13*
N330	*icu14-1*	N320	*den20*	N318	*cro2-1*		
N353	*icu14-2*	N323	*den21*	N355	*cro2-2*		
N357	*icu15-1*	N343	*den22*	N356	*cro2-3*		
N431	*icu15-2*	N371	*fas1-11*	N365	*cro3-1*		
N423	*tcu4*	N405	*den23*	N374	*cro3-2*		

*Mutación semidominante. **Mutación dominante. Todas las restantes son recesivas.

IV.8.- Análisis de ligamiento de los genes identificados en los estudios de complementación

En esta Tesis se ha iniciado, pero no se ha completado, la cartografía génica de las mutaciones a estudio. Para ello, tal como se recoge en la Tabla 61, se cruzaron individuos representativos de varios de los grupos de complementación definidos a lo largo de esta memoria, por estirpes portadoras de marcadores fenotípicos convencionales (véase la Tabla 10, en la página 77). La descendencia F_2 de dichos cruzamientos permitirá, fuera del marco de esta Tesis, determinar la existencia de ligamiento entre las mutaciones a estudio y los mencionados marcadores. Alternativamente, las poblaciones de semillas F_2 obtenidas se emplearán para llevar a

cabo una cartografía génica mediante análisis del ligamiento a variaciones en la longitud de microsatélites. Esta técnica de cartografía génica mediante el uso de marcadores moleculares, conocida como SSLP (polimorfismos en la longitud de secuencias simples; *simple sequence length polymorphisms*; Bell y Ecker, 1994) ha sido sustancialmente mejorada en el laboratorio de J. L. Micol, de manera que puede llevarse a cabo de modo semiautomatizado, con un secuenciador Perkin Elmer ABI 377, tras la realización de amplificaciones de PCR múltiple con cebadores marcados con fluorocromos (Ponce, Robles y Micol, pendiente de aceptación). Dicha cartografía se verá facilitada por el hecho de que las estirpes marcadoras relacionadas en la Tabla 61 tienen a L*er* como ecotipo originario, mientras que los mutantes estudiados en esta Tesis derivan de En-2, Col-1, S96 o Dijon-G.

Tabla 61.- Cruzamientos realizados para el análisis de ligamiento de los mutantes

f / m	N3078	N3079	N3080	NW151
N325	+	+	+	
N329	+	+	+	+
N345	+	+	+	+
N331	+	+	+	
N353	+	+	+	
N356	+	+	+	+
N318				+
N365	+	+	+	+
N379	-	-	-	
N387	+	+	+	
N319				+
N388	+	+	+	+
N417				+
N398	+	+	+	
N399	+	+	+	+
N400	-	-	-	
N403	+	+	+	
N446	+	+	+	
N416	+	+	+	+

Los signos + y - indican, respectivamente, un fenotipo silvestre o mutante en todos los individuos de la F_1 de un cruzamiento, correspondiendo el segundo de estos casos a la implicación de una mutación dominante o semidominante.

V.- DISCUSION

V.1.- Una aproximación genética al análisis de la morfogénesis de la hoja en *Arabidopsis thaliana*

El desarrollo de la hoja ha recibido poca atención hasta ahora en lo referente a su análisis causal. Esta es una afirmación en la que coinciden todas las revisiones sobre el tema publicadas en nuestra década (Hake y Sinha, 1991; Smith y Hake, 1992; Sinha *et al*., 1993; Telfer y Poethig, 1994; Tsukaya, 1995; Sylvester *et al*., 1996; Hall y Langdale, 1996; Poethig, 1997; Brutnell y Langdale, 1998; van Lijsebettens y Clarke, 1998). Su abundancia no debe llevar a engaño, ya que el número de revisiones publicadas es muy superior al de los genes cuya implicación en el control de la ontogenia foliar se ha demostrado fehacientemente. De hecho, no es fácil concebir un protocolo de identificación de genes responsables del desarrollo de la hoja en base a la clonación de genes homólogos o al aislamiento de productos génicos de expresión restringida a un tejido u órgano, dos de los procedimientos más comunes en la biología del desarrollo de nuestros días. Por un lado, la inexistencia en sistemas animales de procesos análogos a la morfogénesis foliar fuerza a descartar cualquier estrategia basada en la clonación por homología con genes previamente descritos. Por otro, en la hoja tienen lugar procesos como la fotosíntesis y el intercambio de gases con el ambiente, en los que participa un número considerable de productos génicos presumiblemente ausentes o peor representados en otros órganos. En consecuencia, el repertorio de aproximaciones experimentales útiles para llevar a cabo una búsqueda de genes que controlen el desarrollo de la hoja se limita hoy por hoy a una sola: la obtención y estudio de mutantes.

Esta Tesis, en la que se ha estudiado un considerable número de mutantes y ecotipos, constituye una parte de un proyecto más amplio, un intento de disección genética del desarrollo de la hoja mediante el aislamiento y estudio de variantes de *Arabidopsis thaliana* con alteraciones en aspectos fundamentales de la arquitectura de la hoja: la forma, el tamaño, la configuración del margen y el patrón de venación (véase el apartado II, en la página 55). La búsqueda de tales variantes en la morfología de la hoja se ha llevado cabo en colecciones de estirpes silvestres (Candela Antón, Tesis doctoral en realización; Candela, Martínez-Laborda y Micol, pendiente de aceptación; esta Tesis) y en mutantes obtenidos por autores anteriores (esta Tesis), así como en mutantes aislados en el laboratorio de J. L. Micol (Berná Amorós, 1997; Robles Ramos,

Tesis doctoral en realización; Berná, Robles y Micol, pendiente de aceptación; Candela Antón, Tesis doctoral en realización; Pérez Pérez, Tesis doctoral en realización).

V.2.- Análisis del crecimiento de las hojas vegetativas del ecotipo Enkheim-2

Se han realizado numerosos estudios sobre el crecimiento de la hoja en diferentes especies vegetales, dicotiledóneas como la alubia (*Phaseolus vulgaris*; Dale, 1964), el haba (*Vicia faba*; Dennet *et al.,* 1978), la soja (*Glycine max*; Barthou y Buis, 1988), el tomate (*Lycopersicon esculentum*; Dengler, 1984), el tabaco (*Nicotiana tabacum*; Poethig y Sussex, 1985a), la vid (*Vitis riparia*; Lacroix y Posluszny, 1990) y la calabaza (*Cucurbita argyrosperma*; Jones, 1993), y monocotiledóneas como la festuca (*Festuca arundinacea*; Skinner y Nelson, 1994). Pueden consultarse al respecto las revisiones de Cusset (1986) y Dale (1988). En *Arabidopsis thaliana* se han publicado estudios sobre la expansión de los cotiledones (Tsukaya *et al.,* 1994), de la primera hoja (Pyke *et al.,* 1991) o de todas las hojas vegetativas (Tsuge *et al.,* 1996). Aunque estos estudios se han llevado a cabo con enfoques y metodologías muy diferentes, puede concluirse que existen varios mecanismos de crecimiento foliar. En algunas especies como la vid, la forma final del órgano se manifiesta tempranamente, ocurriendo después un incremento en tamaño que no conlleva variaciones en las proporciones de la hoja. En otras como la calabaza, por el contrario, la hoja cambia progresivamente de forma a lo largo de su expansión, más acusadamente en las etapas finales.

El análisis cuantitativo de los parámetros que definen la anatomía de la hoja en una estirpe silvestre de referencia permite una caracterización precisa de la morfología de este órgano. Además, constituye un paso previo al estudio de otros ecotipos y líneas mutantes, al hacer posible la determinación cuantitativa de sus diferencias con la estirpe de referencia. En esta Tesis se ha realizado un análisis morfométrico de la variación con respecto al tiempo de la forma y el tamaño de las hojas del ecotipo Enkheim-2 (En-2). Se eligió esta estirpe silvestre ya que representa el acervo genético de la gran mayoría de las líneas mutantes de la colección del AIS que pretendíamos estudiar. En el periodo comprendido entre los 10 y los 32 días posteriores a la siembra, se obtuvieron datos de la superficie, el perímetro, la longitud y la anchura de las diez hojas que suele presentar como máximo la roseta basal de En-2. La relación longitud/anchura se empleó como estimador de la forma del órgano, correspondiendo los valores cercanos o superiores a uno a hojas redondeadas o alargadas, respectivamente. No se tomaron muestras

anteriores al décimo día desde la siembra dado el minúsculo tamaño de las hojas en este intervalo.

Los resultados de nuestro análisis morfométrico aportan información sobre la variación con respecto al tiempo de la morfología de cada una de las diez primeras hojas de En-2, así como acerca de las diferencias entre ellas. Se constata que, una vez alcanzados su forma y tamaño finales, las hojas juveniles son más pequeñas y redondeadas que las adultas. Los resultados obtenidos permiten proponer la existencia de tres tipos de hojas en la roseta basal de En-2 (véase la Tabla 62): las hojas juveniles (la primera y la segunda), las de transición (la tercera y la cuarta), y las adultas (de la quinta en adelante).

Tabla 62.- Características diferenciales de las hojas vegetativas del ecotipo En-2

	Hojas juveniles	Hojas de transición	Hojas adultas
Superficie	20-25 mm^2	30 mm^2	>40 mm^2
Perímetro	<17 mm	18-20 mm	>24 mm
Longitud	5 mm	6-7 mm	>8 mm
Anchura	5-5,5 mm	6 mm	6,5-7 mm
Longitud/anchura	0,95	1-1,05	>1,15

Nuestro análisis cuantitativo en En-2 es coincidente con las observaciones cualitativas de Röbbelen (1957), Medford *et al.* (1992) y Martínez-Zapater *et al.* (1995), quienes estudiaron los ecotipos Antwerpen, Wassilewskija (Ws-2) y Landsberg *erecta* (L*er*), respectivamente. Más concretamente, Martínez-Zapater *et al.* consideran que la transición o cambio de fase entre hojas juveniles y adultas se produce tras la aparición de la cuarta hoja de la roseta. Las Figuras 20 a 23 (páginas 92 y 93) muestran además que en todas las hojas estudiadas la expansión del limbo sucede al principio rápidamente, a un ritmo que disminuye después de modo progresivo. Esta última observación confirma estudios anteriores en *Arabidopsis thaliana*, realizados en la primera hoja (Pyke *et al.,* 1991) y los cotiledones (Tsukaya *et al.,* 1994), de los ecotipos L*er* y Col, respectivamente.

V.3.- Caracterización de la variabilidad natural de la morfología de la hoja en la colección de ecotipos del AIS

Los primeros especímenes de la colección de ecotipos del AIS, la más amplia de las disponibles en 1993, año en el que se inició esta Tesis, fueron recolectados en la década de los 30 por F. Laibach, añadiendo estirpes posteriormente otros

investigadores como G. Röbbelen, D. Ratcliffe y C. Gómez-Campo (Kranz, 1978). Su primera descripción exhaustiva se hizo en 1964, en base a la observación directa de los ecotipos y a las notas de Laibach (Röbbelen, 1965). La colección fue distribuida inicialmente por el NASC, aunque en la actualidad puede obtenerse también en otros bancos de semillas de *Arabidopis*, como el ABRC y el SENDAI. Constituye una excelente muestra de la variabilidad existente en la forma y el tamaño de la hoja vegetativa y en la estructura de la roseta basal en poblaciones naturales de *Arabidopsis thaliana*, ello a pesar de que la mayoría de las estirpes fueron aisladas en Europa, estando muy pobremente representado el resto del planeta en la colección. Es razonable asumir que una componente de dicha variabilidad se debe a las diferencias entre estirpes en cuanto al tiempo de floración, que conllevan disparidades en el número de hojas de la roseta y, por lo tanto, en el aspecto de ésta. En efecto, dado que las hojas de la roseta siguen generándose a lo largo de toda la fase vegetativa del ciclo de vida de *Arabidopsis thaliana*, las estirpes de floración temprana presentan menos de diez, mientras que las de floración tardía pueden rebasar las cien (Estelle y Somerville, 1986). Las diferencias morfológicas entre las primeras y las últimas hojas de la roseta son más acusadas en las estirpes de floración tardía que en las de floración temprana. Otra componente de la variabilidad puede corresponder a la existencia de desigualdades en los niveles de actividad de los genes implicados en el control de la forma y el tamaño de la hoja. Se ha asumido tradicionalmente que estos caracteres son cuantitativos, presumiblemente controlados por varios genes que actúan cooperativamente, contribuyendo a un fenotipo a su vez dependiente del ambiente (Clarke *et al*., 1995).

A lo largo de 1993 sólo estaba disponible la mitad de los ecotipos de la colección del AIS, un total de 193, lo que nos permitió el análisis de la variabilidad existente en la morfología de la hoja en las 188 estirpes que pudieron cultivarse sin dificultades en nuestras condiciones de trabajo (véase el apartado IV.2.1, en la página 82). Con el fin de reducir al mínimo la varianza ambiental de su fenotipo, los ecotipos a estudio se incubaron en condiciones estrictamente controladas de iluminación, temperatura y humedad, así como en cuanto a composición del sustrato. La variabilidad observada en nuestras condiciones de cultivo ha de corresponder, en consecuencia, a las diferencias entre los genotipos de cada ecotipo. Se definieron catorce clases fenotípicas, en función de rasgos morfológicos fácilmente observables como la estructura del margen de la hoja (liso, aserrado, ondulado o recurvado), la forma del limbo (alargado o redondeado) y la

densidad de la roseta (compacta o suelta). La elección de dichos caracteres permitió una asignación inequívoca de los ecotipos a clases fenotípicas, tras la mera observación a simple vista y sin que fuese necesario procedimiento morfométrico alguno.

Se han realizado estudios comparativos del tiempo de floración y el número de hojas en la roseta, en condiciones controladas, en algunos ecotipos de *Arabidopsis thaliana* (Napp-Zinn, 1964; Dobrovolna, 1967). Estos autores encontraron una variabilidad considerable, tanto entre diferentes ecotipos de *Arabidopsis thaliana* como entre distintos individuos de un mismo ecotipo. A conclusiones similares llegaron Karbe y Röbbelen (1968), al respecto del diámetro final de la roseta y el número, la forma, la configuración marginal y el color de las hojas. Todo esto indica claramente la existencia, en algunas poblaciones naturales de *Arabidopsis thaliana*, de heterocigosis para los genes responsables de los caracteres mencionados (Dobrovolna, 1967), lo que contrasta con el elevado grado de autogamia que se ha demostrado en otros estudios (Röbbelen, 1971). Por nuestra parte, hemos encontrado muy poca variabilidad intraecotípica, en una muestra de estirpes mucho más amplia que las analizadas anteriormente.

Tal como se describió en la Introducción, la estructura de la roseta basal de *Arabidopsis thaliana* cambia a lo largo del desarrollo vegetativo, ya que aparecen progresivamente nuevas hojas, cada una de las cuales se expande paulatinamente hasta alcanzar su tamaño final. Esta variación con el tiempo de la forma y el tamaño de las hojas y de la estructura de la roseta de la que forman parte no ocurre al mismo ritmo en diferentes ecotipos. A pesar de estas diferencias en el ritmo de desarrollo de los ecotipos a estudio, se hizo necesario elegir el momento en el que proceder a documentar su fenotipo mediante la realización de fotografías. Se consideró que 30 días después de la siembra era un periodo adecuado, ya que a esta edad los ecotipos de floración más temprana comienzan a manifestar la elongación de los entrenudos, por lo que no pueden ser mantenidos durante mucho más tiempo en caja de Petri, cuya tapa se convierte en un obstáculo para el crecimiento del tallo. Tales ecotipos de floración temprana muestran a dicha edad una roseta madura que no experimenta otros cambios morfológicos posteriores que los relacionados con el envejecimiento de las hojas. Por el contrario, en los ecotipos de floración tardía, a los 30 días tras la siembra sólo se ha completado una parte del desarrollo vegetativo, no habiéndose alcanzado ni el número final de hojas en la roseta ni el diámetro máximo o el aspecto final de ésta.

Con el fin de intentar una aproximación cuantitativa al estudio de la manifiesta diacronía en el ritmo de desarrollo de los ecotipos, hemos efectuado el recuento de hojas y primordios foliares visibles a intervalos regulares de tres días, desde la germinación hasta el día decimoctavo desde la siembra (véase la Tabla 12, en la página 84). Se observó una pauta de desarrollo predominante, representada por 165 ecotipos, que no siguieron dos grupos de estirpes, de 19 y 4 miembros, que mostraron un desarrollo más lento y más rápido, respectivamente, que el de la mayoría. El origen geográfico de los ecotipos que no manifestaron el comportamiento de la mayoría resultó muy diverso, por lo que se intentó establecer, sin éxito, la eventual existencia de alguna relación entre las características de su hábitat de origen y su ritmo de desarrollo vegetativo. Hemos concluido que la considerable variabilidad constatada en la forma y el tamaño de las hojas de la roseta basal, así como en la estructura de ésta, no se relaciona de forma obvia con las diferencias en el ritmo del desarrollo vegetativo.

Los ecotipos a estudio fueron clasificados en 14 clases fenotípicas, y se procedió a intentar establecer si alguno de los rasgos morfológicos observados en las hojas vegetativas obedecía a controles monogénicos, susceptibles de ser analizados mediante procedimientos genéticos convencionales. Para ello, se seleccionaron aquellas estirpes que exhibían variantes extremas de algunos caracteres, llevando a cabo 88 cruzamientos entre parejas de ecotipos que manifestaban un determinado rasgo en dos formas extremas y opuestas: margen aserrado y liso, limbo redondeado y lanceolado, y peciolo corto y largo (véase el apartado IV.2.3, en la página 85). Muchos de estos cruzamientos resultaron infructuosos y en la mayoría de los restantes se obtuvo una generación F_1 homogénea, cuyos miembros manifestaban en algunos casos un fenotipo intermedio entre los de sus dos parentales y en otros el de uno de los dos. Sin embargo, los miembros de la F_2 resultante de la autofecundación de las plantas F_1 constituían un continuo de fenotipos, siendo prácticamente imposible la distinción de clases fenotípicas. Esto nos llevó a descartar la posibilidad de que las diferencias observadas entre los dos ecotipos parentales de cada cruzamiento se debieran a la homocigosis para dos alelos distintos de un mismo gen, lo que hubiera dado lugar en la F_2 a segregaciones fenotípicas 3:1 o 1:2:1, según que la relación entre alelos hubiese sido de dominancia/recesividad o de codominancia, respectivamente. Del mismo modo, se rechazó la hipótesis de que los rasgos de cada pareja parental estuviesen controlados por dos *loci*, lo que hubiera conducido a la aparición en la F_2 de un máximo de seis (en caso de codominancia) o cuatro (en un supuesto de dominancia/recesividad) clases

fenotípicas, en ausencia de interacciones entre los dos genes en cuestión, o menos, en los eventuales casos de epistasia. Se concluyó que la variabilidad natural observada era probablemente de origen poligénico y no se continuó con esta línea de trabajo.

V.4.- Análisis genético de las estirpes de la colección AIS Form Mutants

Se han obtenido numerosas colecciones de mutantes que manifiestan alteraciones morfológicas (Cetl *et al.,* 1969; Relichova, 1976), la más amplia de las cuales, en el momento en que se inició esta Tesis, era la de los AIS Form Mutants (véase la Tabla 8, en la página 67 y siguientes). Este numeroso grupo de mutantes ha recibido incomprensiblemente muy poca atención, hasta el punto de que se dispone de una información muy sucinta sobre su fenotipo y en algunos casos incluso se ignora el mutágeno que se empleó para obtenerlos. De las 13 clases fenotípicas que hemos definido para facilitar el análisis genético de los mutantes de esta colección, las que cuentan con mayor número de estirpes son las denominadas Incurvata, Denticulata y Compact rosette, caracterizadas fundamentalmente por presentar hojas con el limbo involuto, el margen dentado y la roseta compacta, respectivamente. Dada la escasez de datos acerca de los orígenes de las estirpes de esta colección, no puede establecerse si estas tres clases fenotípicas son tan numerosas como resultado de búsquedas en las que se persiguió el aislamiento de mutantes con los fenotipos mencionados. Otras razones verosímiles son las de que se trata de malformaciones muy conspicuas, cuya visibilidad facilita su aislamiento preferente, o bien que sean muchos los procesos cuya perturbación determina la aparición de tales fenotipos.

El análisis del modo de herencia de los fenotipos mutantes de la colección del AIS nos ha permitido establecer que la gran mayoría, un total de 72 estirpes, manifiesta caracteres monogénicos y recesivos, cuya segregación en la generación F_2 se ajustó aceptablemente a una proporción 3:1 (silvestre:mutante). Sólo se encontró un caso de dominancia completa (la estirpe N379, cuyo genotipo, tras la asignación de denominaciones de alelo, es *icu5/icu5*) y dos de semidominancia (las estirpes N400 y N401, *icu4-1/icu4-1* e *icu4-2/icu4-2*, respectivamente). Por último, sólo en una de las líneas, N325, el fenotipo mutante parece deberse a la acción conjunta de mutaciones recesivas en dos genes independientes. En 34 de las líneas estudiadas no se logró establecer el modo de herencia de su fenotipo, en 19 de ellas porque no fue posible, tras varios intentos, la obtención de plantas F_1 viables y fértiles, y en las 15 restantes por la aparición en la F_2 de fenotipos mutantes adicionales al manifestado por el individuo de la generación parental.

V.4.1.- Consideraciones acerca de la función de los genes identificados mediante el análisis genético de los mutantes estudiados en esta Tesis

V.4.1.1.- Los mutantes *incurvata*

El grupo de mutantes que más atención ha recibido en esta Tesis es el de los denominados *incurvata*, caracterizados por la involución de sus hojas vegetativas, con margen recurvado hacia el haz (véase el apartado IV.5.1, en la página 97). Nuestro interés por este grupo de mutantes reside en su fenotipo de hojas recurvadas, lo que les diferencia de muchos de los ecotipos de *Arabidopsis thaliana*, incluido En-2, en los que la hoja es una estructura fundamentalmente plana, al igual que ocurre en numerosas especies vegetales. La forma final de la hoja de *Arabidopsis thaliana*, que consta de tan sólo unas capas de células, es el resultado de la división y la expansión de las células dorsales y ventrales (Pyke *et al*., 1991; Tsuge *et al*., 1996), que generan superficies equivalentes en el haz y el envés, merced a algún mecanismo de coordinación cuya naturaleza se desconoce. La perturbación de este mecanismo debiera conducir a diferencias entre los patrones de división y/o expansión de las células dorsales y ventrales, lo que determinaría que sus superficies dejasen de ser similares, causando alteraciones en la morfología de la hoja, consistentes en su recurvamiento hacia el haz, tal como ocurre en los mutantes *incurvata*.

Esta clase fenotípica se subdividió en dos grupos de mutantes, uno de ellos integrado por 11 estirpes de floración temprana, 10 de las cuales presentaban otros rasgos comunes, como un tallo inflorescente de poco grosor, reducido número de hojas vegetativas, hojas caulinares recurvadas, escasa fertilidad y transformaciones homeóticas consistentes en la sustitución de los sépalos por carpelos, así como atrofia de los pétalos, que ocasionalmente se transforman en estambres. El análisis de complementación de estos mutantes de floración temprana reveló que ocho de los diez que mostraban rasgos comunes formaba parte de una serie alélica, de un gen al que se denominó *INCURVATA1* (*ICU1*). Se identificaron en esta clase otros dos genes, *ICU2* e *ICU3*, cada uno de ellos representado con un solo alelo mutante.

La estirpe *icu3/icu3* es manifiestamente distinta de las restantes de su clase ya que, a diferencia de ellas, no muestra transformaciones homeóticas en sus flores. Los análisis de interacciones que hemos realizado indican además la mera aditividad de los fenotipos en los dobles mutantes *icu1 icu3* e *icu2 icu3*, así como una clara sinergia en el

caso de *icu1 icu2*. Uno de los individuos de este último genotipo mostró tejido carpeloide en sus hojas vegetativas. De lo anterior cabe deducir la existencia de interacciones entre los genes *ICU1* e *ICU2* y su independencia con respecto a *ICU3*. Puede proponerse, en consecuencia, la existencia de dos operaciones genéticas distintas, requeridas para alcanzar la estructura fundamentalmente plana que caracteriza a las hojas de *Arabidopsis thaliana*, en una de las cuales participan los genes *ICU1* e *ICU2* y en la otra *ICU3*.

Las alteraciones que se observan en las flores de los mutantes *icu1* e *icu2* son semejantes a las asociadas a las mutaciones *apetala2*, que causan la transformación homeótica del primer y el segundo verticilo floral en el cuarto y el tercero, respectivamente (Bowman *et al*., 1989). Por otra parte, la expresión constitutiva del gen *AGAMOUS* en toda la planta causa un fenotipo Apetala2 en la flor, así como la involución de las hojas vegetativas y la aparición de papilas estigmáticas en los ápices de las hojas caulinares (Mizukami y Ma, 1992). Fenómenos similares se han observado en otras plantas, como el tabaco, cuyas brácteas manifiestan características carpeloides como consecuencia de la expresión constitutiva del ortólogo de *AG* en esta especie, *NAG1* (Mandel *et al*., 1992a). La curvatura de las hojas, así como la de los sépalos, caracteriza también al mutante *blind* de la petunia (*Petunia hybrida*), cuyas alteraciones florales son muy semejantes a las observadas en las estirpes *apetala2* de *Arabidopsis thaliana*. Un fenotipo similar aparece tras la expresión constitutiva del homólogo de *AG* en la petunia, *pMADS3* (Tsuchimoto *et al*., 1993). En varios de estos casos, así como en el de la expresión constitutiva del homólogo de *AG* en el arroz (*Oryza sativa*), el gen *OsMADS3* (Kang *et al*., 1995), se observa también esterilidad masculina, al igual que ocurre parcialmente en los mutantes *icu1* e *icu2*, dada la dificultad que manifiestan las anteras para alcanzar la dehiscencia y liberar el polen.

La expresión constitutiva y simultánea de los genes *PISTILLATA* y *APETALA3* produce también un fenotipo semejante al de los mutantes *icu1* e *icu2* (Krizek y Meyerowitz, 1996), con hojas de la roseta y caulinares pequeñas e involutas, floración temprana, e incluso la transformación parcial de las últimas hojas caulinares en pétalos. La expresión constitutiva de cualquiera de estos dos genes por separado no causa el fenotipo descrito (Jack *et al*., 1994; Krizek y Meyerowitz, 1996). Las mutaciones en *LEUNIG* (*LUG*), otro de los genes que controla la expresión de *AGAMOUS* en la flor, no sólo causan malformaciones en las flores, sino también el estrechamiento de las hojas y los sépalos, rasgo que no se corrige en el doble mutante *lug ag*, lo que sugiere que *LUG*

puede jugar un papel independiente de *AG* en el control de la forma de estos dos últimos órganos (Liu y Meyerowitz, 1995).

Algunas de las observaciones comentadas en los párrafos anteriores nos llevaron a considerar verosímil la hipótesis de que los genes *ICU1* e *ICU2* controlasen negativamente a *AG* en la hoja y en algunos órganos de la flor, siendo los rasgos fenotípicos foliares y florales consecuencia de la desrepresión ectópica de este último gen en las estirpes mutantes. Es por ello que, a principios de 1994, decidimos contrastar la predicción de que los dobles mutantes *icu1 ag* e *icu2 ag* debían presentar hojas de tipo silvestre. Esta predicción ha sido confirmada más allá de toda duda, con estudios realizados en individuos de la progenie F_2, F_3 y F_4 de cruzamientos *AG/ag-1* x *icu1-3/icu1-3* (N345), *AG/ag-1* x *icu1-5/icu1-5* (N347) y *AG/ag-1* x *icu2/icu2* (N329). En todos los casos, los dobles mutantes *ag*/*ag*;*icu/icu* mostraron hojas silvestres y flores Agamous, ambos rasgos presumiblemente debidos a la ausencia de la proteína AG. La morfología foliar resultó casi completamente silvestre en los individuos *ag/ag*;*icu/icu*, que se distinguían de los *ag*/*ag*;*ICU/-* por la presencia de algunas indentaciones poco acusadas en el margen de las hojas vegetativas y por su floración temprana (aunque no tanto como la de las plantas *AG/-;icu/icu*). Estas dos diferencias son atribuibles tanto a presuntos efectos de las mutaciones *icu1* o *icu2* no relacionados con la desrepresión de *AG* como al hipotético carácter hipomorfo del alelo *ag-1*, que podría ser activo a muy bajo nivel, rindiendo niveles residuales de la proteína AG.

Investigaciones realizadas en otros laboratorios han conducido a la obtención de mutantes con fenotipos foliares y florales semejantes a los de *icu1/icu1* e *icu2/icu2*, especialmente a los primeros. Uno de ellos fue obtenido mediante el sistema Ac/Ds en el laboratorio de G. Coupland (*curly leaf*; *clf*), mientras que otros dos, derivados de una mutagénesis química, fueron aislados en el laboratorio de J. M. Martínez Zapater (*photoperiod insensitive flowering*; *pif-1* y *pif-2*). Estas tres mutaciones son alélicas y corresponden a un gen ubicado en el cromosoma 2 (J. M. Martínez Zapater, comunicación personal). Su fenotipo y su posición en el mapa genético de *Arabidopsis thaliana* nos llevaron a realizar ensayos de alelismo con las mutaciones *icu1*, cuyo ligamiento con *ERECTA*, en el cromosoma 2, habíamos comprobado previamente. De dicho análisis de complementatción se concluyó que las mutaciones *icu1* son alelos del gen *CLF*.

El análisis molecular de *CLF* (Goodrich *et al*., 1997) ha permitido establecer que regula negativamente a *AG* y que contiene un dominio de homología con algunos de los

genes de los grupos Polycomb y trithorax de *Drosophila melanogaster*, fundamentalmente con *Enhancer of zeste* (Jones y Gelbart, 1993). Los genes del grupo Polycomb se requieren para garantizar que determinados genes homeóticos que han sido inactivados en una célula, en un momento temprano del desarrollo, sigan estándolo en el linaje de aquélla, en el tejido u órgano a cuya construcción contribuyen (Muller, 1995). Los genes de los grupos Polycomb y trithorax no intervienen pues en la iniciación de procesos de desarrollo, sino en su mantenimiento, haciendo irreversibles las decisiones de elección de destinos durante el desarrollo (Kennison, 1995).

La probable implicación de *CLF* (*ICU1*) e *ICU2* en la misma operación genética hace plausible la hipótesis de que estos dos y tal vez algún otro locus *INCURVATA* sean "genes de salvaguardia de la identidad foliar" (Berná Amorós, 1997; Berná, Robles y Micol, pendiente de aceptación; Candela, Robles, Serrano-Cartagena y Micol, pendiente de aceptación), cuya función sería la de reprimir en la hoja a los genes florales. Tales genes habrían aparecido para salvaguardar la identidad foliar, distinguiendo a éste órgano de los florales, que le han sucedido en la evolución de las plantas. El fenotipo Incurvata puede explicarse pues como resultado de la expresión ectópica en la hoja de algún gen de identidad floral que participa en el control de los patrones de división celular, que deben contribuir a conformar en la flor órganos parcial o totalmente cóncavos, como los sépalos y pétalos, o fundamentalmente cilíndricos, como los estambres y carpelos. En la hoja, sin embargo, debe obtenerse una estructura plana. La curvatura de la hoja en los mutantes *incurvata* sería una consecuencia de la imposición a este órgano de los patrones de división típicos de los tejidos florales.

Los grupos Polycomb y trithorax incluyen varios genes en *Drosophila melanogaster* (Kennison, 1995), cuyos productos constituyen multímeros con capacidad de unión a ADN. La situación no parece ser muy distinta en *Arabidopsis thaliana*, ya que se ha encontrado un gen similar a *CLF* (*ICU1*) entre las secuencias recientemente obtenidas en el proyecto de secuenciación del genoma de esta planta, al que se ha denominado *CLF-like*, cuya función se ignora (BAC ATAF1038, con el número de acceso AF001308 en el banco de datos del EMBL; http://www.ebi.ac.uk). Por otra parte, se ha publicado recientemente el análisis genético y molecular de *MEDEA*, otro homólogo de *CLF* cuyas mutaciones ejercen un efecto materno sobre el desarrollo embrionario de *Arabidopsis thaliana*, causando un crecimiento excesivo de muchos embriones y su muerte durante la desecación de la semilla (Grossniklaus *et al*., 1998). No es descabellado preguntarse, en consecuencia, si el gen que hemos denominado

ICU2 está relacionado estructural o funcionalmente con los miembros del grupo Polycomb en *Arabidopsis thaliana*. Este interesante gen, en consecuencia, se convierte en un candidato obvio a recibir una atención inmediata por la vía de intentar su clonación posicional.

La utilización de la estirpe Landsberg *erecta* (L*er*) en algunos cruzamientos con mutantes *icu1* e *icu2* nos ha permitido establecer la existencia de un factor modificador de dos de los rasgos característicos de los fenotipos Incurvata1 e Incurvata2, la curvatura de la hoja y la floración temprana. Ambos caracteres se normalizan parcialmente en presencia del alelo de un gen ligado a *ERECTA* que está presente en el genotipo de L*er* y ausente en el de En-2 .

Es relativamente poco lo que puede afirmarse en relación a los restantes genes *ICU* identificados en este trabajo, la mayoría de los cuales presentan en la colección del AIS mutaciones recesivas, presuntamente hipomorfas o nulas, cuyo fenotipo se debe a la ausencia o la disfunción de controles morfogenéticos o elementos estructurales necesarios para la forma final de la hoja. Constituyen excepciones *ICU4* e *ICU5*, cuyas mutaciones son singulares con respecto a todas las demás que hemos analizado, ya que no son recesivas. El carácter semidominante de *icu4-1* e *icu4-2* y la dominancia completa de *icu5* podrían corresponder a alelos neomorfos, antimorfos, de desrepresión ectópica, hipermorfos o afectar a un gen haploinsuficiente. En los tres primeros de estos supuestos la función afectada podría no tener un papel en la construcción de la hoja normal.

Se han descrito fenotipos mutantes similares a los de nuestra clase Incurvata, observados en plantas de *Arabidopsis* transformadas con una construcción antisentido del gen *METI*, cuyo producto es una metiltransferasa (Finnegan *et al*., 1996). La hipometilación que sufre el genoma de estas plantas tiene, entre otras consecuencias, la de la expresión ectópica de los genes *AGAMOUS* y *APETALA3* en la hoja. Es por tanto asumible la idea de que algún mutante *incurvata* pueda estar dañado en un gen relacionado con la metilación del ADN.

Por último, mencionar que tampoco puede descartarse la posibilidad de que algún mutante *icu* corresponda a genes relacionados con la fotomorfogénesis o con la síntesis, la percepción o la transducción de las señales de fitohormonas. En efecto, la búsqueda de supresores del fenotipo de elongación del hipocotilo causado por las mutaciones en el gen *PHYTOCHROME B* (*PHYB*), cuyo producto es el fitocromo B (véase el apartado I.6.7, en la página 52), ha permitido identificar varios genes (Reed *et*

al., 1998). Las mutaciones en uno de ellos, *SHORT HYPOCOTYL2* (*SHY2*), causan un fenotipo Incurvata en las hojas de la roseta. Otro tanto ocurre con las hojas vegetativas de los mutantes *auxin resistant 3* (*axr3*), que han sido aislados en búsquedas de mutantes resistentes a la auxina, es decir, cuyas raíces crecen en presencia de concentraciones de esta hormona que son inhibidoras del crecimiento en el tipo silvestre (Hobbie, 1998). Estos dos genes, *SHY2* y *AXR3*, están ubicados en el cromosoma 1, a poca distancia el uno del otro, en una posición muy cercana a la que recientemente se ha establecido que ocupa *ICU5* (Candela, Robles, Serrano-Cartagena y Micol, pendiente de aceptación). El carácter fotomorfogénico del mutante *icu5* (véase la Tabla 55 en la página 146), junto con su posición en el mapa genético de *Arabidopsis*, le convierten en un firme candidato a ser un alelo del gen *SHY2*.

V.4.1.2.- Los mutantes *denticulata*

En la clase fenotípica a la que se asignó un mayor número de líneas mutantes, un total de 29, se incluyeron todas aquellas líneas que presentaban indentaciones en el margen de las hojas vegetativas. Este grupo es bastante heterogéneo en cuanto a otras características de la hoja o el resto de la planta, lo que sugiere que son varios los procesos cuya alteración tiene, entre otras consecuencias, la de modificar la configuración marginal de las hojas, haciendo aparecer incisiones o prominencias, que pueden tener su origen tanto en una muerte celular localizada como en desajustes en el patrón silvestre de división celular.

El fenotipo de 13 de las estirpes *denticulata* estudiadas se caracteriza por la presencia de hojas manifiestamente aserradas y alargadas. Esto puede interpretarse en el sentido de que tales mutantes manifiestan constitutivamente y de forma muy acusada en todas sus hojas rasgos que en la estirpe silvestre de la que proceden sólo aparecen en las últimas hojas adultas. En efecto, el número de indentaciones en el margen de las hojas vegetativas de *Arabidopsis thaliana* se incrementa progresivamente en plastocronos sucesivos, resultando las hojas adultas de la roseta más aserradas y más grandes que las juveniles, una observación realizada en varios ecotipos (Röbbelen, 1957; Martínez-Zapater *et al*., 1994; este trabajo). La expansión de la hoja a lo largo de su eje longitudinal y el incremento en el número de indentaciones se presentan así asociados no sólo en estirpes silvestres sino también en los mencionados mutantes *denticulata*, lo que sugiere un control común para ambos procesos.

A pesar del elevado número de líneas con margen aserrado o dentado que hemos sometido a análisis de complementación, un total de 15, sólo hemos encontrado dos que fuesen portadoras de mutaciones alélicas, N451 y N452 (*den27-1*/*den27-1* y *den27-2*/*den27-2*). Este hecho indica de nuevo que es probablemente elevado el número de los genes cuya alteración genera un fenotipo de incremento de las indentaciones en el margen de las hojas vegetativas. Resultados similares se obtuvieron en una Tesis anterior, en la que se sometieron a análisis genético 19 mutantes *denticulata*, derivados de una mutagénesis mediante EMS realizada en el ecotipo L*er*, que correspondieron a 17 genes distintos, sólo dos de los cuales contaron con dos alelos (Berná Amorós, 1997; Berná, Robles y Micol, pendiente de aceptación).

Hemos establecido que dos de las estirpes analizadas contienen nuevos alelos de genes previamente descritos. Una de ellas, N371, no sólo presenta margen aserrado sino también floración tardía y tallo fasciado, rasgo este último que nos indujo a ensayar su eventual alelismo con *fas1*, comprobando que era portadora de un alelo del gen *FASCIATED1* (Leyser y Furner, 1992). La segunda de estas estirpes, N447, resultó ser portadora de un alelo de *yellow inflorescence* (*yi*), una mutación de uso común en el análisis del ligamiento a marcadores fenotípicos clásicos, que determina un color amarillo de las yemas florales, así como la dentación del margen de las hojas vegetativas. Incluyendo a N447, son siete los mutantes de la clase fenotípica Denticulata que manifiestan alteraciones en la pigmentación, lo que sugiere que determinadas disfunciones metabólicas puedan tener como efecto añadido la alteración de la configuración marginal de la hoja.

Otro mutante de este grupo al que se dedicó una atención específica es CS3257, obtenido a partir del ecotipo Col-1 por Rédei, quien le denominó *serrate*. Es bien poco lo que se sabe acerca del gen *SERRATE*, salvo su proximidad a *ERECTA* (Rédei y Hirono, 1964). El estudio de unos 1.700 individuos de la F_2 de un cruzamiento *se*/*se* x *as1*/*as1* nos ha permitido establecer que la distancia entre *SE* y *AS1* es de 12 cM. Otras características de la estirpe CS3257 son su floración temprana, un número de hojas vegetativas (5-6) inferior al de su tipo silvestre originario (8) y la presencia de tricomas abaxiales en todas las hojas, así como el hipocotilo y los peciolos más largos que los de Col-1. Estas características permiten suponer que es un mutante heterocrónico en el que la fase de roseta temprana no se presenta, iniciando su desarrollo en un estadio equivalente al de roseta madura del tipo silvestre, razón por la cual también se adelanta la transición vegetativa. Este efecto se hace también patente en los dobles mutantes

se as1 y *se as2* (véase el apartado IV.6, en la página 150*)*, en los que las hojas juveniles son lobuladas, carácter que sólo se observa en las hojas adultas de *as1* o *as2*. Por otra parte, hemos comprobado que el tratamiento con giberelina produce en el ecotipo Col-1 fenocopias parciales del mutante *serrate*. El fenotipo de *se*, por su parte, se hace más extremo en presencia de la hormona. La explicación más simple a estas dos observaciones es que la mutación *se* determina un incremento de la sensibilidad de la planta a la giberelina, lo que justificaría que los niveles endógenos de esta hormona causen en el mutante un fenotipo similar al que se obtiene tras su administración exógena al tipo silvestre. Alternativamente, la mutación *se* podría causar un incremento de los niveles endógenos de la hormona.

V.4.1.3.- Los mutantes *compact rosette*

Otro de los grupos fenotípicos con un número considerable de mutantes es el que hemos denominado Compact rosette, integrado por 45 estirpes con una roseta compacta, debida a la reducida longitud del peciolo de las hojas vegetativas. Se distinguieron dos clases, una de ellas compuesta por 22 mutantes que manifestaron además enanismo y floración tardía, presentando una inflorescencia arbustiva, compuesta por numerosos tallos erectos y no ramificados, así como una fertilidad reducida, asociada a un crecimiento insuficiente de los estambres. Este fenotipo es muy similar al de las que se denominaron, hace más de un siglo, "formas enanas" de *Arabidopsis thaliana* (Viviand-Morel, 1877-78, citado en Napp-Zinn y Bonzi, 1970), algunas de los cuales son sensibles al tratamiento con giberelinas, que supone una normalización parcial de su fenotipo (Koornneef, 1978).

El análisis genético de los mutantes *compact rosette* arbustivos reveló que todos ellos debían su fenotipo a mutaciones recesivas que fueron asignadas a 7 genes. Sus combinaciones dobles mutantes segregaron, en la progenie de cruzamientos dihíbridos, en proporciones que se ajustaron aceptablemente a la 9:7 (silvestre:mutante), la correspondiente a una epistasia de genes recesivos duplicados. A ello contribuyó la gran semejanza entre los fenotipos de los mutantes de cada uno de los siete grupos de complementación *CRO* y los de sus dobles mutantes, todos los cuales resultaron prácticamente indistinguibles. Esta situación es la típica de las mutaciones en genes cuyos productos son enzimas que catalizan etapas sucesivas de un ruta biosintética, generándose un fenotipo mutante común, que corresponde a la ausencia del producto

final de la ruta. Parece plausible, pues, que los siete genes *CRO* que hemos identificado estén implicados en la misma ruta metabólica.

Por otra parte, el fenotipo de las estirpes *cro* arbustivas es similar al descrito para los mutantes con una respuesta fotomorfogénica anormal, así como al que se asocia a las perturbaciones en la síntesis de las giberelinas y en la transducción de sus señales. La constatación de estos parecidos nos indujo a estudiar el comportamiento de los mutantes *cro* en la oscuridad y sus respuestas al tratamiento con giberelinas, a la vez que llevábamos a cabo ensayos de alelismo con estirpes portadoras de mutaciones en genes fotomorfogénicos o relacionados con la síntesis o la percepción de estas hormonas. Pudimos comprobar que todas las estirpes *cro* arbustivas manifestaban, en mayor o menor medida, alteraciones en su respuesta fotomorfogenética, y que no sufrían etiolación en la oscuridad (véase el apartado IV.5.11.1, en la página 146), así como que la giberelina exógena no modificaba su fenotipo mutante.

Debe mencionarse, por último, que hemos demostrado que los miembros del grupo de complementación *CRO1* son alelos del gen *DET2*, cuya clonación reciente (Li *et al*., 1996) ha permitido establecer que codifica para una reductasa de esteroides implicada en la ruta de síntesis de brasinosteroides. Este resultado convierte a los restantes genes *CRO* en candidatos a estar implicados en la síntesis de estas fitohormonas esteroides. En consecuencia, constituye una continuación obvia del trabajo iniciado en esta Tesis tanto el estudio de las respuestas de los mutantes *cro* a la presencia de brasinosteroides en el medio, como la realización de ensayos de alelismo con mutantes previamente descritos por su fenotipo de enanismo y sus deficiencias en la síntesis o la percepción de los brasinosteroides, como *bri1*, *cbb*, *dim* y *dwf* (Feldmann *et al*., 1989; Takahashi *et al*., 1995; Clouse *et al*., 1996; Li *et al*., 1996; Szekeres *et al*., 1996).

La segunda de las clases fenotípicas Compact rosette, cuyos miembros no mostraban una inflorescencia arbustiva, constituyó un grupo mucho más heterogéneo acerca del cual es bien poco lo que puede afirmarse en el momento actual. La determinación de las posiciones de mapa genético de los seis genes de este grupo permitirá establecer su eventual proximidad a *loci* previamente estudiados, los cuales se convertirían en candidatos a participar en ensayos de alelismo con los mutantes *cro*.

V.4.1.4.- Otros mutantes

En relación a las restantes clases que hemos establecido entre las estirpes mutantes de la colección del AIS, una de ellas contó con un solo representante, que no

pudo ser analizado al resultar infructuosos todos los cruzamientos llevados a cabo (Tortifolia; véase el apartado IV.5.4, en la página 124), y otras dos incluyeron una única línea que pudo ser cruzada con éxito, demostrándose el carácter monogénico y recesivo de su fenotipo (Transcurvata y Exigua; véanse los apartados IV.5.2 y IV.5.8, en las páginas 121 y 132, respectivamente). En estos dos últimos casos parece procedente llevar a cabo en el futuro ensayos de alelismo con sus homónimos obtenidos previamente en el laboratorio de J. L. Micol. El pequeño tamaño de los mutantes *exi* les hace candidatos a estar afectados en algún aspecto del control de la división y/o la expansión celular, las dos variables fundamentales que inciden en el tamaño final de una planta. La desviación de la estructura plana que se observa en las hojas de los mutantes *transcurvata* permite aplicarles razonamientos similares a los antes enunciados para la clase fenotípica Incurvata (véase el apartado V.5.1, en la página 161), al respecto de su eventual relación con la alteración de un mecanismo de coordinación de la división y/o la expansión de las células dorsales y ventrales de la hoja.

La clase fenotípica Ultracurvata representa un caso extremo de desviación de la estructura habitualmente plana de la hoja de *Arabidopsis thaliana* (véase el apartado IV.5.3, en la página 123). Hemos establecido que el único mutante asignado a esta clase, *invalida* (*inl*), no es un alelo del gen *UCU1* (Berná Amorós, 1997). La gran semejanza entre los fenotipos mutantes de estos dos genes sugiere su implicación en un mismo proceso. Sin embargo, no parece trivial el que los individuos *ucu1-1*/*ucu1-1*, *ucu1-1*/*ucu1-2*, *ucu1-2*/*ucu1-2* e *inl*/*inl* sean prácticamente indistinguibles y netamente distintos de los *ucu1-3*/*ucu1-3*, ya que *ucu1-1* y *ucu1-2* son semidominantes, mientras que *ucu1-3* e *inl* son recesivos (Pérez Pérez, Tesis doctoral en realización).

La clase de los mutantes con hoja acorazonada o *asymmetric leaves* constituye un grupo característico (véase el apartado IV.5.5, en la página 124). De hecho, las mutaciones en los genes *AS1* y *AS2* se han utilizado tradicionalmente como marcadores, no habiéndose establecido el eventual alelismo entre las diversas estirpes con un fenotipo Asymmetric leaves muy inequívoco integradas en las colecciones del NASC y el ABRC. En esta tesis se ha completado su análisis de complementación y se ha establecido el carácter epistático de *AS2* sobre *AS1*, lo que sugiere la implicación de ambos en un mismo proceso. También se ha establecido la aditividad de los fenotipos As1 y As2 con los de las mutaciones *serrate* y *angustifolia* (véase el apartado IV.6, en la

página 150), una observación indicativa de la independencia de los procesos en los que participan los genes *AS*, *SE* y *AN*.

Hemos asignado a la clase Angusta (véase el apartado IV.5.7, en la página 129) varios mutantes con hojas alargadas, cuya relación longitud/anchura es mayor que en su ecotipo de procedencia. Corresponden a tres genes, distintos entre sí y del marcador genético clásico *ANGUSTIFOLIA* (*AN*; Rédei, 1962) cuya naturaleza molecular aún no se ha determinado. Tal como se ha propuesto para la mutación *an-1* (Tsuge *et al*., 1996; véase la página 42), nuestros mutantes *ang* podrían presentar alteraciones en el control polar de la expansión transversal (lateral) de las células foliares, lo que originaría hojas estrechas.

Hemos asignado dos estirpes a la clase Filiforme, caracterizados por presentar algunas hojas filiformes, de sección casi circular. Una de estas líneas fue aislada por Rédei, quien la denominó Flavodentata, ya que la mayor parte de sus hojas vegetativas eran amarillentas y con el margen inciso. Algunas de ellas, especialmente las adultas, crecen sin expandirse lateralmente, adoptando una forma final cónica. Los dos genes a los que representan estos dos mutantes pueden estar implicados en los procesos de expansión lateral que ocurren tras la iniciación del primordio foliar (McHale, 1993) o en la especificación de la dorsoventralidad, tal como se supone que sucede en los mutantes *phantastica* de *Antirrhinum majus*, muchas de cuyas hojas son filiformes (Waites y Hudson, 1995).

La única estirpe asignada a la clase Calyciforme presenta dos tipos de individuos, que muestran fusión de los cotiledones o de algunas hojas, respectivamente (véase el apartado IV.5.9, en la página 133). Se ha propuesto que la separación de los órganos adyacentes en *Arabidopsis thaliana* requiere la actividad de los genes *CUC1* y *CUC2* (*CUP-SHAPED COTYLEDON*), cuyas mutaciones determinan la fusión de los cotiledones, dando lugar a una estructura caliciforme (Aida *et al*., 1997). El tratamiento de plantas del tipo silvestre con inhibidores del transporte polar de la auxina tiene como resultado una deformidad similar (Liu *et al*., 1993). Por consiguiente, el gen que hemos denominado *CAY* es candidato a estar implicado en la separación de órganos controlada por *CUC1* y *CUC2* o a participar en el transporte polar de la auxina.

V.4.2.- Recapitulación

La aproximación más habitualmente empleada para realizar contribuciones al análisis causal de un proceso de desarrollo es la concentración de esfuerzos en la

caracterización estructural y funcional de un gen concreto. En esta Tesis, por el contrario, se ha optado por definir el espectro de los genes dañados en una amplia colección de mutantes preexistentes, cuya caracterización se había limitado hasta ahora a una muy somera descripción de algunos de sus rasgos fenotípicos. La clasificación en clases fenotípicas discretas y el establecimiento de grupos de complementación que se presentan en esta memoria permiten definir en términos de genes la identidad de dichas estirpes mutantes. También hemos llevado a cabo estudios de interacciones entre genes y otras aproximaciones a la definición de la naturaleza de algunas de las funciones perturbadas en los mutantes. La información obtenida permite una elección fundamentada de determinados mutantes para su análisis molecular, a nivel estructural y funcional. En lo referente al análisis de estirpes mutantes, esta Tesis aporta una panorámica de las alteraciones en la morfología de la hoja de *Arabidopsis thaliana* que pueden obtenerse mediante mutaciones, a la vez que sienta las bases de los estudios centrados en genes específicos que serán realizados más adelante.

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

VI.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

Esta Tesis constituye una parte de un intento de disección genética de la morfogénesis de la hoja. Con el objetivo de identificar el máximo número posible de los genes responsables del control del desarrollo de este órgano, se ha intentado la obtención y el análisis del máximo número posible de variantes con hojas anormales, tanto de origen natural como derivadas de experimentos de mutagénesis, en el sistema modelo *Arabidopsis thaliana*. Hemos seguido dos caminos paralelos, consistentes en el estudio de la variabilidad natural en la morfología de la hoja en estirpes silvestres y el análisis genético de mutantes preexistentes, obtenidos por autores anteriores.

Hemos realizado, en primer lugar, un análisis cuantitativo de la variación con respecto al tiempo de algunos de los parámetros que definen la forma y el tamaño de las diez primeras hojas vegetativas de Enkheim-2 (En-2), que se eligió como estirpe de referencia, ya que es el ecotipo originario de la gran mayoría de las líneas mutantes estudiadas en esta Tesis. Los resultados obtenidos permiten proponer la existencia de tres tipos de hojas en la roseta basal de la estirpe En-2: las juveniles (la primera y la segunda), las de transición (la tercera y la cuarta), y las adultas (de la quinta en adelante). El ritmo de crecimiento de todas ellas es más rápido en los estados tempranos de su expansión que en los postreros. Nuestros resultados cuantitativos en En-2 son coincidentes con las observaciones cualitativas de autores anteriores, realizadas en otros ecotipos.

Para analizar la variabilidad natural, hemos estudiado 188 ecotipos de *Arabidopsis thaliana*, estirpes silvestres aisladas por distintos investigadores en diferentes partes del planeta, integradas en una colección de dominio público, la del *Arabidopsis* Information Service, actualmente depositada en el NASC. Hemos constatado diferencias netas entre estos ecotipos en las proporciones y el tamaño del limbo de la hoja, en la estructura del margen de ésta, y en la organización de la roseta basal de la planta. La variabilidad intraecotípica encontrada ha sido mínima, lo que indica un reducido grado de polimorfismo para los *loci* implicados, en consonancia con la autogamia casi absoluta que caracteriza a *Arabidopsis thaliana*.

Los ecotipos a estudio fueron clasificados en 14 clases fenotípicas. Se seleccionaron aquéllos que exhibían variantes extremas de algunos caracteres de la arquitectura de la hoja, llevando a cabo 88 cruzamientos entre parejas que manifestaban un determinado rasgo en dos formas opuestas y extremas: margen aserrado y liso, limbo redondeado y lanceolado, y peciolo corto y largo. Sin embargo, los

individuos de la segunda generación filial de estos cruzamientos constituían un continuo de fenotipos, siendo prácticamente imposible la distinción de clases fenotípicas, por lo que se concluyó que la variabilidad natural observada era probablemente de origen poligénico y se interrumpió esta línea de trabajo.

Para el estudio de mutantes preexistentes, se obtuvieron del NASC y el ABRC 173 estirpes mutantes, aisladas por autores anteriores, 162 de las cuales forman parte de la colección denominada *Arabidopsis* Information Service Form Mutants, que ha recibido hasta ahora muy poca atención, hasta el punto de que se dispone de una muy sucinta información sobre su fenotipo y en algunos casos se ignora incluso el mutágeno que se empleó para obtenerlas. Procedimos a clasificar estos mutantes en base al fenotipo que manifestaban en nuestras condiciones de trabajo, concentrando nuestra atención en 116 líneas, que se agruparon en 13 clases fenotípicas. El modo de herencia de sus fenotipos se determinó en 78 casos, resultando todos ellos inequívocamente monogénicos, salvo uno, y recesivos, excepto tres (dos mutaciones semidominantes y una completamente dominante).

El análisis de complementación de 23 mutantes *incurvata*, cuyo rasgo fenotípico más característico es la curvatura del margen de las hojas vegetativas hacia el haz, nos ha permitido establecer que corresponden a 10 genes. Existe interacción entre dos de ellos, *ICU1* e *ICU2*, tal como se deduce de la sinergia de sus fenotipos mutantes. Hemos demostrado genéticamente que la actividad de *ICU1* e *ICU2* se requiere para controlar negativamente al gen floral *AGAMOUS* en la hoja. Hemos comprobado que las mutaciones *icu1* son alélicas del gen *CURLY LEAF*, cuya caracterización molecular por Goodrich *et al*. (1997) ha revelado que codifica para un factor de transcripción con homólogos en el reino animal, concretamente varios miembros del grupo Polycomb de *Drosophila melanogaster*. Estos resultados convierten a *ICU2* en candidato a formar parte de dicho grupo de genes en *Arabidopsis thaliana*.

En la clase Denticulata se incluyeron 29 mutantes que presentaban indentaciones en el margen de sus hojas vegetativas. El análisis de complementación de 15 de ellos reveló que correspondían a 14 genes. Este resultado y la heterogeneidad de la clase fenotípica en lo relativo a otras características morfológicas indican que son varios los procesos cuya perturbación causa modificaciones en la configuración marginal de las hojas, haciendo aparecer incisiones o prominencias, que pueden tener su origen tanto en una muerte celular localizada como en desajustes en el patrón silvestre de divisiones celulares. Al menos uno de ellos, *serrate*, parece un mutante heterocrónico en

el que la fase vegetativa temprana no se manifiesta, iniciando su desarrollo en un estadio equivalente al de la roseta madura del tipo silvestre. La administración de giberelinas al tipo silvestre produce fenocopias de *serrate*, lo que sugiere la implicación del gen *SE* en la síntesis o la percepción de estas hormonas.

Hemos establecido que las 45 estirpes mutantes cuyo fenotipo se denominó Compact rosette (Cro), por su densa roseta, corresponden a 13 genes. Siete de ellos (*CRO1-CRO7*) están representados por mutantes muy semejantes, enanos y con una inflorescencia arbustiva, y presentan relaciones de epistasia doble recesiva, lo que sugiere que su fenotipo se debe a la ausencia del producto final de una ruta metabólica en la que participan. Su comportamiento en la oscuridad y la constatación de que las mutaciones *cro1* son alelos del gen *DET2* apoyan la hipótesis de que los genes *CRO2-CRO7* participan en la síntesis o la percepción de los brasinosteroides.

La aproximación más habitualmente empleada para realizar contribuciones al análisis causal de un proceso de desarrollo es la concentración de esfuerzos en la caracterización estructural y funcional de un gen concreto. En esta Tesis, por el contrario, se ha optado por el análisis genético de una amplia colección de mutantes preexistentes, cuya caracterización se había limitado hasta ahora a una muy somera descripción de algunos de sus rasgos fenotípicos. Nuestro trabajo aporta una panorámica de las alteraciones en la morfología de la hoja de *Arabidopsis thaliana* que pueden obtenerse mediante mutaciones, a la vez que sienta las bases de los estudios centrados en genes específicos que serán realizados más adelante.

VII.- BIBLIOGRAFIA

Aeschbacher, R.A., Hauser, M.T., Feldmann, K.A., y Benfey, P.N. (1995). The *SABRE* gene is required for normal cell expansion in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **9**, 330-340.

Ahmad, M., y Cashmore, A.R. (1993). *HY4* gene of *Arabidopsis thaliana* encodes a protein with characteristics for a blue-light photoreceptor. *Nature* **366**, 100-111.

Aida, M., Ishida, T., Fukaki, H., Fujisawa,H., y Tasaka, M. (1997). Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: An analysis of the *cup-shaped cotyledon* mutant. *Plant Cell* **9**, 841-857.

Altmann, T., Felix, G., Jessop, A., Kauschmann, A., Uwer, U., Pena-Cortes, H., y Willmitzer, L. (1995). *Ac/Ds* transposon mutagenesis in *Arabidopsis thaliana*: mutant spectrum and frequency of *Ds* insertion mutants. *Mol. Gen. Genet.* **247**, 646-652.

Anderson, M. (1993). *The Nottingham* Arabidopsis *Stock Center. Seed List*. The University of Nottingham, Nottingham.

Arumuganathan, K., y Earle, E.D. (1991). Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol. Biol. Rep.* **9**, 208-218.

Avery, G.S. (1933). Structure and development of the tobacco leaf. *Am. J. Bot*. **20**, 565-592.

Azpiroz-Leehan, R., y Feldmann, K.A. (1997). T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis:* going back and forth. *Trends Genet.* **13**, 152-156.

Bai, S., y Sung, Z.R. (1995). The role of *EMF1* in regulating the vegetative and reproductive transition in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *Am. J. Bot*. **82**, 1095-1103.

Barabas, Z., y Rédei, G.P. (1971). Facilitation of crossing by the use of appropiate parental stocks. *Arabid. Inf. Serv*. **8**, 7-8.

Barton, M.K., y Poethig, R.S. (1993). Formation of the shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*: an analysis of development in the wild type and in the *shoot meristemless* mutant. *Development* **119**, 823-831.

Barthou, H., y Buis, R. (1988). Morphogenèse foliaire et activité photosynthétique chez le soja (*Glycine max*). *Can. J. Bot*. **66**, 1039-1046.

Baskin, T.I., Betzner, A.S., Hooggart, R., Cork, A., y Williamson, R.E. (1992). Root morphology mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Aust. J. Plant Physiol.* **19**, 427-437.

Bechtold, N., Ellis, J., y Pelletier, G. (1993). *In planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C. R. Acad. Sci*. **316**, 1194-1199.

Bell, D. J., y Ecker, J. R (1994). Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. *Genomics* **19**, 137-144.

Benfey, P.N., Linstead, P.J., Roberts, K., Schiefelbein, J.W., Hauser, M.T., y Aeschbacher, R.A. (1993). Root development in *Arabidopsis*: four mutants with dramatically altered root morphogenesis. *Development* **119**, 57-70.

Benfey, P.N., y Schiefelbein, J.W. (1994). Getting to the root of plant development: the genetics of *Arabidopsis* root formation. *Trends Genet.* **10**, 84-88.

Bennett, M.D., y Smith, J.B. (1976). Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **274**, 227-274.

Bennett, M.D., y Smith, J.B. (1991). Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **334**, 309-345.

Bennett S.R.M., Alvarez, J., Bossinger, G., y Smyth, D.R. (1995). Morphogenesis in *pinoid* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **8**, 505-520.

Bennetzen, J.L., y Freeling, M. (1993). Grasses as a single genetic system: genome composition, collinearity and compatibility. *Trends Genet.* **9**, 259-261.

Benzer, B. (1957). The elementary units of heredity. En *The chemical basis of heredity.* McElroy, W.D., y Glass, B. (eds.). John Hopkins Press, Baltimore.

Berleth, T., y Jürgens, G. (1993). The role of the *MONOPTEROS* gene in organising the basal body region of the *Arabidopsis* embryo. *Development* **118**, 575-587.

Berleth, T., Hardtke, C.S., Przemeck, G.K.H., y Müller, J. (1996). Mutational analysis of root initiation in the *Arabidopsis* embryo. *Plant Soil* **187**, 1-9.

Berná Amorós, G. (1997). Disección genética del desarrollo de la hoja en *Arabidopsis thaliana*: Aislamiento y caracterización de mutantes inducidos mediante metanosulfonato de etilo. Tesis Doctoral. Universidad de Alicante.

Bhatia, C.R., y Smith, H.H. (1966). Modification of leaf shape in *Arabidopsis* by phenyl boric acid. *Arabid. Inf. Serv*. **3**, 41.

Bower, F.O. (1935). *Primitive land plants*. Macmillan, Londres.

Bowman, J.L. (1994). *Arabidopsis*: *An atlas of morphology and development*. Springer-Verlag, Singapur.

Bowman, J.L., Smyth, D.R., y Meyerowitz, E.M. (1989). Genes directing flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **1**, 37-52.

Bowman, J.L., Smyth, D.R., y Meyerowitz, E.M. (1991). Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. *Development* **112**, 1-20.

Bowman, J.L., Sakai, H., Jack, T., Weigel, D., Mayer, U., y Meyerowitz, E.M. (1992). *SUPERMAN,* a regulator of floral homeotic genes in *Arabidopsis*. *Development* **114**, 599-615.

Bowman, J.L., Alvarez, J., Weigel, D., Meyerowitz, E.M., y Smyth, D.R. (1993). Control of flower development in *Arabidopsis thaliana* by *APETALA1* and interacting genes. *Development* **119**, 721-743.

Bradley, D., Carpenter, R., Sommer, H., Hartley, N., y Coen, E. (1993). Complementary floral homeotic phenotypes result from opposite orientations of a transposon at the *PLENA* locus of *Antirrhinum*. *Cell* **72**, 85-95.

Brutnell, T.P., y Langdale, J.A. (1998). Signals in leaf development. *Adv. Bot. Res.* **28**, 36-42.

Bürger, D. (1971). Die morphologischen mutanten des Göttinger *Arabidopsis*-sortiments, einschlien βlich der mutanten mit abweichender samenfarbe. *Arabid. Inf. Serv.* **7**, 36-42.

Cabrera y Poch, H.L., Peto, C.A., y Chory, J. (1993). A mutation in the *Arabidopsis DET3* gene uncouples photorregulated leaf development from gene expression and chloroplast biogenesis. *Plant J.* **4**, 671-682.

Callos, J.D., DiRado, M., Xu, B., Behringer, F.J., Link, B.M., y Medford, J.I. (1994). The *FOREVER YOUNG* gene encodes an oxidoreductase required for proper development of the *Arabidopsis* vegetative shoot apex. *Plant J.* **6**, 835-847.

Castle, L.A., y Meinke, D.W. (1994). A *FUSCA* gene of *Arabidopsis* encodes a novel protein essential for plant development. *Plant Cell* **6**, 25-41.

Cetl, I., Dobrovolna, J., y Nesrsta, M. (1969). Some new mutants induced by N-nitroso-N-methylurea. *Arabid. Inf. Serv*. **6**, 31.

Chang, C., y Meyerowitz, E.M. (1986). Molecular cloning and DNA sequence of the *Arabidopsis thaliana* alcohol dehydrogenase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 1408-1412.

Chang, C., Bowman, J.L., DeJohn, A.W., Lander, E.S., y Meyerowitz, E.M. (1988). Restriction fragment length polymorphism linkage map for *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 6856-6860.

Chaudhury, A.M., Letham, S., Craig, S., y Dennis, E.S. (1993). *amp1* - a mutant with high cytokinin levels and altered embryonic pattern, faster vegetative growth, constitutive photomorphogenesis and precocious flowering. *Plant J.* **4**, 907-916.

Cheng, J.-C., Seeley, K.A., y Sung, Z.R. (1995). *RML1* and *RML2*, *Arabidopsis* genes required for cell proliferation at the root tip. *Plant Physiol*. **107**, 365-376.

Chory, J. (1992). A genetic model for light-regulated seedling development in *Arabidopsis*. *Development* **115**, 337-354.

Chory, J. (1993). Out of darkness: mutants reveal pathways controlling light-regulated development in plants. *Trends Genet*. **9**, 167-172.

Chory, J., Peto, C.A., Ashbaug, M., Saganich, R., Pratt, L.H., y Ausubel, F.M. (1989a). Different roles for phytochrome in etiolated and green plants deduced from characterization of *Arabidopsis thaliana* mutants. *Plant Cell* **1**, 867-880.

Chory, J., Peto, C., Feinbaum, R., Pratt, L., y Ausubel, F. (1989b). *Arabidopsis thaliana* mutant that develops as a light-grown plant in the absence of light. *Cell* **58**, 991-999.

Chory, J., Nagpal, P., y Peto, C.A. (1991). Phenotypic and genetic analysis of *det2*, a new mutant that affects light-regulated seedling development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **3**, 445-460.

Chory, J., y Susek, R.E. (1994). Light signal transduction and the control of seedling development. En *Arabidopsis*, pp. 579-614. Meyerowitz, E.M., y Somerville, C.R. (eds.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Chory, J., Cook, R.K., Dixon, R., Elich, T., Li, H.M., Lopez, E., Mochizuki, N., Nagpal, P., Pepper, A., Poole, D., y Reed, J. (1995). Signal-transduction pathways controlling light-regulated development in *Arabidopsis*. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **350**, 59-65.

Clark, S.E. (1997). Organ formation at the vegetative shoot meristem. *Plant Cell* **9**, 1067-1076.

Clark, S.E., Running, M.P., y Meyerowitz, E.M. (1993). *CLAVATA1*, a regulator of meristem and flower development in *Arabidopsis*. *Development* **119**, 397-418.

Clark S.E., Running M.P., y Meyerowitz, E.M. (1995). *CLAVATA3* is a specific regulator of shoot and floral meristem development affecting the same processes as *CLAVATA1*. *Development* **121**, 2057-2067.

Clark, S.E., Jacobsen, S.E., Levin, J.Z., y Meyerowitz, E.M. (1996). The *CLAVATA* and *SHOOT MERISTEMLESS* loci competitively regulate meristem activity in *Arabidopsis*. *Development* **122**, 1567-1575.

Clark, S.E., Williams, R.W., y Meyerowitz, E.M. (1997). The *CLAVATA1* gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell* **89**, 575-585.

Clarke, J.H., Mithen, R., Brown, J.K., y Dean, C. (1995). QTL analysis of flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet*. **248**, 278-286.

Clouse, S.D., Langford, M., y McMorris, T.C. (1995). Brassinosteroids as signals in plant growth and development. *J. Cell. Biochem*. **Suppl. 21A,** 479.

Clouse, S.D., Langford, M., y McMorris, T.C. (1996). A brassinosteroid-insensitive mutant in *Arabidopsis thaliana* exhibits multiple defects in growth and development. *Plant Physiol*. **111**, 671-678.

Coen, E.S., y Meyerowitz, E.M. (1991). The war of the whorls: Genetic interactions controlling flower development. *Nature* **353**, 31-37.

Conway, L.J., y Poethig, R.S. (1993). Heterochrony in plant development. *Dev. Biol*. **4**, 65-72.

Corey, L.A., Matzinger, D.F. (1973). Diallel crosses among races of *Arabidopsis thaliana*. *Arabid. Inf. Serv*. **10**, 34.

Cusset, G. (1986). La morphogenèse du limbe des Dicotylédones. *Can. J. Bot*. **64**, 2807-2839.

Dale, J.E. (1964). Leaf growth in *Phaseolus vulgaris*. I. Growth of the first pair of leaves under constant conditions. *Ann. Bot*. **28**, 579-589.

Dale, J.E. (1988). The control of leaf expansion. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **39**, 267-295.

de Haro, A. (1964). *Atlas de Biología*. Jover, Madrid.

Dehesh, K., Franci, C., Parks, B.M., Seeley, K., Short, T.W., Tepperman, J.T., y Quail, P.H. (1993). *Arabidopsis HY8* locus encodes phytochrome A. *Plant Cell* **5**, 1081-1088.

Deng, X.W., Caspar, T., y Quail, P.H. (1991). *cop1*: a regulatory locus involved in light-controlled development and gene expression in *Arabidopsis*. *Genes Dev*. **5**, 1172-1182.

Deng, X.W., Matsui, M., Wei, N., Wagner, D., Chu, A.M., Feldmann, K.A., y Quail, P.H. (1992). *COP1,* an *Arabidopsis* regulatory gene, encodes a protein with both a zinc-binding motif and a G beta homologous domain. *Cell* **71**, 791-801.

Dengler, N.G. (1984). Comparison of leaf development in normal (+/+), Entire (e/e), and lanceolate (La/+) plants of tomato, *Lycopersicon esculentum* "Ailsa Craig". *Bot. Gaz*. **145**, 66-77.

Dennet, M.D., Auld, B.A., y Elston, J. (1978). A description of leaf growth in *Vicia faba* L. *Ann. Bot*. **42**, 223-232.

Di Laurenzio, L., Wysocka-Diller, J., Malamy, J.E., Pysh, L., Helariutta, Y., Freshour, G., Hahn, M.G., Feldmann, K.A., y Benfey, P.N. (1996). The *SCARECROW* gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. *Cell* **86**, 423-433.

Dobrovolna, J. (1967). The variability of developmental characters in natural populations of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Arabid. Inf. Serv*. **4**, 6-7.

Dolan, L, y Poethig, R.S. (1991). Genetic analysis of leaf development in cotton. *Development* **Suppl. 1**, 39-46.

Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K., y Scheres, B. (1993). Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* **119**, 71-84.

Dolan, L., Duckett, C., Grierson, C., Linstead, P., Schneider, K., Lawson, E., Dean, C., Poethig, R.S., y Roberts, L. (1994). Clonal relations and patterning in the root epidermis of *Arabidopsis*. *Development* **120**, 2465-2474.

Elliot, R.C., Betzner, A.S., Huttner, E., Oakes, M.P., Tucker, W.Q.J., Gerentes, D., Pérez, P., y Smyth, D.R. (1996). *AINTEGUMENTA*, an *APETALA2*-like gene of *Arabidopsis* with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth. *Plant Cell* **8**, 155-168.

Endrizzi, K., Moussian, B., Haecker, A., Levin, J., y Laux, T. (1996). The *SHOOT MERISTEMLESS* gene is required for maintenance of undifferentiated cells in *Arabidopsis* shoot and floral meristems and acts at a different regulatory level than the meristem genes *WUSCHEL* and *ZWILLE*. *Plant J.* **10**, 967-979.

Estelle, M.A., y Somerville, C.R. (1986). The mutants of *Arabidopsis*. *Trends Genet*. **2**, 89-93.

Evans, M.W., y Grover, F.O. (1940). Developmental morphology of the growing point of the shoot and the inflorescence in grasses. *J. Agricul. Res*. **61**, 481-520.

Evans, M.M., Passas, H.J., y Poethig, R.S. (1994). Heterochronic effects of *glossy15* mutations on epidermal cell identity in maize. *Development* **120**, 1971-1981.

Evans, M.M., y Poethig, R.S. (1995). Gibberellins promote vegetative phase change and reproductive maturity in maize. *Plant Physiol.* **108**, 475-487.

Feldmann, K.A. (1991). T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: Mutational spectrum. *Plant J.* **1**, 71-82.

Feldmann, K.A., y Marks, M.D. (1987). *Agrobacterium*-mediated transformation of germinating seed of *Arabidopsis thaliana*: a non-tissue culture approach. *Mol. Gen. Genet*. **208**, 1-9.

Feldmann, K.A., Marks, M.D, Christianson, M.L., y Quatrano, R.S. (1989). A dwarf mutant of *Arabidopsis* generated by T-DNA insertion mutagenesis. *Science* **243**, 1351-1354.

Feldmann, K.A., Malmberg, R.L., y Dean, C. (1994). Mutagenesis in *Arabidopsis*. En *Arabidopsis,* pp. 137-172. Meyerowitz, E.M., y Somerville, C.R. (eds.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Finnegan, E J., Peacock, W.J., y Dennis, E.S. (1996). Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 8449-8454.

Flavell, R. (1980). The molecular characterization and organization of plant chromosomal DNA sequences. *Annu. Rev. Plant Phys.* **31**, 569-596.

Francis, D.M., Hulbert, S.H., y Michelmore, R.W. (1990). Genome size and complexity of the obligate fungal pathogen, *Bremia lactucae*. *Exp. Mycol.* **14**, 299-309.

Fosket, D.E. (1994). *Plant growth* and *development: a molecular approach*. Academic Press, San Diego.

Furner, I.J., y Pumfrey, J.E. (1992). Cell fate in the shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **115**, 755-764.

Galbraith, D.W., Harkins, K.R., y Knapp, S. (1991). Systemic endopolyploidy in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **96**, 985-989.

Galway, M.E., Masucci, J.D., Lloyd, A.M., Walbot, V., Davis, R.W., y Schiefelbein, J.W. (1994). The *TTG* gene is required to specify epidermal cell fate and cell patterning in the *Arabidopsis* root. *Dev. Biol.* **166**, 740-754.

García-Bellido, A. (1987). Historia de la Genética del Desarrollo. En *Historia de la Ciencia*, pp. 145-161. Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Madrid.

Gelinas, D., Postlethwait, S.N., y Nelson, O.E. (1969). Characterization of development in maize through the use of mutants. II. The abnormal growth conditioned by the *Knotted* mutant. *Am. J. Bot*. **36**, 671-678.

Gilbert, S.F. (1994). *Developmental Biology*. Sinauer Associates, Massachusetts.

Goldberg R.B. (1988). Plants: novel developmental processes. *Science* **240**, 1460-1467.

Gomez-Campo, C. (1976). Conservation techniques of crucifer seed banks. *Arabid. Inf. Serv*. **13**, 18-21.

Goodrich, J., Puangsomlee, P., Martin, M., Long, D., Meyerowitz, E.M., y Coupland, G. (1997). A Polycomb-group gene regulates homeotic gene expression in *Arabidopsis*. *Nature* **386**, 44-51.

Goto, N., Starke, M., y Kranz, A.R, (1987). Effect of gibberellins on flower development of the pin-formed mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Arabid. Inf. Serv* **23**, 66-71.

Goto, K., Katoh, N., y Kranz, A.R. (1991a). Morphogenesis of floral organs in *Arabidopsis*: predominant carpel formation of the pin-formed mutant. *Jpn. J. Genet*. **66**, 551-567.

Goto, K., Kumagai, T., y Koornneef, M. (1991b). Flowering responses to light-breaks in photomorphogenic mutants of *Arabidopsis thaliana*, a long day plant. *Physiol. Plant*. **83**, 209-215.

Goto, K., y Meyerowitz, E.M. (1994). Function and regulation of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *PISTILLATA*. *Genes Dev*. **8**, 1548-1560.

Grbic, V., y Bleecker, A.B. (1996). An altered body plan is conferred on *Arabidopsis* plants carrying dominant alleles of two genes. *Development* **122**, 2395-2403.

Green, P.B., y Lang, J.M. (1981). Towards a biophysical theory of organogenesis: Birefringence observations on regenerating leaves in the succulent, *Graptopetalum paraguayense* E. Walther. *Planta* **151**, 413-426.

Green, P.B., Steele, C.S., y Rennich, S.C. (1996). Phyllotactic patterns: A biophysical mechanism for their origin. *Ann. Bot*. **77**, 515-527.

Greyson, R.I., y Walden, D.B. (1972). The ABPHYL syndrome in *Zea mays*. I. Arrangement number and size of leaves. *Am. J. Bot*. **59**, 466-472.

Grinikh, L.I., Shevchenko, V.V., Grigoreva, G.A., y Draginskaya, L.Y. (1974). Study of chimerism in the reproductive tissue of *Arabidopsis thaliana* plants following irradiation of seeds. *Genetika* **10**, 18-28.

Grinikh, L.I., y Shevchenko, V.V. (1976). Number of initial cells forming the reproductive tissue in vegetating *Arabidopsis thaliana* plants. *Genetika* **12**, 690-692.

Grossniklaus, U., Vielle-Calzada, J.-P., Hoeppner, M.A., y Gagliano, W.B. (1998). Maternal control of embryogenesis by *MEDEA*, a *Polycomb* Group gene in *Arabidopsis*. *Science* **280**, 446-450.

Grove, M.D., Spencer, G.F., Rohwedder, W.K., Mandava, N., Worley, J.F., Warthen, Jr., J.D., Steffens, G.L., Flippen-Anderson, J.L., y Cook, Jr., J.C. (1979). Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. *Nature* **281**, 216-217.

Haber, A.H., y Foard, D.E. (1963). Nonessentiality of concurrent cell divisions for the degree of polarization of leaf growth. I. Studies with radiation-induced mitotic inhibition. *Am. J. Bot.* **49**, 583-586.

Hake, S., Vollbrecht, E., y Freeling, M. (1989). Cloning *Knotted*, the dominant morphological mutant in maize using *Ds2* as a transposon tag. *EMBO J.* **8**, 15-22.

Hake, S., y Sinha, N. (1991). Genetic analysis of leaf development. En *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology,* pp. 187-222. Miflin, B.J. (ed.). Oxford University Press, London.

Hake, S., Char, B.R., Chuck, G., Foster, T., Long, J., y Jackson, D. (1995). Homeobox genes in the functioning of plant meristems. *Philos. Trans. R. Soc. London B. Biol. Sci.* **350**, 45-51.

Haffter, P., Granato, M., Brand, M., Mullins, M.C., Hammerschmidt, M., Kane, D.A., Odenthal, J., van Eeden, F.J., Jiang, Y.J., Heisenberg, C.P., Kelsh, R.N., Furutani Seiki, M., Vogelsang, E., Beuchle, D., Schach, U., Fabian, C., y Nüsslein-Volhard, C. (1996). The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* **123**, 1-36.

Hanstein, J. (1870). *Die entwicklung des deimes der monocotyledon und der dicotilen*. Botanische Abhandlung, Bonn.

Hall, L.N., y Langdale, J.A. (1996). Molecular genetics of cellular differentiation in leaves. *New Phytol*. **132**, 533-553.

Hardin, J. (1994). The Sea Urchin. En *Embryos,* pp. 37-53. Bard, J. (ed.). Wolfe Publishing, Singapur.

Hareven, D., Gutfinger, T., Parnis, A., Eshed, Y, y Lifschitz, E. (1996). The making of a compound leaf: genetic manipulation of leaf architecture in tomato. *Cell* **84**, 735-744.

Haughn, G.W., y Somerville, C.R. (1988). Genetic control of morphogenesis in *Arabidopsis*. *Dev. Genet*. **9**, 73-89.

Haughn, G.W., Modrusan, Z., Samach, A., y Wilkinson, M. (1994). The control of floral morphogenesis in *Arabidopsis*: regulating the regulators. *Flowering Newsl*. **18**, 12-20.

Haughn, G.W., Schultz, E.A., y Martínez-Zapater, J.M. (1995). The regulation of flowering in *Arabidopsis thaliana*: meristems, morphogenesis, and mutants. *Can. J. Bot*. **73**, 959-981.

Hauser, M.-T., Morikami, A., y Benfey, P.N. (1995). Conditional root expansion mutants of *Arabidopsis. Development* **121**, 1237-1252.

Hempel, F.D., Weigel, D., Mandel, M.A., Ditta, G., Zambryski, P.C., Feldman, L.J., y Yanofsky, M.F. (1997). Floral determination and expression of floral regulatory genes in *Arabidopsis*. *Development* **124**, 3845-3853.

Heslop-Harrison, J.S., y Schwarzacher, T. (1990). The ultrastructure of *Arabidopsis thaliana* chromosomes. En *Abstracts from the 4th International Conference on Arabidopsis research,* p. 4. University of Vienna, Austria.

Hobbie, L.J. (1998). Auxins: Molecular genetic approaches in *Arabidopsis*. *Plant. Physiol. Biochem*. **36**, 91-102.

Hodgkin, J., Plasterk, R.H., y Waterston, R.H. (1995). The nematode *Caenorhabditis elegans* and its genome. *Science* **270**, 410-414.

Hope, I.A. (1994). *Caenorhabditis elegans*, the Nematode Worm. En *Embryos,* pp. 55-75. Bard, J. (ed.). Wolfe Publishing, Singapur.

Hou, Y., von Arnim, A., y Deng, X.W. (1993). A new class of *Arabidosis* constitutive photomorphogenic genes involved in regulating cotyledon development. *Plant Cell* **5**, 329-339.

Huala, E., y Sussex, I.M. (1992). *LEAFY* interacts with floral homeotic genes to regulate *Arabidopsis* floral development. *Plant Cell* **4**, 901-913.

Huijser, P., Klein, J., Lönning, W.-E., Meijer, H., Saedler, H., y Sommer, H. (1992). Bracteomania, an inflorescence anomaly, is caused by the loss of function of the MADS-box gene *squamosa* in *Antirrhinum majus*. *EMBO J.* **11**, 1239-1249.

Hülskamp, M., Miséra, S., y Jürgens, G. (1994). Genetic dissection of trichome cell development in *Arabidopsis*. *Cell* **76**, 555-566.

Ingram, G.C., Goodrich, J., Wilkinson, M.D., Simon, R., Haughn, G.W., y Coen, E.S. (1995). Parallels between *UNUSUAL FLORAL ORGANS* and *FIMBRIATA*, genes controlling flower development in *Arabidopsis* and *Antirrhinum*. *Plant Cell* **7**, 1501-1510.

Irish, V.F., y Sussex, I.M. (1990). Function of the *APETALA-1* gene during *Arabidopsis* floral development. *Plant Cell* **2**, 741-753.

Irish, V.F., y Sussex, I.M. (1992). A fate map of the *Arabidopsis* embryonic shoot apical meristem. *Development* **115**, 745-753.

Jack, T., Brockman, L.L., y Meyerowitz, E.M. (1992). The homeotic gene *APETALA3* of *Arabidopsis thaliana* encodes a MADS box and is expressed in petals and stamens. *Cell* **68**, 683-697.

Jack, T., Fox, G.L., y Meyerowitz, E.M. (1994). *Arabidopsis* homeotic gene *APETALA3* ectopic expression: transcriptional and posttranscriptional regulation determine floral organ identity. *Cell* **76**, 703-716.

Jackson, D., Veit, B., y Hake, S. (1994). Expression of maize *KNOTTED1* related homeobox genes in the shoot apical meristem predicts patterns of morphogenesis in the vegetative shoot. *Development* **120**, 405-413.

Jacobsen, S.E., y Olszewski, N.E. (1993). Mutations at the *SPINDLY* locus of *Arabidopsis* alter gibberellin signal transduction. *Plant Cell* **4**, 1507-1518.

Jofuku, K.D., den Boer, B.G., van Montagu, M., y Okamuro, J.K. (1994). Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene *APETALA2*. *Plant Cell* **6**, 1211-1225.

Jones, C.S. (1993). Heterochrony and heteroblastic leaf development in two subspecies of *Cucurbita argyrosperma* (*Cucurbitaceae*). *Am. J. Bot*. **80**, 778-795.

Jones, R.S., y Gelbart, W.M. (1993). The *Drosophila* Polycomb-group gene *Enhacer of zeste* contains a region with a sequence similarity to *trithorax*. *Mol. Cell. Biol*. **13**, 6357-6366.

Jürgens, G. (1994). Pattern formation in the embryo. En *Arabidopsis,* pp. 297-312. Meyerowitz, E.M., y Somerville, C.R. (eds.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Jürgens, G., Mayer, U., Torres Ruiz, R.A., Berleth, T., y Miséra, S. (1991). Genetic analysis of pattern formattion in the *Arabidopsis* embryo. *Development* **Suppl. 1**, 27-38.

Jürgens, G., y Mayer, U. (1994). *Arabidopsis*. En *Embryos,* pp. 7-21. Bard, J. (ed.). Wolfe Publishing, London.

Jürgens, G., Torres Ruiz, R.A., Laux, T., Mayer, U., y Berleth, T. (1994). Early events in apical-basal formation in *Arabidopsis*. En *Plant Molecular Biology: Molecular-Genetic Analysis of Plant Development and Metabolism*, pp. 95-103. G. Coruzzi y P. Puigdomènech (eds.). Springer, Berlin.

Kaiser, J. (1996). First global sequencing effort begins. *Science* **274**, 30.

Kamalay, J.C., y Goldberg, R.B. (1980). Regulation of structural gene expression in tobacco. *Cell* **19**, 935-946.

Kang, H-G., Noh, Y-S., Chung, Y-Y., Costa, M.A., An, K., y An, G. (1995). Phenotypic alterations of petal and sepal by ectopic expression of a rice MADS box gene in tobacco. *Plant Mol. Biol*. **29**, 1-10.

Karbe, C., y Röbbelen, G. (1968). Variation of plant size and other morphological characters in natural populations of *Arabidopsis*. *Arabid. Inf. Serv.* **5**, 13-15.

Karlsson, B.H., Sills, G.R., y Nienhuis, J. (1993). Effects of photoperiod and vernalization on the number of leaves at flowering in 32 *Arabidopsis thaliana* (*Brassicaceae*) ecotipes. *Am. J. Bot*. **80**, 646-648.

Kauschmann, A., Jessop, A., Koncz, C., Szekeres, M., Willmitzer, L., y Altmann, T. (1996). Genetic evidence for an essential role of brassinosteroid in plant development. *Plant J.* **9**, 701-713.

Kempin, S.A., Savidge, B., y Yanofsky, M.F. (1995). Molecular basis for the cauliflower phenotype in *Arabidopsis*. *Science* **267**, 522-525.

Kennison, J.A. (1995). The Polycomb and trithorax group proteins of *Drosophila:* Trans-regulators of homeotic gene function. *Annu. Rev. Genet*. **29**, 289-303 .

Kerstetter, R., Vollbrecht, E., Lowe, B., Veit, B., Yamaguchi, J., y Hake, S. (1994). Sequence analysis and expression patterns divide the maize knotted1-like homeobox genes into two classes. *Plant Cell* **6**, 1877-1887.

Kerstetter, R.A., y Hake, S. (1997). Shoot meristem formation in vegetative development. *Plant Cell* **9**, 1001-1010.

Kieber, J.J., Rothenberg, M., Roman, G., Feldmann, K.A., y Ecker, J.R. (1993). *CTR1*, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis,* encodes a member of the raf family of protein kinases. *Cell* **72**, 427-441.

Kirchheim, B., y Kranz, A.R. (1981). New population samples of the AIS-seed bank. *Arabid. Inf. Serv.* **18**, 173-176.

Kirchheim, B., y Kranz, A.R. (1985). Computerized listing of the *Arabidopsis* Information Service seed bank material. *Arabid. Inf. Serv*. **22**, 147-152.

Konieczny, A., y Ausubel, F.M. (1993). A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype- specific PCR-based markers. *Plant J.* **4**, 403-410.

Koornneef, M. (1978). Gibberellin-sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Arabid. Inf. Serv*. **15**, 17-20.

Koornneef, M. (1981). The complex syndrome of *ttg* mutants. *Arabid. Inf. Serv*. **18**, 45-51.

Koornneef, M. (1994). *Arabidopsis* genetics. En *Arabidopsis,* pp. 89-120. Meyerowitz, E.M., y Somerville, C.R. (eds.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Koornneef, M., y van der Veen, J.H. (1980). Induction and analysis of gibberellin sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Theor. Appl. Genet*. **58**, 257-263.

Koornneef, M., y Hanhart, C.J. (1983). Linkage marker stocks of *Arabidopsis thaliana. Arabid. Inf. Serv*. **20**, 89-92.

Koornneef, M., van Eden, J., Hanhart, C.J., Stam, P., Braaksma, F.J., y Fenstra, W.J. (1983). Linkage map of *Arabidopsis thaliana*. *J. Hered*. **74**, 265-272.

Koornneef, M., Elgersma, A., Hanhart, C.J., van Loenen-Martinet, E.P., van Rijn, L., y Zeevaart, J.A.D. (1985). A gibberellin insensitive mutant of *Arabidopsis thaliana. Physiol. Plant*. **65**, 33-39.

Koornneef, M., Hanhart, C.J., van Loenen-Martinet, E.P., y van der Veen, J.H. (1987). A marker line, that allows the detection of linkage on all *Arabidopsis* chromosomes. *Arabid. Inf. Serv*. **23**, 46-50.

Koornneef, M., y Stam, P. (1988). Procedures for mapping by using F_2 and F_3 populations. *Arabid. Inf. Serv*. **25**, 35-40.

Koornneef, M., Hanhart, C.J., y van der Veen, J.H. (1991). A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* **229**, 57-66.

Kramer, D. (1996). First plant genome sequencing planned. *Nature* **383**, 208.

Kranz, A.R. (1976). International cooperation in *Arabidopsis* research. *Arabid. Inf. Serv.* **13**, 12-17.

Kranz, A.R. (1978). Demostration of new and additional population samples and mutant lines of the AIS-seed bank. *Arabid. Inf. Serv.* **15**, 118-139.

Kranz, A.R., y Kirchheim, B. (1987). Genetic resources in *Arabidopsis*. *Arabid. Inf. Serv.* **vol. 24**.

Kranz, A.R., y Kirchheim, B. (1990). Additions and corrections to the AIS-seed bank listing. *Arabid. Inf. Serv.* **27**, 89-200.

Krickharn, D., y Napp-Zinn, K. (1975). Fasciation studies in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Arabid. Inf. Serv*. **12**, 9.

Krizek, B.A., y Meyerowitz, E.M. (1996). The *Arabidopsis* homeotic genes *APETALA3* and *PISTILLATA* are sufficient to provide the B class organ identity function. *Development* **122**, 11-22.

Kunst, L., Klenz, J.E., Martínez-Zapater, M., y Haughn, G.W. (1989). *AP2* gene determines the identity of perianth organs in flowers of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **1**, 1195-1208.

Lacroix, C.R., y Posluszny, U. (1991). A morphometric analysis of leaf developmment in *Vitis riparia*, and grape cultivars Concord and Vivant. *Can. J. Bot.* **69**, 400-406.

Laibach, F. (1907). Zur Frage nach der Individualitat der Chromosomen im Pflanzenreich. *Beih. Bot. Cbl*. **1**, 191-210.

Laux, T., Mayer, K.F., Berger, J., y Jürgens, G. (1996). The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development* **122**, 87-96.

Laux, T., y Jürgens, G. (1997). Embryogenesis: a new start in life. *Plant Cell* **9**, 989-1000.

Lawson, E.J., y Poethig, R.S. (1995). Shoot development in plants: time for a change. *Trends Genet.* **11**, 263-268.

Lee, I., Bleecker, A., y Amasino, R. (1993). Analysis of naturally ocurring late flowering in *Arabidopsis thaliana. Mol. Gen. Genet*. **237**, 171-176.

Lee, I., Aukerman, M.J., Gore, S.L., Lohman, K.N., Michaels, S.D., Weaver, L.M., John, M.C., Feldmann, K.A., y Amasino, R.M. (1994). Isolation of *LUMINIDEPENDENS:* a gene involved in the control of flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **6**, 75-83.

Leptin, M. (1994). *Drosophila*. En *Embryos,* pp. 135-147. Bard, J. (ed.). Wolfe Publishing, Singapur.

Leutwiler, L.S., Hough-Evans, B.R., y Meyerowitz, E.M. (1984). The DNA of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet*. **194**, 15-29.

Levin, J.Z., y Meyerowitz, E.M. (1995). *UFO*: an *Arabidopsis* gene involved in both floral meristem and floral organ development. *Plant Cell* **7**, 529-548.

Lewis, E. B. (1951). Pseudoallelism and gene evolution. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol*. **16**, 159-174.

Leyser, H.M.O., y Furner, I.J. (1992). Characterisation of three shoot apical meristem mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **116**, 397-403.

Li, S., y Redei, G.P. (1969). Estimation of mutation rates in autogamous diploids. *Radiat. Bot.* **9**, 125-131.

Li, J., Nagpal, P., Vitart, V., McMorris, T.C., y Chory, J. (1996). A role for brassinosteroids in light-dependent development of *Arabidopsis*. *Science* **272**, 398-401.

Lincoln, C., Britton, J.H., y Estelle, M. (1990). Growth and development of the *axr1* mutants of *Arabidopsis*. *Plant J*. **6**, 401-412.

Lincoln, C., Long, J., Yamaguchi, J., Serikawa, K., y Hake, S. (1994). A *KNOTTED1*-like homeobox gene in *Arabidopsis* is expressed in the vegetative meristem and dramatically alters leaf morphology when overexpressed in transgenic plants. *Plant Cell* **6**, 1859-1876.

Liu, C., Xu, Z., y Chua, N-H. (1993). Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. *Plant Cell* **5**, 621-630.

Liu, Z., y Meyerowitz, E.M. (1995). *LEUNIG* regulates *AGAMOUS* expression in *Arabidopsis* flowers. *Development* **121**, 975-991.

Long, J.A., Moan, E.I., Medford, J.I., y Barton, M.K. (1996). A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of *Arabidopsis*. *Nature* **379**, 66-69.

Ludwig, S.R., Habera, L.F., Dellaporta, S.L., y Wessler, S.R. (1989). Lc, a member of the maize R gene family responsible for tissue-specific anthocyanin production, encodes a protein similar to transcriptional activators and contains the myc-homology region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 7092-7096.

Mandel, M.A., Bowman, J.L., Kempin, S.A., Ma, H., Meyerowitz, E.M., y Yanofsky, M.F. (1992a). Manipulation of flower structure in transgenic tobacco. *Cell* **71**, 133-143.

Mandel, M.A., Gustafson-Brown, C., Savidge, B., y Yanofsky, M.F. (1992b). Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA1*. *Nature* **360**, 273-277.

Martínez-Zapater, J.M., y Somerville, C. (1990). Effect of light quality and vernalization on late-flowering mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*. **92**, 770-778.

Martínez-Zapater, J.M., Coupland, G., Dean, C., y Koornneef, M. (1994). The transition to flowering in *Arabidopsis*. En *Arabidopsis,* pp. 403-433. Meyerowitz, E.M., y Somerville, C.R. (eds.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Martínez-Zapater, J.M., Jarillo, J.A., Cruz-Alvarez, M., Roldau, M., y Salinas, J. (1995). *Arabidopsis* late-flowering *fve* mutants are affected in both vegetative and reproductive development. *Plant J.* **7**, 543-551.

Marx, G.A. (1987). A suite of mutants that modify pattern formation in pea leaves. *Plant Mol. Biol. Rep*. **5**, 311-335.

Masucci, J.D., Rerie, W.R., Foreman, D.R., Zhang, M., Galway, M.E., Marks, M.D. y Schiefelbein, J.W. (1996). The homeobox gene *GLABRA2* is required for position-dependent cell differentiation in the root epidermis of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **122**, 1255-1260.

Mayer U., Torres Ruiz R.A., Berleth T., Miséra S., y Jürgens, G. (1991). Mutations affecting body organization in the *Arabidopsis* embryo. *Nature* **353**, 402-407.

Mayer, U., Büttner, G., y Jürgens, G. (1993). Apical-basal pattern formation in the *Arabidopsis* embryo: studies on the role of the *GNOM* gene. *Development* **117**, 149-162.

McConnell, J.R., y Barton, K. (1995). Effect of mutations in the *PINHEAD* gene of *Arabidopsis* on the formation of shoot apical meristems. *Dev. Genet*. **16**, 358-366.

McHale, N.A. (1992). A nuclear mutation blocking initiation of the lamina in leaves of *Nicotiana sylvestris*. *Planta* **186**, 355-360.

McHale, N.A. (1993). *LAM-1* and *FAT* genes control development of the leaf blade in *Nicotiana sylvestris*. *Plant Cell* **5**, 1029-1038.

McKelvie, A.D. (1962). A list of mutant genes in *Arabidopsis thaliana*. *Rad. Bot.* **1**, 233-241.

Medford, J.I., Behringer, F.J., Callos, J.D., y Feldmann, K.A. (1992). Normal and abnormal development in the *Arabidopsis* vegetative shoot apex. *Plant Cell* **4**, 631-643.

Meinke, D.W. (1992). A homeotic mutant of *Arabidopsis thaliana* with leafy cotyledons. *Science* **258**, 1647-1650.

Meinke, D.W. (1994). Seed development in *Arabidopsis thaliana*. En *Arabidopsis,* pp. 253-296. Meyerowitz, E.M., y Somerville, C.R. (eds.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Meinke, D.W., y Koornneef, M. (1997). Community standards for *Arabidopsis* genetics. *Plant J.* **12**, 247-253.

Melaragno, J.E., Mehrotra, B., y Coleman, A.W. (1993). Relationship between endopolyploidy and cell size in epidermal tissue of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **5**, 1661-1668.

Meyerowitz, E.M. (1987). *Arabidopsis thaliana*. *Annu. Rev. Genet.* **21**, 93-111.

Meyerowitz, E.M. (1989). *Arabidopsis,* a useful weed. *Cell* **56**, 263-269.

Meyerowitz, E.M. (1994a). Pattern formation in plant development: four vignettes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **4**, 602-608.

Meyerowitz, E.M. (1994b). Structure and organization of the *Arabidopsis thaliana* nuclear genome. En *Arabidopsis*, pp. 21-36. Meyerowitz, E.M., y Somerville, C.R. (eds.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Meyerowitz, E. M. (1994c). Plant developmental biology: green genes for the 21st century. *BioEssays* **16**, 621-625.

Meyerowitz, E.M. (1996). Plant development: local control, global patterning. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **6**, 475-479.

Meyerowitz, E.M. (1997). Genetic control of cell division patterns in developping plants. *Cell* **88**, 299-308.

Miklos, G.L.G., y Rubin, G.M. (1996). The role of the genome project in determining gene function: insights from model organisms. *Cell* **86**, 521-529.

Mitchell, J.W., Mandava, N., Worley, J.F., Plimmer, J.R., y Smith, M.V. (1970). Brassins: a new family of plant hormones from rape pollen. *Nature* **225**, 1065-1066.

Miséra, S., Muller, A.J., Weiland Heidecker, U., y Jürgens, G. (1994). The *FUSCA* genes of *Arabidopsis:* negative regulators of light responses. *Mol. Gen. Genet.* **244**, 242-252.

Mirza, J.I., Olsen, G.M., Iversen, T.-H., y Maher, E.P. (1984). The growth and gravitopic responses of wild-type and auxin resistant mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant*. **60**, 516-522.

Mizukami, Y., y Ma, H. (1992). Ectopic expression of the floral homeotic gene *AGAMOUS* in transgenic *Arabidopsis* plants alters floral organ identity. *Cell* **71**, 119-131.

Müller, A.J. (1965). The chimeral structure of M1 plants and its bearing on the determination of mutation frequencies in *Arabidopsis*. En *Induction of mutations and the mutation process,* pp. 46-52. Veleminsky, J., y Gichner, T. (eds.). Academia Checoslovaca de las Ciencias, Praga.

Muller, J. (1995). Transcriptional silencing by the Polycomb protein in *Drosophila* embryos. *EMBO J.* **14**, 1209-1220.

Murashige, T., y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay, with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. **15**, 473-497.

Nam, H.G., Giraudat, J., den Boer, B., Moonan, F., Loos, W.D.B., Hage, B.M., y Goodman, H. (1989). Restriction fragment length polymorphism linkage map of *Arabidopsis thaliana. Plant Cell* **1**, 699-705.

Napp-Zinn, K. (1964). *Beitrage zur Phytologie*, pp. 39-49. Walter, H. (ed.). Ulmer, Stuttgart.

Napp-Zinn, K., y G. Bonzi, G. (1970). Gibberelin effects in dwarf mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Arabid. Inf. Serv*. **7**, 8.

Newman, T., Bruijn, F.J., Green, P., Keegstra, K., Kende, H., McIntosh, L., Ohlrogge, J., Raikhel, N., y Thomashow, M. (1994). Genes galore: a summary of methods for accesing results from large-scale partial sequencing of anonymous *Arabidopsis* cDNA clones. *Plant Physiol.* **106**, 1241-1255.

Norman, C., Runswick, M., Pollock, R., y Triesman, R. (1988). Isolations and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the *c-fos* serum response element. *Cell* **55**, 989-1003.

Nüsslein-Volhard, C., y Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* **287**, 795-801.

Okamuro, J.K., den Boer, B.G.W., y Jofuku, K.D. (1993). Regulation of *Arabidopsis* flower development. *Plant Cell* **5**, 1183-1193.

Passmore, S., Maine, G.T., Elble, C., Christ, C., y Tye, B.K. (1988). A *Saccharomyces cerevisiae* protein involved in plasmid maintenance is necessary for mating of *MATa* cells. *J. Mol. Biol.* **204**, 593-606.

Peleman, J., Cottyn, B., van Camp, W., van Montagu, M., y Inze, D. (1991). Transient occurrence of extrachromosomal DNA of an *Arabidopsis thaliana* transposon-like element, *Tat1*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 3618-3622.

Pennell, R.I., Cronk, Q.C.B., Forsberg, L.S., Stöhr, C., Snogerup, S., Kjellborn, P., y McCabe, P.F. (1995). Cell-contex signalling. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* **350**, 87-93.

Pepper, A., Delaney, T., Washburn, T., Poole, D., y Chory, J. (1994). *DET1*, a negative regulator of light-mediated development and gene expression in *Arabidopsis*, encodes a novel nuclear-localized protein. *Cell* **78**, 109-116.

Petrov, P. y Vizir, I.Y. (1982). Inheritance of pleiotropic effects in *Arabidopsis thaliana*. *Dokl. Akad. Nauk. Ukr. SSR Ser. B* **6**, 68-71.

Poethig, R.S. (1987). Clonal analysis of cell lineage patterns in plant development. *Am. J. Bot*. **74**, 581-594.

Poethig, R.S. (1988). Heterochronic mutations affecting shoot development in maize. *Genetics* **119**, 959-973.

Poethig, R.S. (1997). Leaf morphogenesis in flowering plants. *Plant Cell* **9**, 1077-1087.

Poethig, R.S., y Sussex, I.M. (1985a). The developmental morphology and growth dynamics of the tobacco leaf. *Planta* **165**, 158-169.

Poethig, R.S., y Sussex, I.M. (1985b). The cellular parameters of leaf development in tobacco: a clonal analysis. *Planta* **165**, 170-184.

Poethig, R.S., y Szymkowiak, E.J. (1995). Clonal analysis of leaf development in maize. *Maydica* **40**, 67-79.

Ponce Molet, M.R. (1996). Aislamiento y caracterización molecular de genes de la superfamilia del TGF-ß que se expresan en el embrión de *Strongylocentrotus purpuratus*. Tesis doctoral. Universidad de Alicante.

Pruitt, R.E., y Meyerowitz, E.M. (1986). Characterization of the genome of *Arabidopsis thaliana*. *J. Mol. Biol.* **187**, 169-183.

Putterill, J., Robson, F., Lee, K., Simon, R., y Coupland, G. (1995). The *CONSTANTS* gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell* **80**, 847-858.

Pyke, K.A., Marrison, J.L., y Leech, R.M. (1991). Temporal and spatial development of the cells of the expanding first leaf of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *J. Exp. Bot.* **42**, 1407-1416.

Quail, P.H. (1991). Phytochrome: a light-activated molecular switch tha regulates plant gene expression. *Annu. Rev. Genet*. **25**, 389-409.

Ramachandran, S., Hiratsuka, K., y Chua, N.H. (1994). Transcription factors in plants growth and development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **4**, 642-646.

Rédei, G.P. (1962). Single locus heterosis. *Z.Vererbungs*. **93**, 164-170.

Rédei, G.P. (1970). *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. A review of the genetics and biology. *Bibliogr. Genet.* **20**, 1-151.

Rédei, G. P. (1975). *Arabidopsis* as a genetic tool. *Annu. Rev. Gen.* **9**, 111-127.

Rédei, G.P., e Hirono, Y. (1964). Linkage studies. *Arabid. Inf. Serv*. **1**, 9.

Rédei, G.P., y Koncz, C. (1992). Classical mutagenesis. En *Methods in* Arabidopsis research, pp. 16-82. Koncz, C., Chua, N.H., y Schell, J. (eds.). World Scientific, London.

Reed, J.W., Nagpal, P., Poole, D.S., Furuya, M., y Chory, J. (1993). Mutations in the gene for the red/far-red light receptor phytochrome B alter cell elongation and physiological responses throughout *Arabidopsis* development. *Plant Cell* **5**, 147-157.

Reed, J.W., Elumalai, R.P., y Chory, J. (1998). Supressors of an *Arabidopsis thaliana phyB* mutation identify genes that control light signaling and hypocotil elongation. Genetics **148**, 1295-1310.

Reinholz, E. (1947a) Roentgenmutationen bei *Arabidopsis thaliana* (L,) Heynh. *Naturwiss*. **34**, 26-28.

Reinholz, E. (1947b). X-Ray mutations in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. and their significance for plant breeding and the theory of evolution. *Fiat Rep*. **1006**, 1-70.

Reinholz, E. (1966). Radiation induced mutants showing changed inflorescence characteristics. *Arabid. Inf. Serv*. **3**, 19-20.

Reiter, R.S., Williams, J.G., Feldmann, K.A., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., y Scolnik, P.A. (1992). Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 1477-1481.

Relichova, J. (1976). Some new mutants. *Arabid. Inf. Serv*. **13**, 25-28.

Rerie, W.G., Feldmann, K.A., y Marks, M.D. (1994). The *GLABRA2* gene encodes a homeo domain protein required for normal trichome development in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **8**, 1388-1399.

Röbbelen, G. (1957). Über heterophyllie bei *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Ber. Dtsch. Bot. Ges*. **70**, 39-44.

Röbbelen, G. (1965). The LAIBACH standard colletion of natural races. *Arabid. Inf. Serv.* **2**, 36-47.

Röbbelen, G. (1971). Further data on the extent of outcrossing in *Arabidopsis*. *Arabid. Inf. Serv* **8**, 7.

Roe, J.L., Rivin, C.J., Sessions, R.A., Feldmann, K.A., y Zambryski, P.C. (1993). The *TOUSLED* gene in *Arabidopsis thaliana* encodes a protein kinase homolog that is required for leaf and flower development. *Cell* **75**, 939-950.

Ruffer-Turner, M., y Napp-Zinn, K. (1980). Investigations on leaf structure in several genotypes of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Arabid. Inf. Serv.* **16**, 94-98.

Running, M.P., y Meyerowitz, E.M. (1996). Mutations in the *PERIANTHIA* gene of *Arabidopsis* specifically alter floral organ number and initiation pattern. *Development* **122**, 1261-1269.

Sachs, J.V. (1890). *History of botany, 1530-1860*. Clarendon Press, Oxford.

Sachs, T. (1969). Regeneration experiments on the determination of the form of leaves. *Israel J. Bot*. **55**, 411-425.

Sachs, T. (1991). Pattern formation in plant tissues. P.W. Barlow, D. Bray, Green, P.B. y J.M.W. Slack (eds.). University Press, Cambridge.

Satina, S., Blakeslee, A.F., y Avery, A.G. (1940). Demonstration of the three germ layers in the shoot apex of *Datura* by means of induced popyploidy in periclinal chimeras. *Am. J. Bot*. **25**, 895-905.

Sattler, R., y Maier, U. (1977). Development of epiphyllous appendages of *Begonia hispida* var. *cucullifera*: Implications for comparative morphology. *Can. J. Bot*. **55**, 411-425.

Scheres, B., Wolkenfelt, H., Willemsen, V., Terlouw, M., Lawson, E., Dean, C., y Weisbeek, P. (1994). Embryonic origin of the *Arabidopsis* primary root and root meristem initials. *Development* **120**, 2475-2487.

Scheres, B., Di Laurenzio, L., Willemsen, V., Hauser, M.-T., Janmaat, K., Weisbeek, P., y Benfey, P.N. (1995). Mutations affecting the radial organization of the *Arabidopsis* root display specific defects throughout the embryonic axis. *Development* **121**, 53-62.

Scheres, B., McKhann, H., van den Berg, C., Willemsen, V., Wolkenfelt, H., de Vrieze, G., y Weisbeek, P. (1996). Experimental and genetic analysis of root development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Soil* **187**, 97-105.

Schiefelbein, J., y Somerville, C. (1990). Genetic control of root hair development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **2**, 235-243.

Schiefelbein, J., Ford, S.K., y Galway, M.E. (1993). Genetic analysis of root development. *Develop. Biol.* **4**, 23-30.

Schiefelbein, J.W., Masucci, J.D., y Wang, H. (1997). Building a root: the control of patterning and morphogenesis during root development. *Plant Cell* **9**, 1089-1098.

Schultz, E.A., y Haughn, G.W. (1991). *LEAFY*, a homeotic gene that regulates inflorescence development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **3**, 771-781.

Schultz, E.A., Pickett, F.B., y Haughn, G.W. (1991). The *FLO10* gene product regulates the expression domain of homeotic genes *AP3* and *PI* in *Arabidopsis* flowers. *Plant Cell* **3**, 1221-1237.

Schwarz-Sommer, S., Huijser, P., Nacken, W., Saedler, H., y Sommer, H. (1990). Genetic control of flower development by homeotic genes in *Antirrhinum majus*. *Science* **250**, 931-936.

Selker, J.M.L, y Lyndon, R.F. (1996). Leaf initiation and de novo pattern formation in the absence of an apical meristem and preexisting patterned leaves in watercress (*Nasturtium officinale*) axilary explants. *Can. J. Bot.* **74**, 625-641.

Shannon, S., y Meeks-Wagner, D.R. (1991). A mutation in the *Arabidopsis TFL1* gene affects inflorescence meristem development. *Plant Cell* **3**, 877-892.

Shevell, D.E., Leu, W.M., Gillmor, C.S., Xia, G., Feldmann, K.A., y Chua, N.H. (1994). *EMB30* is essential for normal cell division, cell expansion, and cell adhesion in *Arabidopsis* and encodes a protein that has similarity to Sec7. *Cell* **77**, 1051-1062.

Sinha, N., y Hake, S. (1990). Mutant characters of knotted maize leaves are determined in the innermost tissue layers. *Dev. Biol.* **141**, 203-210.

Sinha, N., Hake, S., y Freeling, M. (1993). Genetic and molecular analysis of leaf development. *Curr. Top. Dev. Biol.* **28**, 47-80.

Skinner, R.H., y Nelson, C.J. (1994). Epidermal cell division and the coordination of leaf and tiller development. *Ann. Bot*. **74**, 9-15.

Slack, J.M. (1994). *Xenopus* and other Amphibians. En *Embryos,* pp. 149-166. Bard, J. (ed.). Wolfe Publishing, Singapur.

Smith, L.G. (1996). What is the role of cell division in leaf development? *Semin. Cell. Dev. Biol*. **7**, 839-848.

Smith, L.G., y Hake, S. (1992). The initiation and determination of leaves. *Plant Cell* **4**, 1017-1027.

Smith, L.G., Greene, B., Veit, B., y Hake, S. (1992). A dominant mutation in the maize homeobox gene, *KNOTTED-1,* causes its ectopic expression in leaf cells with altered fates. *Development* **116**, 21-30.

Smith, L.G., y Hake, S. (1994). Molecular genetic approaches to leaf development: *Knotted* and beyond. *Can. J. Bot*. **72**, 617-625.

Smith, L.G., Hake, S., y Sylvester, A.W. (1996). The *tangled-1* mutation alters cell division orientations throughout maize leaf development without altering leaf shape. *Development* **122**, 481-489.

Sommer, J., Beltrán, J., Huijer, P., Pape, H., Lönning, W., Saedler, H., y Schwarz-Sommer, Z. (1990). *Deficiens*, a homeotic gene involved in the control of flower morphogenesis in *Antirrhinum majus*: the protein shows homology to transcription factors. *EMBO J*. **9**, 605-613.

Stearn, W.T. (1995). *Botanical latin*. David and Charles, Devon.

Steeves, T.A., y Sussex, I.M. (1989). *Patterns in plant development*. Cambridge University Press, New York.

Stewart, R.N., y Dermen, H. (1975). Flexibility in ontogeny as shown by the contribution of the shoot apical layers to leaves of periclinal chimeras. *Am. J. Bot*. **62**, 935-947.

Strasburger, E., Noll, F., Schenck, H., y Schimper, A.F.W. (1994). *Tratado de Botánica*. Ediciones Omega, Barcelona.

Sung Z.F., Belachew A., Shunong B., y Bertrand-García, R. (1992). *EMF,* an *Arabidopsis* gene required for vegetative shoot development. *Science* **258**, 1645-1647.

Sussex, I.M. (1955). Morphogenesis in *Solanum tuberosum* L.: Experimental investigation of leaf dorsiventrality and orientation in the juvenile shoot. *Phytomorphol.* **5**, 286-300.

Swope, K.L., Newman, T.C., Shoop, E., Bieganski, P., Chi, E., Holt, O., Carlis, J., Riedl, J., y Retzel, E.F. (1995). Everything you wanted to know about the University of Minnesota's analysis of *Arabidopsis* ESTs but were afraid to ask. *Weeds World* **2(ii)**, 21-26.

Sylvester, A.W., Smith, L, y Freeling, M. (1996). Acquisition of identity in the developing leaf. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. **12**, 257-304.

Szekeres, M., Németh, K., Koncz-Kalman, Z., Mathur, J., Kauschmann, A., Altmann, T., Rédei, G, Nagy, F., Schell, J., y Koncz, C. (1996). Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450 controlling cell elongation and de-etiolation in *Arabidopsis*. *Cell* **85**, 171-182.

Takahashi, T., Gasch, A., Nishizawa, N., y Chua, N.H. (1995). The *DIMINUTO* gene of *Arabidopsis* is involved in regulating cell elongation. *Genes Dev.* **9**, 97-107.

Talbert, P.B., Adler, H.T., Parks, D.W., y Comai, L. (1995). The *REVOLUTA* gene is necessary for apical meristem development and for limiting cell divisions in the leaves and stems of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **121**, 2723-2735.

Taylor, C.B. (1997). Plant vegetative development: from seed and embryo to shoot and root. *Plant Cell* **9**, 981-988.

Telfer, A., y Poethig, R.S. (1994). Leaf development in *Arabidopsis*. *Arabidopsis,* pp. 379-400. Meyerowitz, E.M., y Somerville, C.R. (eds.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Telfer, A., Bollman, K.M., y Poethig, R.S. (1997). Phase change and the regulation of trichome distribution in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **124**, 645-654.

Torres-Ruiz, R.A., y Jürgens, G. (1994). Mutations in the *FASS* gene uncouple pattern formation and morphogenesis in *Arabidopsis* development. *Development* **120**, 2967-2978.

Torres-Ruiz, R.A., Lohner, A., y Jürgens, G. (1996). The *GURKE* gene is required for normal organisation of the apical region in the *Arabidopsis* embryo. *Plant J.* **10**, 1005-1016.

Tröbner, W., Ramírez, L., Motte, P., Hue, I., Huijser, P., Lönning, W., Saedler, H., Sommer, H., y Schwartz-Sommer, Z. (1992). *GLOBOSA*: a homeotic gene which interacts with *DEFICIENS* in the control of *Antirrhinum* floral organogenesis. *EMBO J.* **11**, 4693-4704.

Tsay, Y.F., Schroeder, J.I., Feldmann, K.A., y Crawford, N.M. (1993). The herbicide sensitivity gene *CHL1* of *Arabidopsis* encodes a nitrate- inducible nitrate transporter. *Cell* **72**, 705-713.

Tsuchimoto, S., van der Krol, A.R., y Chua, N-H. (1993). Ectopic expression of *pMADS3* in transgenic petunia phenocopies the petunia blind mutant. *Plant Cell* **5**, 843-853.

Tsuge, T., Tsukaya, H., y Uchimiya, H. (1996). Two independent and polarized processes of cell elongation relate leaf blade expansion in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Development* **122**, 1589-1600.

Tsukaya, H. (1995). Developmental genetics of leaf morphogenesis in dicotyledoneous plants. *J. Plant Res*. **108**, 407-416.

Tsukaya, H., Naito, S., Rédei, G.P., y Komeda, Y. (1993). A new class of mutations in *Arabidopsis thaliana*, *acaulis1* affecting the development of both inflorescences and leaves. *Development* **118**, 751-764.

Tsukaya, H., Tsuge, T., y Uchimiya, H. (1994). The cotyledon: A superior system for studies of leaf development. *Planta* **195**, 309-312.

Tsukaya, H, Inaba-Higano, K., y Komeda, Y. (1995). Phenotypic characterization and molecular mapping of an *acaulis2* mutant of *Arabidopsis thaliana* with flower stalks of much reduced length. *Plant Cell Physiol*. **36**, 239-246.

Valvekens, D., van Montagu, M., y van Lijsebettens, M. (1988). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* root explants by using kanamycin selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 5536-5540.

van den Berg, C., Willemsen, V., Hage, W., Weisbeek, P., y Scheres, B. (1995). Cell fate in the *Arabidopsis* root meristem determined by directional signaling. *Nature* **378**, 62-65.

van Lijsebettens, M., Vanderhaeghen, R., De Block, M., Bauw, G., Villarroel, R., y van Montagu, M. (1994). An S18 ribosomal protein gene copy at the *Arabidopsis* PFL locus affects plant development by its specific expression in meristems. *EMBO J.* **13**, 3378-3388.

van Lijsebettens, M., y Clarke, J. (1998). Leaf development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol. Biochem*. **36**, 47-60.

Varios autores (1992). *Phage and the Origins of Molecular Biology. Expanded Edition.* Cairns, J., Stent, G.S., y Watson, J.D., (eds.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Varios autores (1995). Arabidopsis *Biological Resource Center. Seed and DNA Stock List*. The Ohio State University, Columbus.

Vollbrecht, E., Veit, B., Sinha, N., y Hake, S. (1991). The developmental gene *KNOTTED-1* is a member of a maize homeobox gene family. *Nature* **350**, 241-243.

Waites, R., y Hudson, A. (1995). *PHANTASTICA*: a gene required for dorsoventrality of leaves in *Antirrhinum majus*. *Development* **121**, 2143-2154.

Wei, N., y Deng, X.W. (1992). *COP9*: a new genetic locus involved in light-regulated development and gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **4**, 1507-1518.

Wei, N., Kwok, S.F., von Arnim, A.G., Lee, A., McNellis, T., Piekos, B., y Deng, X.W. (1994). *Arabidopsis COP8*, *COP10*, and *COP11* genes are involved in repression of photomorphogenic development in darkness. *Plant Cell* **6**, 629-643.

Weigel, D., Alvarez, J., Smyth, D.R., Yanofsky, M.F., y Meyerowitz, E.M. (1992). *LEAFY* controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell* **69**, 843-859.

Weigel, D., y Meyerowitz, E.M. (1994). The ABCs of floral homeotic genes. *Cell* **78**, 203-209.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., y Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*. **18**, 6531-6535.

Wilson, A., Pickett, F.B., Turner, J.C., y Estelle, M. (1990). A dominant mutation in *Arabidopsis* confers resistance to auxin, ethylene, and abscisic acid. *Mol. Gen. Genet*. **222**, 377-383.

Worsdell, W.C. (1905). Fasciation: Its meaning and origin. *New Phytol*. **4**, 55-74.

Yanofsky, M.F., Ma, H., Bowman, J.L., Drews, G.N., Feldmann, K.A., y Meyerowitz, E.M. (1990). The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *AGAMOUS* resembles transcription factors. *Nature* **346**, 35-39.

Young, J.P.W. (1983). Pea leaf morphogenesis: A simple model. *Ann. Bot*. **52**, 311-316.

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta tesis ha sido posible gracias a la concesión de una beca predoctoral de la Conselleria de Cultura, Educació i Ciència de la Generalitat Valenciana y a la financiación por la DGICYT y la DGES (proyectos PB91-0749, APC95-019 y PB95-0685) y la Generalitat Valenciana (Ayudas para Infraestructura en 1992 y 1994).

Esta Tesis no se hubiera podido llevar a término sin la generosidad de los miembros del Instituto de Neurociencias de la Universidad Miguel Hernández, cuyas instalaciones y equipos hemos utilizado sin cortapisa alguna.

A José Luis Micol por confiar en mí y permitir que me adentrara en este apasionante mundo de la Genética del Desarrollo.

A Joaquín de Juan por aceptar ser el tutor de mi Tesis Doctoral.

A todos los miembros de este laboratorio, por su ayuda, sus valiosos comentarios acerca de este manuscrito y por todos esos momentos compartidos, y en especial a Pedro, Victor, Héctor y Geno por esos otros “ratos” más divertidos.

A toda mi familia por su apoyo y confianza, y en especial a mis padres y suegros por estar “ahí” en todas las ocasiones en que necesité una mano.

A mi hermano Antonio por ayudarme en la edición electrónica de esta Tesis.

A Carmen, Inés y Alejandra por aportarme el estímulo que en ocasiones me faltó y por soportar mi escasez de tiempo hacia ellas.