



Miguel Hernández

Universidad Miguel Hernández de Elche

**Caracterización genética y molecular
de los mutantes *ultracurvata*
de *Arabidopsis thaliana***

José Manuel Pérez Pérez

Elche, 2003

**Caracterización genética y molecular
de los mutantes *ultracurvata*
de *Arabidopsis thaliana***



Trabajo realizado por el Licenciado José Manuel Pérez Pérez, en la División de Genética, Departamento de Biología Aplicada e Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández de Elche, para optar al Grado de Doctor.

Elche, 26 de mayo de 2003.

JOSÉ LUIS MICOL MOLINA, Catedrático de Genética de la Universidad Miguel Hernández de Elche, y

MARÍA ROSA PONCE MOLET, Profesora Titular de Genética de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

HACEMOS CONSTAR

que el presente trabajo ha sido realizado bajo nuestra dirección y recoge fielmente la labor realizada por el Licenciado José Manuel Pérez Pérez para optar al Grado de Doctor. Las investigaciones reflejadas en esta memoria se han desarrollado íntegramente en la División de Genética de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Elche, 26 de mayo de 2003.



**A mi familia:
los que están...
los que se fueron...**

A Cristina

*"El camino sigue y sigue desde la puerta.
El camino ha ido muy lejos, y que otros lo sigan si pueden.
Que ellos emprendan un nuevo viaje, pero yo al fin con pies fatigados
me volveré a la taberna iluminada, al encuentro del sueño y del reposo."*
J.R. Tolkien, en "El Señor de los Anillos: El retorno del Rey"

*"En el principio fue la palabra [...]
Y la palabra se hizo carne, y habitó entre nosotros."*
San Juan 1: 1, 14



*"Pensábamos que nuestro destino estaba en las estrellas.
Ahora sabemos que, en gran medida, nuestro destino está en nuestros genes."*
James Watson, en la revista *Time*, 20 de marzo de 1989

*"Per afrontar la vida no n'hi ha prou de tenir capacitat,
habilitat i intel·ligència... També cal ser valents i tenaços."*
Francesco Alberoni, en "Coratge!"

ÍNDICE DE MATERIAS

| | |
|--|----------|
| ÍNDICE DE FIGURAS | VII |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | XI |
| I.- INTRODUCCIÓN | 1 |
| I.1.- Consideraciones generales sobre la Biología del desarrollo..... | 1 |
| I.2.- Características diferenciales del desarrollo vegetal..... | 2 |
| I.3.- <i>Arabidopsis thaliana</i> como sistema modelo del desarrollo vegetal..... | 3 |
| I.3.1.- Singularidades de <i>Arabidopsis thaliana</i> | 5 |
| I.3.2.- Estructura corporal y ciclo de vida..... | 6 |
| I.3.3.- Anatomía y expresión del genoma..... | 8 |
| I.3.4.- Inducción y caracterización de mutantes | 11 |
| I.3.4.1.- Mutágenos | 11 |
| I.3.4.2.- Mutagénesis..... | 12 |
| I.3.4.3.- Cartografía génica | 12 |
| I.3.4.3.1.- Marcadores clásicos..... | 12 |
| I.3.4.3.2.- Marcadores moleculares..... | 13 |
| I.3.4.3.2.1.- Polimorfismos en la longitud de secuencias simples..... | 13 |
| I.3.4.3.2.2.- Secuencias polimórficas amplificadas y cortadas..... | 14 |
| I.3.4.3.2.3.- Polimorfismos de un solo nucleótido..... | 15 |
| I.4.- El desarrollo de la hoja | 15 |
| I.4.1.- Estructura del meristemo apical del tallo | 15 |
| I.4.2.- Genes implicados en el desarrollo del meristemo apical del tallo | 18 |
| I.4.3.- Estructura de la hoja..... | 23 |
| I.4.4.- Organogénesis foliar | 27 |
| I.4.5.- Disección genética del desarrollo de la hoja..... | 30 |
| I.4.5.1.- Especificación de la identidad del primordio foliar | 30 |
| I.4.5.2.- Establecimiento de la polaridad del órgano | 32 |
| I.4.5.3.- Control genético de la expansión de la hoja..... | 40 |
| I.4.5.3.1.- La expansión foliar | 40 |
| I.4.5.3.2.- Papel de los microtúbulos y la pared celular en el desarrollo de la hoja..... | 46 |
| I.4.5.3.3.- Los mecanismos de compensación de la proliferación celular | 47 |
| I.4.5.4.- La venación | 51 |
| I.4.5.5.- El cambio de fase | 52 |
| I.4.5.6.- Otros aspectos del desarrollo foliar..... | 54 |
| I.4.6.- Evolución de las hojas compuestas de las angiospermas..... | 56 |

| | |
|--|----|
| II.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS | 61 |
| III - MATERIALES Y MÉTODOS | 63 |
| III.1.- Pautas que se han seguido para la redacción de esta memoria | 63 |
| III.1.1.- Gramática y terminología..... | 63 |
| III.1.2.- Abreviaturas, acrónimos y fórmulas químicas..... | 63 |
| III.1.3.- Citas bibliográficas..... | 65 |
| III.2.- Nomenclatura para la denominación de genes, mutaciones y fenotipos | 65 |
| III.3.- Estirpes utilizadas en este trabajo | 66 |
| III.3.1.- Estirpes de <i>Arabidopsis thaliana</i> | 66 |
| III.3.1.1.- Estirpes silvestres | 66 |
| III.3.1.2.- Estirpes mutantes..... | 66 |
| III.3.2.- Estirpes bacterianas | 67 |
| III.3.3.- Conservación de estirpes..... | 68 |
| III.4.- Cultivos | 68 |
| III.4.1.- Condiciones de cultivo de <i>Arabidopsis thaliana</i> | 68 |
| III.4.1.1.- Cultivo en caja de Petri..... | 69 |
| III.4.1.2.- Cultivo en maceta | 69 |
| III.4.1.3.- Cruzamientos y recolección de semillas..... | 70 |
| III.4.1.4.- Control y erradicación de plagas | 71 |
| III.4.2.- Condiciones de los cultivos microbianos | 72 |
| III.5.- Disoluciones..... | 72 |
| III.5.1.- Medios de cultivo | 72 |
| III.5.1.1.- Medios de cultivo para <i>Arabidopsis thaliana</i> | 73 |
| III.5.1.1.1.- Medios de cultivo líquidos..... | 73 |
| III.5.1.1.2.- Medios de cultivo sólidos | 73 |
| III.5.1.1.3.- Medios de cultivo suplementados con hormonas | 74 |
| III.5.1.2.- Medios de cultivo para microorganismos..... | 75 |
| III.5.1.2.1.- Medios de cultivo líquidos..... | 75 |
| III.5.1.2.2.- Medios de cultivo sólidos | 75 |
| III.5.1.3.- Medios de cultivo suplementados con antibióticos | 76 |
| III.5.2.- Tampones y otras disoluciones de uso general | 76 |
| III.5.2.1.- Disoluciones para electroforesis..... | 76 |
| III.5.2.2.- Disoluciones para la purificación de ADN genómico | 77 |
| III.5.2.3.- Disoluciones para la purificación de ADN plasmídico | 77 |
| III.5.2.4.- Disoluciones para la obtención de células competentes..... | 77 |
| III.5.2.5.- Disoluciones para la transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i> | 77 |
| III.6.- Obtención y manipulación de ácidos nucleicos | 78 |
| III.6.1.- Aislamiento de ADN genómico de <i>Arabidopsis thaliana</i> | 78 |
| III.6.2.- Aislamiento de ADN plasmídico | 78 |
| III.6.3.- Aislamiento de ARN de <i>Arabidopsis thaliana</i> | 79 |
| III.6.4.- Restricción y ligación de ADN | 80 |

| | |
|---|----|
| III.7.- Síntesis de ADN | 80 |
| III.7.1.- Síntesis de oligonucleótidos | 80 |
| III.7.2.- Amplificaciones mediante PCR | 81 |
| III.7.3.- Retrotranscripción seguida de PCR (RT-PCR) | 82 |
| III.8.- Electroforesis de ácidos nucleicos | 83 |
| III.8.1.- Electroforesis en geles de poliacrilamida | 83 |
| III.8.2.- Electroforesis en geles de agarosa | 83 |
| III.8.3.- Electroforesis capilar | 84 |
| III.9.- Secuenciación y análisis de secuencias de ADN | 84 |
| III.9.1.- Reacciones de secuenciación | 84 |
| III.9.2.- Electroforesis y lectura automatizada de secuencias | 85 |
| III.9.3.- Análisis de secuencias de ADN y proteínas | 85 |
| III.9.3.1.- Ensamblaje y análisis de secuencias nucleotídicas | 85 |
| III.9.3.2.- Análisis de semejanzas y alineamiento múltiple de secuencias | 86 |
| III.10.- Análisis de Southern | 86 |
| III.10.1.- Transferencia de ADN a membranas | 86 |
| III.10.2.- Síntesis de sondas | 87 |
| III.10.3.- Hibridación | 88 |
| III.10.4.- Detección quimioluminiscente de ADN | 88 |
| III.11.- Construcción y transferencia de transgenes | 89 |
| III.12.- Transformaciones | 91 |
| III.12.1.- Transformación de células bacterianas | 91 |
| III.12.1.1.- Obtención de bacterias competentes | 91 |
| III.12.1.2.- Transformación por choque térmico | 92 |
| III.12.1.3.- Transformación por electroporación | 92 |
| III.12.1.4.- Selección de transformantes | 93 |
| III.12.2.- Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i> | 94 |
| III.12.2.1.- Infiltración con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 94 |
| III.12.2.2.- Selección de transformantes | 95 |
| III.13.- Cartografía génica | 95 |
| III.13.1.- Análisis del ligamiento a SSLP | 95 |
| III.13.1.1.- Amplificaciones mediante PCR múltiple | 96 |
| III.13.1.2.- Análisis de fragmentos | 96 |
| III.13.2.- Análisis del ligamiento a CAPS | 96 |
| III.13.3.- Análisis del ligamiento a SNP | 97 |
| III.13.4.- Estimación de distancias de mapa | 97 |
| III.14.- Análisis morfológico e histológico | 98 |
| III.14.1.- Observación microscópica y microfotografía a bajo aumento | 98 |
| III.14.2.- Preparación de muestras para microscopía óptica | 99 |

| | |
|---|------------|
| III.15.- Ensayos fisiológicos..... | 100 |
| III.15.1.- Ensayos de respuesta a la gravedad y la luz..... | 100 |
| III.15.1.1.- Respuesta gravitrópica de la raíz..... | 100 |
| III.15.1.2.- Respuesta fotomorfogénica..... | 100 |
| III.15.2.- Otros ensayos fisiológicos..... | 100 |
| III.16.- Pruebas estadísticas..... | 101 |
| IV.- RESULTADOS..... | 103 |
| IV.1.- Aislamiento y caracterización preliminar de los mutantes <i>ucu</i> | 103 |
| IV.1.1.- Alelos obtenidos en Tesis anteriores..... | 105 |
| IV.1.2.- Obtención de nuevos alelos <i>ucu2</i> | 105 |
| IV.1.3.- Relaciones alélicas entre las mutaciones <i>ucu1</i> | 107 |
| IV.2.- Caracterización fenotípica de los mutantes <i>ucu</i> | 108 |
| IV.2.1.- Arquitectura foliar..... | 108 |
| IV.2.1.1.- Expansión de las hojas vegetativas..... | 110 |
| IV.2.1.2.- Morfología de las hojas caulinares..... | 111 |
| IV.2.1.3.- Patrón de venación..... | 111 |
| IV.2.1.4.- Epidermis..... | 112 |
| IV.2.1.5.- Ultraestructura..... | 113 |
| IV.2.2.- Otros rasgos del fenotipo mutante..... | 115 |
| IV.2.2.1.- Estructura corporal..... | 115 |
| IV.2.2.2.- Alteraciones de la expansión celular..... | 116 |
| IV.2.2.3.- Gravitropismo y fotomorfogénesis..... | 116 |
| IV.2.2.4.- Crecimiento radicular..... | 118 |
| IV.2.2.5.- Estructura de la inflorescencia, fertilidad y desarrollo del fruto..... | 118 |
| IV.2.2.6.- Rotación helicoidal de los órganos de los mutantes <i>ucu2</i> | 119 |
| IV.2.3.- Ensayos fisiológicos..... | 119 |
| IV.2.3.1.- Efectos de las giberelinas, las citoquininas y el ácido abscísico..... | 120 |
| IV.2.3.2.- Efectos de las auxinas y de los inhibidores de su transporte..... | 121 |
| IV.2.3.3.- Respuesta a los brasinosteroides..... | 123 |
| IV.3.- Clonación posicional del gen <i>UCUI</i> | 124 |
| IV.3.1.- Cartografía de baja resolución..... | 125 |
| IV.3.2.- Cartografía de alta resolución..... | 129 |
| IV.3.2.1.- Obtención y ensayo de nuevos marcadores..... | 129 |
| IV.3.2.2.- Estudio de la región candidata..... | 134 |
| IV.3.2.2.1.- Análisis del ligamiento de <i>UCUI</i> a nuevos marcadores SNP..... | 136 |
| IV.3.2.2.2.- Secuenciación de la región candidata..... | 137 |
| IV.3.2.3.- Identificación y caracterización del gen <i>UCUI</i> | 138 |
| IV.3.2.3.1.- Estructura del gen <i>UCUI</i> | 138 |
| IV.3.2.3.2.- Filogenia molecular..... | 141 |
| IV.3.2.3.3.- Identificación de mutaciones..... | 144 |
| IV.3.2.3.4.- Análisis de la expresión del gen <i>UCUI</i> | 144 |
| IV.3.2.3.5.- Construcción y transferencia de transgenes..... | 147 |

| | |
|---|-----|
| IV.4.- Clonación posicional del gen <i>UCU2</i> | 149 |
| IV.4.1.- Cartografía de baja resolución..... | 149 |
| IV.4.2.- Cartografía de alta resolución | 153 |
| IV.4.2.1.- Obtención y ensayo de nuevos marcadores..... | 153 |
| IV.4.2.2.- Estudio de la región candidata..... | 155 |
| IV.4.2.2.1.- Secuenciación de genes candidatos | 155 |
| IV.4.2.2.2.- Identificación de mutaciones en la estirpe <i>ucu2-3</i> | 156 |
| IV.4.2.2.3.- Análisis de Southern de la región candidata..... | 159 |
| IV.4.2.2.4.- Análisis de la expresión de los genes candidatos | 162 |
| IV.4.2.3.- Caracterización del gen <i>UCU2</i> | 163 |
| IV.4.2.3.1.- Construcción y transferencia de transgenes..... | 167 |
| IV.4.2.3.2.- Aislamiento del mutante <i>ucu2-4</i> | 170 |
| IV.5.- Análisis de interacciones genéticas y de los efectos de dosis génicas | 172 |
| IV.5.1.- Obtención de triploides | 172 |
| IV.5.2.- Obtención de dobles mutantes..... | 173 |
| IV.5.2.1.- Análisis de las interacciones entre mutaciones <i>ucu</i> | 173 |
| IV.5.2.2.- Análisis de las interacciones con mutaciones que perturban la síntesis o la señalización hormonal | 176 |
| IV.5.2.2.1.- Los dobles mutantes <i>ucu dim</i> | 176 |
| IV.5.2.2.2.- Los dobles mutantes <i>ucul det2</i> | 179 |
| IV.5.2.2.3.- El doble mutante <i>ucul bri1</i> | 180 |
| IV.5.2.2.4.- Los dobles mutantes <i>ucul axr2</i> | 181 |
| IV.5.2.3.- Análisis de las interacciones con mutaciones que deforman la hoja | 184 |
| IV.5.2.3.1.- Los dobles mutantes <i>ucul icu</i> | 184 |
| IV.5.2.3.1.1.- Los dobles mutantes <i>ucul icu2</i> | 184 |
| IV.5.2.3.1.2.- Los dobles mutantes <i>ucul hst</i> | 186 |
| IV.5.2.3.1.3.- Los dobles mutantes <i>ucul icu5</i> | 187 |
| IV.5.2.3.1.4.- Los dobles mutantes <i>ucul icu6</i> | 189 |
| IV.5.2.3.1.5.- Los dobles mutantes <i>ucul ago1</i> | 190 |
| IV.5.2.3.2.- Los dobles mutantes <i>ucul tcu</i> y <i>ucul as2</i> | 191 |
| IV.5.2.3.2.1.- Los dobles mutantes <i>ucul tcu1</i> | 191 |
| IV.5.2.3.2.2.- Los dobles mutantes <i>ucul tcu2</i> | 193 |
| IV.5.2.3.2.3.- Los dobles mutantes <i>ucul tcu3</i> | 194 |
| IV.5.2.3.2.4.- El doble mutante <i>ucul as2</i> | 196 |
| V.- DISCUSIÓN | 197 |
| V.1.- Justificación de la metodología empleada en esta Tesis | 197 |
| V.2.- Aislamiento de los mutantes <i>ucu</i> | 197 |
| V.3.- Interpretación del fenotipo de los mutantes <i>ucu</i> | 198 |
| V.3.1.- El fenotipo de los mutantes <i>ucul</i> | 199 |
| V.3.2.- El fenotipo de los mutantes <i>ucu2</i> | 202 |
| V.4.- Naturaleza molecular del gen <i>UCU1</i> | 204 |
| V.5.- Naturaleza molecular del gen <i>UCU2</i> | 208 |

| | |
|--|------------|
| V.6.- Relación entre las rutas de señalización de las auxinas y los brasinosteroides | 209 |
| V.7.- Interpretación de las interacciones genéticas | 211 |
| V.7.1.- Relaciones entre las mutaciones <i>ucu</i> | 211 |
| V.7.2.- Interacciones con genes implicados en la señalización de los brasinosteroides | 212 |
| V.7.3.- Interacciones con genes implicados en la señalización de las auxinas | 212 |
| V.7.4.- Interacciones con otros genes | 215 |
| VI.- RESUMEN Y CONCLUSIONES | 217 |
| VII.- BIBLIOGRAFÍA..... | 221 |
| AGRADECIMIENTOS | 249 |



ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|-----|
| Figura 1.- Distribución geográfica de <i>Arabidopsis thaliana</i> | 4 |
| Figura 2.- Ciclo de vida de <i>Arabidopsis thaliana</i> | 7 |
| Figura 3.- Algunas conclusiones del análisis del genoma de <i>Arabidopsis thaliana</i> | 10 |
| Figura 4.- Algunas propiedades del meristemo apical del tallo | 16 |
| Figura 5.- Regulación de la expresión de <i>WUS</i> mediante los genes <i>CLV</i> en el meristemo apical del tallo | 22 |
| Figura 6.- Anatomía de la hoja de una planta C3 | 24 |
| Figura 7.- Células especializadas de la epidermis foliar de <i>Arabidopsis thaliana</i> | 25 |
| Figura 8.- Variación con el tiempo del patrón de venación de las hojas vegetativas del tercer nudo de la roseta basal del ecotipo <i>Ler</i> | 26 |
| Figura 9.- Estructura de la hoja del maíz | 27 |
| Figura 10.- Análisis clonal del desarrollo de la hoja | 28 |
| Figura 11.- Corte paradérmico de 1 μ m de grosor de la primera hoja de <i>Arabidopsis thaliana</i> | 30 |
| Figura 12.- Regulación de los genes <i>KNOX</i> y efectos fenotípicos de su expresión constitutiva | 32 |
| Figura 13.- Establecimiento de la identidad adaxial en las hojas de las angiospermas | 37 |
| Figura 14.- Presunto papel de los productos de los genes <i>AN</i> , <i>ROT3</i> y <i>ACLI</i> en la expansión de las células de la hoja en <i>Arabidopsis thaliana</i> | 41 |
| Figura 15.- División celular durante el desarrollo de la hoja en <i>Arabidopsis</i> <i>thaliana</i> | 48 |
| Figura 16.- Relación entre la morfología de las hojas, la de sus primordios y el patrón de expresión espacial de los genes <i>KNOX</i> de la clase I | 58 |
| Figura 17.- Vectores utilizados en esta Tesis para el rescate fenotípico de los mutantes <i>ucu</i> | 90 |
| Figura 18.- Fenotipo de los mutantes <i>ucu</i> | 104 |
| Figura 19.- Fenotipo foliar de los mutantes <i>ucu</i> | 108 |
| Figura 20.- Expansión de la tercera hoja de los mutantes <i>ucu</i> | 110 |
| Figura 21.- Hojas caulinares de los mutantes <i>ucu</i> | 111 |
| Figura 22.- Venación de los mutantes <i>ucu</i> | 112 |
| Figura 23.- Morfología de las células epidérmicas y del mesófilo en empalizada en los mutantes <i>ucu</i> | 113 |
| Figura 24.- Cortes transversales de hojas vegetativas del tercer nudo, realizados aproximadamente en el centro del limbo, de los mutantes <i>ucu</i> y su ancestro silvestre | 114 |
| Figura 25.- Morfología de la epidermis del hipocotilo de los mutantes <i>ucu1</i> | 116 |
| Figura 26.- Crecimiento de los mutantes <i>ucu</i> en la oscuridad | 117 |
| Figura 27.- Algunos rasgos morfológicos del fenotipo pleiotrópico de los mutantes <i>ucu</i> | 119 |
| Figura 28.- Rotación helicoidal en los órganos de los mutantes <i>ucu2</i> | 120 |

| | |
|--|-----|
| Figura 29.- Efectos de las auxinas sobre el crecimiento de la raíz en los mutantes <i>ucu</i> | 122 |
| Figura 30.- Efectos de los inhibidores del transporte de las auxinas sobre el crecimiento de los mutantes <i>ucu</i> | 123 |
| Figura 31.- Efectos del 24-epibrasinólido sobre el crecimiento de los mutantes <i>ucu</i> | 125 |
| Figura 32.- Cartografía de baja resolución del gen <i>UCU1</i> | 128 |
| Figura 33.- Cartografía de alta resolución del gen <i>UCU1</i> | 133 |
| Figura 34.- Electroforegrama obtenido tras la secuenciación parcial del gen <i>At4g18670</i> | 136 |
| Figura 35.- Identificación del gen <i>UCU1</i> | 139 |
| Figura 36.- Estructura y secuencia del gen <i>UCU1</i> | 141 |
| Figura 37.- Una hipótesis acerca de la relación filogenética entre algunos miembros representativos de la subfamilia SHAGGY/GSK3 de las quinasas | 142 |
| Figura 38.- Alineamiento múltiple de la región carboxi-terminal de varios miembros representativos de la subfamilia SHAGGY/GSK3 de las quinasas | 143 |
| Figura 39.- Naturaleza estructural de las mutaciones <i>ucul</i> | 145 |
| Figura 40.- Expresión del gen <i>UCU1</i> en los mutantes <i>ucul</i> | 146 |
| Figura 41.- Construcción de transgenes para el rescate fenotípico de los mutantes <i>ucul</i> | 147 |
| Figura 42.- Fenotipo de las plantas transgénicas portadoras de la construcción <i>pUCU1-04541</i> | 148 |
| Figura 43.- Cartografía de baja resolución del gen <i>UCU2</i> | 151 |
| Figura 44.- Cartografía de alta resolución del gen <i>UCU2</i> | 155 |
| Figura 45.- Estructura de la región candidata a contener a <i>UCU2</i> , que hemos secuenciado en el mutante <i>ucu2-3</i> y su ancestro silvestre Col-0..... | 158 |
| Figura 46.- Naturaleza estructural de la mutación <i>ucu2-3</i> | 158 |
| Figura 47.- Representación esquemática de la región candidata a contener a <i>UCU2</i> | 160 |
| Figura 48.- Análisis de Southern del ADN genómico de los mutantes <i>ucu2</i> y de la estirpe silvestre <i>Ler</i> , tras su digestión con <i>AccI</i> y <i>SacI</i> | 161 |
| Figura 49.- Análisis de la expresión del gen <i>At3g21640</i> en el mutante <i>ucu2-3</i> y su ancestro silvestre | 163 |
| Figura 50.- Estructura del gen <i>UCU2</i> y su producto proteico..... | 165 |
| Figura 51.- Una hipótesis acerca de la relación filogenética entre algunos miembros representativos de la subfamilia FKBP de las inmunofilinas..... | 166 |
| Figura 52.- Construcción de transgenes para el rescate fenotípico de los mutantes <i>ucu2</i> | 167 |
| Figura 53.- Comprobación de la integridad de las construcciones diseñadas para el rescate fenotípico de los mutantes <i>ucu2</i> | 169 |
| Figura 54.- Rescate fenotípico del mutante <i>ucu2-3</i> | 171 |

| | |
|---|-----|
| Figura 55.- Fenotipo de los triploides <i>UCU1/UCU1/ucu1</i> | 173 |
| Figura 56.- Fenotipo de los dobles mutantes <i>ucu1 ucu2</i> | 175 |
| Figura 57.- Fenotipo de los dobles mutantes <i>ucu1 det2, ucu1 dim-1 y ucu1 bri1</i> | 177 |
| Figura 58.- Fenotipo de los dobles mutantes <i>ucu1 axr2</i> | 182 |
| Figura 59.- Cuadro de Punnet de la autofecundación de una planta <i>ucu1-3/UCU1;axr2-1/AXR2-1</i> | 183 |
| Figura 60.- Fenotipo de los dobles mutantes <i>ucu1 icu2</i> | 185 |
| Figura 61.- Fenotipo de los dobles mutantes <i>ucu1 hst-5</i> | 186 |
| Figura 62.- Fenotipo de los dobles mutantes <i>ucu1 icu5 y ucu1 icu6</i> | 188 |
| Figura 63.- Fenotipo de los dobles mutantes <i>ucu1 ago1</i> | 190 |
| Figura 64.- Fenotipo de los dobles mutantes <i>ucu1 tcu1</i> | 192 |
| Figura 65.- Fenotipo de los dobles mutantes <i>ucu1 tcu2</i> | 194 |
| Figura 66.- Fenotipo de los dobles mutantes <i>ucu1 tcu3 y ucu1 as2</i> | 195 |



ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|-----|
| Tabla 1.- Algunos genes implicados en el desarrollo del meristemo apical del tallo y la especificación de los primordios | 19 |
| Tabla 2.- Algunos genes cuyas mutaciones perturban el establecimiento de la polaridad proximodistal o la dorsoventral | 34 |
| Tabla 3.- Algunos genes implicados en la expansión de la hoja | 43 |
| Tabla 4.- Algunos genes implicados en la organización del citoesqueleto y la síntesis de la pared celular | 44 |
| Tabla 5.- Algunos genes implicados en la proliferación celular y los mecanismos de compensación de la morfogénesis foliar | 45 |
| Tabla 6.- Mutantes aislados por autores anteriores, que se han empleado en los ensayos de alelismo y de interacciones genéticas..... | 66 |
| Tabla 7.- Mutantes obtenidos en el laboratorio de J.L. Micol que se han empleado en esta Tesis | 67 |
| Tabla 8.- Estirpes bacterianas utilizadas en este trabajo | 68 |
| Tabla 9.- Disoluciones empleadas en la detección quimioluminiscente de ADN..... | 89 |
| Tabla 10.- Oligonucleótidos empleados para la construcción de transgenes | 91 |
| Tabla 11.- Algunas características de los mutantes <i>ultracurvata</i> estudiados en este trabajo | 103 |
| Tabla 12.- Estudio del modo de herencia del fenotipo Ultracurvata | 106 |
| Tabla 13.- Segregación fenotípica en la progenie de los cruzamientos entre mutantes <i>ucu1</i> | 107 |
| Tabla 14.- Análisis morfométrico de las hojas vegetativas del primer nudo de los mutantes <i>ucu</i> | 109 |
| Tabla 15.- Análisis morfométrico de las hojas vegetativas del tercer nudo de los mutantes <i>ucu</i> | 109 |
| Tabla 16.- Algunos parámetros corporales en los homocigotos <i>ucu/ucu</i> | 115 |
| Tabla 17.- Cartografía de baja resolución del gen <i>UCUI</i> | 126 |
| Tabla 18.- Análisis del ligamiento del gen <i>UCUI</i> a microsatélites del cromosoma 4..... | 127 |
| Tabla 19.- Otros marcadores utilizados en la cartografía del gen <i>UCUI</i> | 127 |
| Tabla 20.- Marcadores desarrollados en esta Tesis para la cartografía de alta resolución del gen <i>UCUI</i> | 130 |
| Tabla 21.- Resultados de la cartografía de alta resolución del gen <i>UCUI</i> | 131 |
| Tabla 22.- Genotipado de recombinantes informativos con respecto a algunos marcadores del cromosoma 4 | 131 |
| Tabla 23.- Presuntos genes identificados en la región candidata a contener a <i>UCUI</i> | 132 |
| Tabla 24.- Polimorfismos encontrados tras la secuenciación de genes candidatos del clon F28A21 | 135 |
| Tabla 25.- Genotipado de los recombinantes informativos con respecto a algunos marcadores de la región genómica de F28A21..... | 137 |

| | |
|---|-----|
| Tabla 26.- Oligonucleótidos utilizados para la amplificación y ulterior secuenciación de segmentos solapantes de la región de 15 kb que contiene a <i>UCU1</i> | 138 |
| Tabla 27.- Segregación de la resistencia a kanamicina en la progenie de plantas transformadas por infección con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 149 |
| Tabla 28.- Cartografía de baja resolución del gen <i>UCU2</i> | 150 |
| Tabla 29.- Análisis del ligamiento del gen <i>UCU2</i> a microsatélites del cromosoma 3 | 151 |
| Tabla 30.- Marcadores desarrollados en esta Tesis para la cartografía de alta resolución del gen <i>UCU2</i> | 152 |
| Tabla 31.- Resultados de la cartografía de alta resolución del gen <i>UCU2</i> | 154 |
| Tabla 32.- Genotipado de recombinantes informativos con respecto a algunos marcadores del cromosoma 3 | 154 |
| Tabla 33.- Presuntos genes identificados en la región candidata a contener a <i>UCU2</i> | 156 |
| Tabla 34.- Oligonucleótidos utilizados para la amplificación y ulterior secuenciación de segmentos solapantes de la región candidata a contener a <i>UCU2</i> | 157 |
| Tabla 35.- Segregación de la resistencia a kanamicina en plantas transgénicas obtenidas para el rescate fenotípico de los mutantes <i>ucu2</i> | 170 |
| Tabla 36.- Segregación fenotípica en la progenie F ₂ de varios cruzamientos entre los mutantes <i>ucu1</i> y <i>ucu2</i> | 174 |
| Tabla 37.- Segregación fenotípica en la progenie F ₃ de varios cruzamientos entre los mutantes <i>ucu1</i> y <i>ucu2</i> | 175 |
| Tabla 38.- Segregación fenotípica en la progenie F ₂ de varios cruzamientos <i>ucu1/ucu1</i> × <i>dim-1/dim-1</i> | 178 |
| Tabla 39.- Segregación fenotípica en la progenie F ₃ de varios cruzamientos <i>ucu1/ucu1</i> × <i>dim-1/dim-1</i> | 178 |
| Tabla 40.- Segregación fenotípica en la progenie F ₂ de varios cruzamientos <i>ucu1/ucu1</i> × <i>det2-1/det2-1</i> | 179 |
| Tabla 41.- Segregación fenotípica en la progenie F ₃ de varios cruzamientos <i>ucu1/ucu1</i> × <i>det2-1/det2-1</i> | 179 |
| Tabla 42.- Segregación fenotípica en la progenie F ₂ de varios cruzamientos <i>BR11/bri1-1</i> × <i>ucu1-1/ucu1-1</i> | 181 |
| Tabla 43.- Segregación fenotípica en la progenie F ₂ de varios cruzamientos entre mutantes <i>ucu1</i> y <i>axr2</i> | 183 |
| Tabla 44.- Segregación fenotípica en la progenie F ₃ de varios cruzamientos entre mutantes <i>ucu1</i> y <i>axr2</i> | 183 |
| Tabla 45.- Segregación fenotípica en la progenie F ₂ y F ₃ de varios cruzamientos <i>icu2/icu2</i> × <i>ucu1-1/ucu1-1</i> | 185 |
| Tabla 46.- Segregación fenotípica en la progenie F ₂ y F ₃ de varios cruzamientos <i>hst-5/hst-5</i> × <i>ucu1-1/ucu1-1</i> | 187 |

| | |
|--|-----|
| Tabla 47.- Segregación fenotípica en la progenie F ₂ de varios cruzamientos <i>icu5/icu5 × ucu1-3/ucu1-3</i> | 189 |
| Tabla 48.- Segregación fenotípica en la progenie F ₂ de varios cruzamientos <i>ICU6/icu6 × ucu1-1/ucu1-1</i> | 189 |
| Tabla 49.- Segregación fenotípica en la progenie F ₂ y F ₃ de varios cruzamientos <i>ago1-51/ago1-51 × ucu1-1/ucu1-1</i> | 191 |
| Tabla 50.- Segregación fenotípica en la progenie F ₂ y F ₃ de varios cruzamientos <i>tcul-1a/tcul-1a × ucu1-2/ucu1-2</i> | 192 |
| Tabla 51.- Segregación fenotípica en la progenie F ₂ y F ₃ de varios cruzamientos <i>ucu1-3/ucu1-3 × tcul-1a/tcul-1a</i> | 193 |
| Tabla 52.- Segregación fenotípica en la progenie F ₂ y F ₃ de varios cruzamientos <i>tcu2-1b/tcu2-1b × ucu1-1/ucu1-1</i> | 194 |
| Tabla 53.- Segregación fenotípica en la progenie F ₂ y F ₃ de varios cruzamientos <i>tcu3-1a/tcu3-1a × ucu1-2/ucu1-2</i> | 195 |





I.- INTRODUCCIÓN

I.- INTRODUCCIÓN

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

Los organismos multicelulares alcanzan su forma y tamaño definitivos mediante un proceso de cambio progresivo denominado desarrollo, que convierte al cigoto, una entidad unicelular, en el organismo adulto. La ciencia que estudia este proceso se denomina Biología del desarrollo (Gilbert, 2000). Uno de los primeros análisis formales del desarrollo fue llevado a cabo por el filósofo griego Aristóteles, cuyas ideas acerca de la organización de los seres vivos fueron consideradas válidas hasta bien entrado el siglo XVI (véase Müller, 1997). Durante los tres siglos siguientes, la Biología del desarrollo se basó casi exclusivamente en la Embriología descriptiva y la Anatomía comparada, cuyos enfoques resultaban insuficientes para explicar los mecanismos que gobiernan la ontogenia. Los experimentos realizados con embriones de *Xenopus* (Roux, 1887) y de erizo de mar (Driesch, 1898) constituyeron los primeros intentos de manipulación experimental de la embriogénesis llevados a cabo con el objetivo de abordar su análisis causal. Nació así a finales del siglo XIX la Embriología experimental o “Mecánica del desarrollo”, cuyo objetivo era la identificación de las fuerzas motrices del desarrollo (Campos-Ortega, 1994).

El objetivo fundamental del análisis causal del desarrollo es, en nuestros días, la identificación y caracterización de los genes que lo controlan. Es por eso que la Genética del desarrollo constituye la base de la Biología del desarrollo contemporánea (García-Bellido, 1987). La Genética del desarrollo, que nació como resultado de la confluencia entre la Embriología experimental y la Genética, se basa en el postulado de que los productos génicos son responsables de la morfología de los seres vivos y de su diversidad en el planeta (García-Bellido, 1986; Campos-Ortega, 1994). La inducción, el aislamiento y la caracterización de mutantes morfológicos han constituido durante varias décadas las principales herramientas de trabajo de esta disciplina, ya que permiten obtener numerosas variantes e inferir la función de los genes correspondientes en base al análisis de los fenotipos causados por la ausencia, la insuficiencia o la presencia ectópica de un producto génico (Wilkins, 1993). El enfoque genético se ha aplicado con éxito a la disección de numerosas facetas del desarrollo animal, en organismos tales como la mosca *Drosophila melanogaster* (St Johnston, 2002), el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Jorgensen y Mango, 2002) y el pez cebra (*Danio rerio*; Grunwald y Eisen, 2002).

I.2.- Características diferenciales del desarrollo vegetal

A lo largo de los dos últimos siglos, la gran mayoría de los análisis del desarrollo se han llevado a cabo en animales. Algunos conceptos clave de la Biología del desarrollo, como los de determinación, diferenciación, totipotencia celular y formación de patrones, tienen su origen en estudios de la ontogenia animal. No se pueden ignorar, sin embargo, investigaciones pioneras realizadas en especies vegetales que han contribuido también a establecer algunos de los fundamentos de la Biología del desarrollo moderna, como 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 definición de las etapas de la mitosis (Strasburger, 1884) (citados todos ellos en Meyerowitz, 1994a, quien lo hace a su vez a partir de Sachs, 1890, y Bower, 1935).

Las plantas son indispensables en nuestra biosfera, dado que llevan a cabo la fijación de la energía solar mediante la fotosíntesis. El estudio de la Biología del desarrollo vegetal es valioso no sólo por su aplicación práctica para la mejora de las especies cultivadas, sino también por su contribución al conocimiento de los procesos que son específicos de las plantas y las diferencian de los animales (Meyerowitz y Pruitt, 1985).

Las células animales y las vegetales han evolucionado a partir del mismo conjunto inicial de genes, presente en su último ancestro común, un eucariota unicelular. Sin embargo, las plantas difieren de los animales en sus mecanismos de desarrollo (Alberts *et al.*, 1994; Meyerowitz, 1994a), tal como se indica a continuación. En primer lugar, las plantas son organismos estructuralmente simples, ya que cuentan con unos 40 tipos celulares distintos, frente a los más de 100 que pueden encontrarse en los animales (Lyndon *et al.*, 1990; Howell, 1998a). Otra diferencia estructural importante entre las células vegetales y animales la constituye la pared celular. Dada la rigidez de su pared, las células vegetales se ven forzadas a permanecer junto a sus progenitoras, lo que impide las migraciones y los movimientos celulares que son característicos de la embriogénesis animal. Se asume generalmente que los contribuyentes fundamentales a la morfogénesis de las plantas son el control de la división y la expansión celular (Meyerowitz, 1994a; Wolpert *et al.*, 1998), responsables en último término del crecimiento (Fosket, 1994), y la diferenciación dependiente de la posición (Meyerowitz, 1994a). La muerte celular programada también participa en la morfogénesis vegetal, aunque en menor medida que en el desarrollo animal. La inmovilidad de las plantas, por otra parte,

está asociada a una enorme plasticidad en su desarrollo, que les permite enfrentarse con éxito a las variaciones de su entorno.

Otra de las singularidades de las células vegetales, la presencia de los cloroplastos, determina que las plantas sean organismos fotosintéticos y autótrofos, lo que impone un plan corporal distinto del de los animales (Alberts *et al.*, 1994). Además, el desarrollo vegetal es, a diferencia del animal, un proceso fundamentalmente postembrionario, ya que durante la embriogénesis se conforma únicamente un plan corporal básico. Buena parte de la organogénesis ocurre posteriormente de manera reiterativa, a partir de los meristemas, formados por células permanentemente indiferenciadas (Sachs, 1991). La totipotencia que caracteriza a los meristemas puede manifestarse también en otros histotipos vegetales, que pueden desdiferenciarse y regenerar un individuo completo. Esta totipotencia de las células somáticas 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 meristemático indeterminado (Taylor, 1997).

1.3.- *Arabidopsis thaliana* como sistema modelo del desarrollo vegetal

Se denomina sistema 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 aplicables a otras especies (Bolker, 1995). La elección de sistemas modelo para el estudio del desarrollo se ha guiado tradicionalmente por criterios diversos, siendo comunes a la mayoría de ellos su pequeño tamaño, su ciclo de vida corto y su mantenimiento simple y económico en el laboratorio.

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. es una planta vascular, una angiosperma que pertenece a la clase de las Dicotiledóneas, a la subclase de las Dilénidas, al orden de las Caprales y a la familia de las Brasicáceas o Crucíferas. A esta familia pertenecen algunas especies de importancia económica, entre las que destacan 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* var. *arvensis*), especias como las mostazas blanca (*Sinapis alba*) y negra (*Brassica nigra*) y ornamentales como el alhelí (*Matthiola incana*) (Strasburger *et al.*, 1994). La Figura 1 recoge la distribución geográfica de esta especie cosmopolita, representándose los puntos en los que se han aislado estirpes silvestres de esta planta, que reciben el nombre de ecotipos (*ecotypes*) o entradas (*accessions*; Alonso-Blanco y Koornneef, 2000). Se

desconoce su origen geográfico exacto, aunque se ha sugerido que procede de Asia Central (Rédei, 1970) y que se ha extendido por las regiones de clima moderado del planeta a lo largo de los últimos 100.000 años (Meyerowitz, 1987; Innan *et al.*, 1997).

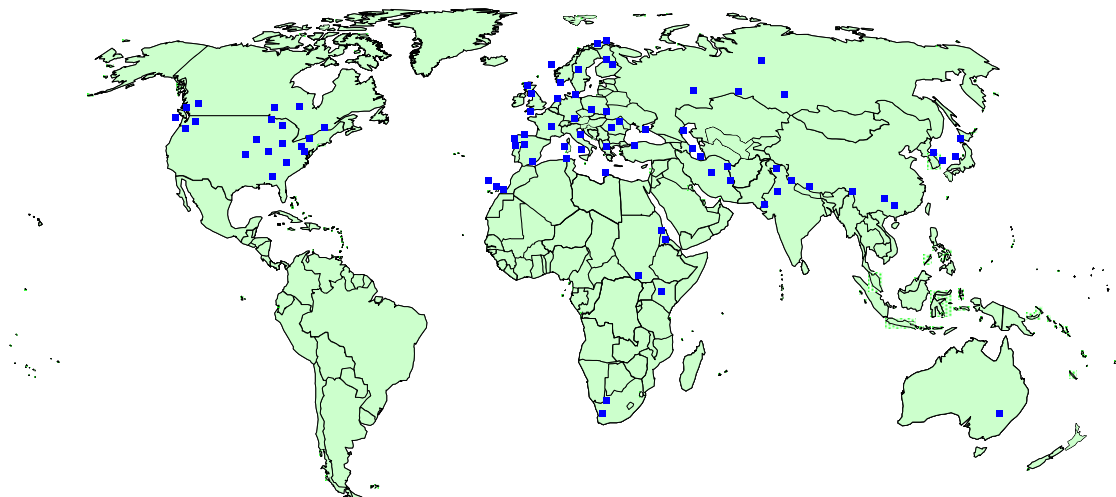


Figura 1.- Distribución geográfica de *Arabidopsis thaliana*. Los cuadrados azules indican los lugares en los que se han aislado plantas de esta especie. Reproducido, con pequeñas modificaciones, del mapa que puede hallarse en http://www.arabidopsis.org/geo_dist_map.html, que incluye pequeñas modificaciones a otro previo de Rédei, 1970.

Descrita por primera vez en el siglo XVI por Johannes Thal, quien la denominó *Pilosella siliquosa*, *Arabidopsis thaliana* comenzó a ser estudiada a principios del siglo XX por Friedrich Laibach, uno de los discípulos de Eduard Strasburger (Rédei y Li, 1968; Bowman, 1994). Sin embargo, esta especie no fue empleada en estudios de Genética clásica hasta que Laibach destacó su utilidad a mediados del siglo XX, llevando a cabo junto con Erna Reinholz una serie de experimentos de mutagénesis (Laibach, 1943; Reinholz, 1947a; 1947b) que sirvieron de base para el estudio de los efectos de las radiaciones ionizantes y los mutágenos químicos, entre las décadas de 1940 y 1970 (Smyth, 1990). De esta época datan también la demostración de que *Arabidopsis thaliana* puede ser cultivada en un medio de composición definida y el aislamiento del primer mutante termosensible y auxótrofo para la tiamina (Langridge, 1955).

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 George Rédei en 1975, no fue hasta finales de la década de los ochenta cuando esta planta se convirtió en uno de los organismos experimentales de elección preferente en Biología vegetal (Meyerowitz, 1994b). Desde entonces, numerosas revisiones han

destacado su idoneidad como sistema modelo para el análisis genético y del desarrollo de las plantas (Meyerowitz y Pruitt, 1985; Meyerowitz, 1987; Pang y Meyerowitz, 1987; Meyerowitz, 1989; Smyth, 1990; Dean, 1993; Langridge, 1994; Meinke *et al.*, 1998; Page y Grossniklaus, 2002; Somerville y Koornneef, 2002).

I.3.1.- Singularidades de *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana reúne una serie de características que la han convertido en el objeto de estudio por excelencia en la mayoría de los laboratorios dedicados a la biología experimental de las plantas (Meyerowitz, 1987). Una de ellas es su pequeño tamaño, unos 30 cm de altura, que permite siembras de hasta 10.000 plantas por metro cuadrado. Su ciclo de vida es corto, ya que se completa en unas 6 semanas cuando es cultivada a 25°C bajo iluminación continua, lo que hace posible la obtención de hasta 8 generaciones al año (Estelle y Somerville, 1986; Meyerowitz, 1987; 1989; Meinke *et al.*, 1998). Es una especie muy prolífica, capaz de producir 10.000 semillas por planta. El mantenimiento de estirpes no reviste dificultad alguna, ya que es autógena, autofecundándose sin intervención humana, y sus semillas pueden permanecer viables durante varios años a temperatura ambiente (Gómez-Campo, 1976).

La obtención y utilización de líneas recombinantes consanguíneas (RIL; *recombinant inbred lines*) para la cartografía de loci de caracteres cuantitativos (QTL; *quantitative trait loci*) es relativamente sencilla en *Arabidopsis thaliana*. Las RIL se establecen a partir de varios cientos de individuos F₂ que proceden de un cruzamiento entre dos estirpes polimórficas entre sí, tomando de cada uno de ellos una única semilla, proceso que se repite a lo largo de otras 6 generaciones sucesivas de autofecundación, con lo que se alcanza un grado de isogenia muy alto dentro de cada línea (Reiter *et al.*, 1992a; 1992b).

A pesar de las pequeñas dimensiones de su genoma haploide (véase el apartado I.3.3, en la página 8), unas 125 Mb (Meinke *et al.*, 1998; The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000; Bevan, 2001), *Arabidopsis thaliana* presenta las características típicas de otras angiospermas en lo referente a morfología, anatomía, crecimiento, desarrollo y respuestas al ambiente. En consecuencia, se ha aceptado durante más de una década que no había razones para pensar que *Arabidopsis thaliana* contase con menos genes que cualquiera de las 250.000 especies de plantas con flores que han aparecido en el planeta a lo largo de los últimos 150 millones de años (Meyerowitz, 1994b; Meinke *et al.*, 1998). Los resultados de la investigación en *Arabidopsis thaliana* se han considerado, por consiguiente, potencialmente aplicables a cualquier otra planta con flores. No obstante, el

análisis de dos versiones incompletas de la secuencia del genoma del arroz, recientemente publicadas, indica que su número de genes es casi el doble del de *Arabidopsis thaliana* (Goff *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2002).

Los procedimientos de la mutagénesis clásica, aplicados anteriormente a otros organismos modelo, han demostrado su eficacia en *Arabidopsis thaliana* para el abordaje de problemas biológicos de naturaleza muy diversa (véase el apartado I.3.4, en la página 11). Merece comentario adicional la disponibilidad de datos de ligamiento para cientos de genes, identificados a partir del aislamiento de mutantes (Meinke *et al.*, 2003). La cartografía génica (*gene mapping*) se ve facilitada en esta especie por la disponibilidad de mapas físicos y genéticos, que integran la información obtenida a partir del estudio de marcadores genéticos tanto clásicos como moleculares (véase el apartado I.3.4.3, en la página 12). Se han creado tres centros de conservación y distribución de estirpes y clones de ADN, uno en Europa (NASC; Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre; <http://nasc.nott.ac.uk/>), otro en Estados Unidos (ABRC; *Arabidopsis* Biological Resource Center; <http://www.arabidopsis.org/abrc/>) y el tercero en Japón (SASSC; The SENDAI *Arabidopsis* Seed Stock Center; <http://shigen.lab.nig.ac.jp/arabidopsis/>).

Cabe destacar también la existencia de varias colecciones de mutantes señalizados mediante el ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens*, que incluyen más de 200.000 mutaciones insercionales presuntamente nulas (Jander *et al.*, 2002), que facilitan el análisis de la función de los genes (Azpiroz-Leehan y Feldmann, 1997; Bent, 2000).

Es también digna de comentario la amplitud del repertorio de recursos informáticos disponibles para quienes estudian la biología de *Arabidopsis thaliana*, a los que se puede acceder a través de Internet, entre los que destaca una base de datos actualizada periódicamente, denominada TAIR (The *Arabidopsis* Information Resource; García-Hernández *et al.*, 2002), que contiene abundante información sobre genes, marcadores, polimorfismos, mapas genéticos y físicos, secuencias de ADN y rutas metabólicas, así como las publicaciones y los grupos de investigación relacionados con esta especie (<http://www.arabidopsis.org/>).

I.3.2.- Estructura corporal y ciclo de vida

En una planta adulta de *Arabidopsis thaliana* pueden distinguirse la raíz y una roseta de hojas vegetativas, de la que surgen un tallo principal y varios secundarios que, a su vez, pueden presentar ramificaciones. A partir de cada tallo se desarrollan las inflorescencias terminales y secundarias, todas ellas con varias flores arracimadas en su región apical (Figura 2).

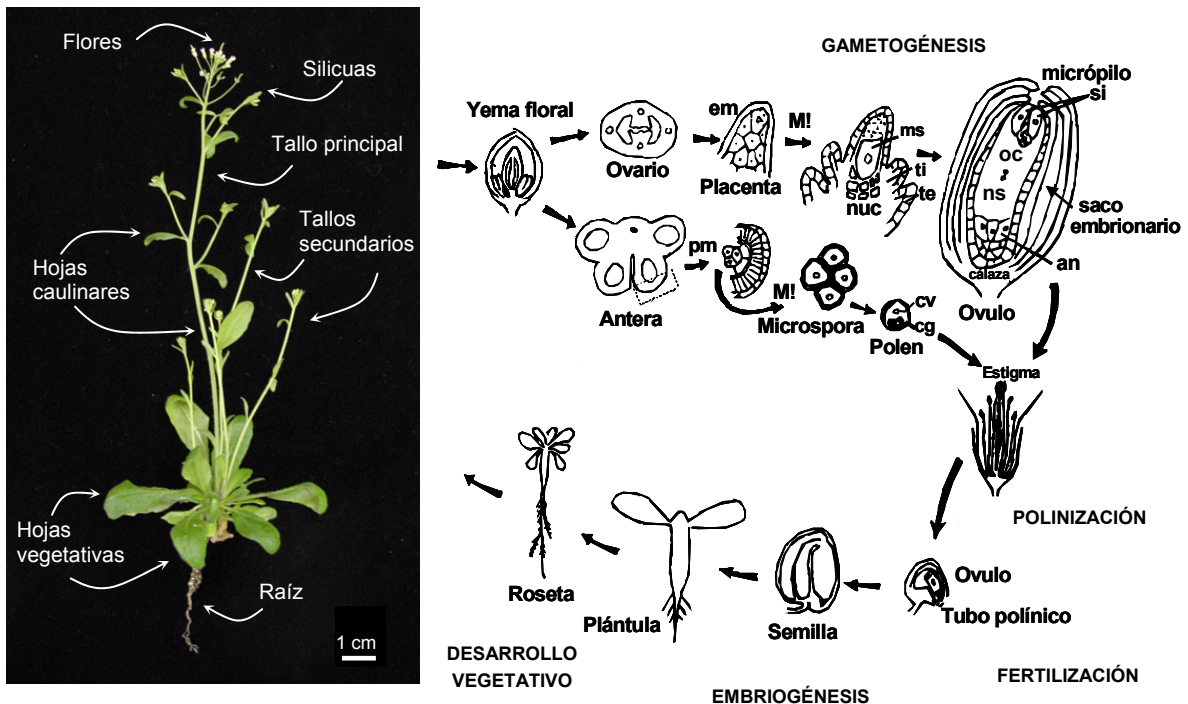


Figura 2.- Ciclo de vida de *Arabidopsis thaliana*. El significado de las abreviaturas es el siguiente: em, célula madre del saco embrionario; pm, célula madre del polen; ms, saco embrionario; ti, tegumento interno del saco embrionario; te, tegumento externo del saco embrionario; nuc, nucela; si, células sinérgidas; oc, ovocélula; ns, núcleo secundario; an, células antípodas; cv, célula vegetativa del polen; cg, célula generativa del polen; M!, meiosis. Adaptado a partir de Jürgens y Mayer (1994). La fotografía muestra una planta del ecotipo Enkheim-2, 30 días después la siembra.

Arabidopsis thaliana presenta el ciclo de vida característico de las plantas con flores, con alternancia entre generaciones gametofítica y esporofítica (Figura 2), en el que pueden distinguirse tres etapas: la gametogénesis, la embriogénesis y el desarrollo postembrionario, que se inicia con la germinación y finaliza al aparecer las flores (Jürgens y Mayer, 1994). La duración de cada una de estas etapas es de una, dos y tres semanas, respectivamente. Debe tenerse en cuenta, no obstante, que la duración del ciclo de vida de esta planta varía ampliamente entre ecotipos y en función de las condiciones ambientales (Rédei, 1970).

La generación esporofítica comienza con la formación de un cigoto diploide tras la fusión de los gametos en la fertilización. Se suceden entonces las distintas fases de la embriogénesis, que culminan con la formación de la semilla, que contiene al embrión maduro, que presenta las características básicas del plan corporal de la planta, como son la organización radial de los tejidos y el establecimiento de los elementos básicos del patrón apical-basal (los meristemas caulinar y radicular, el hipocotilo y los cotiledones).

Después de su liberación al medio y tras la exposición a unas condiciones ambientales apropiadas, las semillas germinan, se expanden los cotiledones y el meristemo radicular da lugar a la raíz principal. Se desarrollan a continuación a partir del meristemo apical del tallo las primeras hojas, que conforman la roseta basal, que da a la planta su aspecto característico durante la fase vegetativa de su ciclo de vida. Esta roseta, cuyo diámetro varía de 2 a 10 cm según la estirpe y las condiciones ambientales, se origina como consecuencia de la producción reiterada de hojas sin que se produzca elongación de los entrenudos.

La transición floral da fin al desarrollo vegetativo e inicia el reproductivo, que se caracteriza por la elongación de los entrenudos del tallo y la transformación del meristemo vegetativo en inflorescente, que producirá las flores y las hojas caulinares, que aparecen directamente sobre el tallo en posiciones superiores a la roseta. Las flores, de unos 2 mm, se autofecundan casi inmediatamente tras la antesis, dando lugar a un fruto alargado denominado silicua. Cada silicua contiene de 30 a 60 semillas de unos 0,5 mm de longitud, pudiendo obtenerse hasta 10.000 semillas por planta (Meinke *et al.*, 1998).

I.3.3.- Anatomía y expresión del genoma

El genoma haploide de *Arabidopsis thaliana*, que alcanza las 125 Mb (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000), es similar en tamaño a los de *Drosophila melanogaster* (180 Mb; Adams *et al.*, 2000) y *Caenorhabditis elegans* (97 Mb; The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998), y unas diez veces mayor que el de *Saccharomyces cerevisiae* (12 Mb; Goffeau *et al.*, 1996), aunque considerablemente menor que los de otras plantas con flores como el arroz (466 Mb; Goff *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2002), el maíz (2.500 Mb; Bennetzen, 2002), la cebada (4.900 Mb; Bennetzen, 2002), o el trigo (16.000 Mb; Adam, 2000). Cabe destacar que dentro de la familia de las crucíferas, a la que pertenece *Arabidopsis thaliana*, el genoma de la col (*Brassica oleracea*) alcanza unas 760 Mb, el de la mostaza (*Sinapis alba*) 490 Mb, y el de *Cardamine amara* es de sólo 49 Mb (Hall *et al.*, 2002).

La longitud del mapa genético de *Arabidopsis thaliana* es de unos 600 cM, cada uno de los cuales equivale a unas 210 kb. Se había estimado previamente a la secuenciación del genoma nuclear de *Arabidopsis thaliana* que debía contener un 10% de secuencias altamente repetitivas (4.000 a 6.000 copias) y otro 10% de las moderadamente repetitivas (10 a 1.000 copias, en su mayoría repeticiones en tándem de los genes del ARN ribosómico) (Leutwiler *et al.*, 1984; Pruitt y Meyerowitz, 1986; Meyerowitz, 1994c). El 80% restante incluiría prácticamente a todos los genes cuyos

productos son proteínas. En base a estas estimaciones indirectas se ha venido asumiendo que el genoma de *Arabidopsis thaliana* está casi desprovisto de elementos repetitivos y que los que existen están generalmente muy distanciados entre sí (Pruitt y Meyerowitz, 1986). La secuenciación íntegra de su genoma ha confirmado la escasez de ADN repetitivo, ya que sólo el 10% de su secuencia se relaciona en mayor o menor medida con los transposones (Bevan *et al.*, 2001), correspondiendo el 1% de su secuencia a los retrotransposones de la familia *copia-like* (Terol *et al.*, 2001). La mayor parte de estos elementos repetitivos, fundamentalmente microsatélites, retroelementos y transposones, están muy pobremente representados en la eucromatina y se concentran en las regiones pericentroméricas (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). En el genoma humano, por el contrario, este tipo de elementos suponen un 45% de su secuencia (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001).

Las estimaciones acerca del número y el tamaño de las moléculas de ARN mensajero (ARNm) en las plantas superiores oscilan entre los 15.000 transcritos distintos, con una longitud media de 1,2 kb en el perejil (*Petroselinum hortense*), hasta los 60.000, con un tamaño medio de 1,24 kb, en el tabaco (*Nicotiana tabacum*; Flavell, 1980; Kamalay y Goldberg, 1980). En el supuesto razonable de que el número de moléculas diferentes de ARNm en *Arabidopsis thaliana* se hallase 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 por cada 2 a 7 kb (Meyerowitz, 1994c). El análisis de la secuencia completa del genoma de *Arabidopsis thaliana* ha permitido confirmar esta hipótesis, ya que se han identificado 25.498 presuntos genes (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000), un valor sorprendentemente superior a los obtenidos tras la secuenciación de los genomas de *Drosophila melanogaster* (13.601; Adams *et al.*, 2000; Wigge y Weigel, 2001) y *Caenorhabditis elegans* (19.099; The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998; Wigge y Weigel, 2001) y no menos sorprendentemente cercano al de la especie humana, que se ha estimado que cuenta con poco más de 30.000 genes (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001; Venter *et al.*, 2001; Pennisi, 2003). Se han desarrollado iniciativas de secuenciación masiva de moléculas de ADNc (ADN complementario), las denominadas EST (*Expressed Sequence Tags*), habiéndose obtenido 178.538 en *Arabidopsis thaliana* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST_summary.html; Newman *et al.*, 1994; Swope *et al.*, 1995). El análisis de la secuencia del genoma de *Arabidopsis thaliana* ha revelado un 70% de redundancia génica, como consecuencia de dos poliploidizaciones presuntamente ocurridas hace 180 y 112 millones de años, y de numerosas duplicaciones locales (Figura 3A). Ambos fenómenos reducirían los casi

26.000 genes identificados en *Arabidopsis thaliana* a menos de 15.000 tipos diferentes, un valor cercano a los encontrados en *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster* (Walbot, 2000).

Entre los genes de *Arabidopsis thaliana* destacan, por su abundancia, los correspondientes a los canales hídricos, los transportadores de péptidos y las quinasas de proteínas (Figura 3B). El número de factores de transcripción identificados en *Arabidopsis thaliana* ha resultado ser más del doble de los encontrados en *Drosophila melanogaster* o *Caenorhabditis elegans*, lo que ha llevado a suponer que puede ser frecuente la participación de varios de ellos, estructuralmente similares, en un mismo proceso. De hecho, esto es lo que ocurre con la familia MADS, que cuenta con unos 80 miembros, implicados en procesos como la regulación de la identidad de los meristemos y de los órganos florales (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000; Jack, 2001).

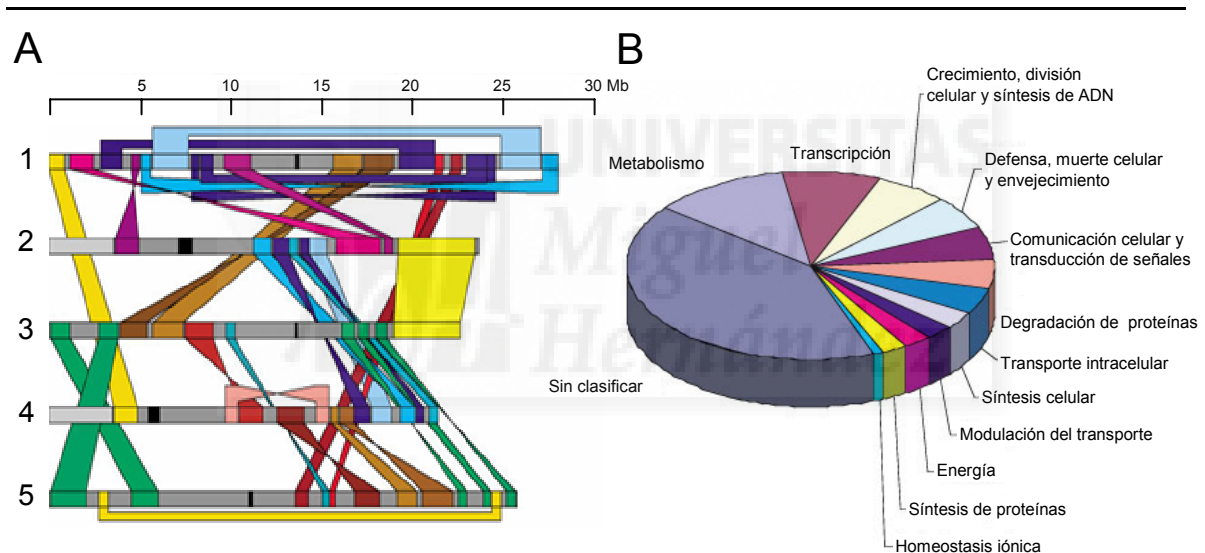


Figura 3.- Algunas conclusiones del análisis del genoma de *Arabidopsis thaliana*. (A) Regiones duplicadas en el genoma de *Arabidopsis thaliana*. Los cromosomas se representan mediante barras horizontales grises, destacándose los centrómeros en negro. Las bandas de cada color conectan los segmentos duplicados. (B) Análisis funcional de los genes predichos tras la secuenciación del genoma de *Arabidopsis thaliana*. Tomado, con pequeñas modificaciones, de The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000.

La secuencia nucleotídica íntegra del cromosoma de la mitocondria y el del cloroplasto de esta especie también está disponible. El genoma mitocondrial, cuyo tamaño es de 367 kb, contiene 58 genes, entre los que destacan aquellos cuyos productos están implicados en la cadena respiratoria, los que cifran proteínas ribosómicas y una dotación incompleta de los genes de los ARNt mitocondriales (Unsel

et al., 1997; Marienfeld *et al.*, 1999). El genoma del cloroplasto, de 155 kb, contiene 128 genes, de los que 87 corresponden a proteínas y el resto a ARN ribosómicos y transferentes (Sato *et al.*, 1999).

I.3.4.- Inducción y caracterización de mutantes

I.3.4.1.- Mutágenos

El metanosulfonato de etilo (EMS) es un agente alquilante que se ha utilizado frecuentemente como mutágeno químico en *Arabidopsis thaliana*. Este compuesto presenta una gran mutagenicidad asociada a una baja tasa de esterilidad o letalidad, e induce, en la mayoría de los casos, mutaciones puntuales (transiciones del tipo GC→AT) y, ocasionalmente, reorganizaciones cromosómicas (Rédei y Koncz, 1992), y parece acceder a la totalidad de las regiones del genoma, por lo que constituye la mejor elección para una mutagénesis de saturación (Feldmann *et al.*, 1994). Entre los mutágenos físicos frecuentemente empleados en *Arabidopsis thaliana* cabe destacar a los rayos X y los neutrones rápidos, que suelen inducir deleciones y otras aberraciones cromosómicas (Shirley *et al.*, 1992; Bruggemann *et al.*, 1996). Mientras que los alelos mutantes inducidos por las radiaciones ionizantes suelen ser nulos, la mayoría de los obtenidos por tratamiento con EMS son hipomorfos (Feldmann *et al.*, 1994). La clonación de estos últimos se ha llevado a cabo tradicionalmente mediante estrategias posicionales (*positional cloning*; véase el apartado I.3.4.3, en la página 12).

Aunque *Arabidopsis thaliana* cuenta con transposones endógenos (Peleman *et al.*, 1991; Tsay *et al.*, 1993), su eventual utilidad como mutágenos no ha sido establecida. Los sistemas de transposones heterólogos utilizados en *Arabidopsis thaliana* proceden del maíz: el *Ac/Ds* (*Activator/Dissociation*; Bancroft *et al.*, 1992) y el *En/I* (*Enhancer/Inhibitor*), también conocido como *Spm-dSpm* (*Supresor-mutator*, Aarts *et al.*, 1995). Sin embargo, el mutágeno insercional por excelencia es el ADN-T (*transfer DNA*; *T-DNA*), un segmento del plásmido Ti (*tumor inducer*; inductor de tumores) que se integra en el genoma nuclear de las plantas infectadas por la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*. Los primeros protocolos de transformación de *Arabidopsis thaliana* con vectores basados en el ADN-T se fundamentaban en la infección de semillas (Feldmann y Marks, 1987) o explantes de raíces (Valvekens *et al.*, 1988). El método más empleado actualmente consiste en la inmersión de plantas adultas en un cultivo de *Agrobacterium tumefaciens*, dentro de un recipiente sometido a vacío parcial (Bechtold *et al.*, 1993; 1998) o en presencia de un detergente (Clough y Bent, 1998; Bent, 2000).

I.3.4.2.- Mutagénesis

En *Arabidopsis thaliana*, las células y los individuos expuestos a los efectos de un mutágeno reciben la denominación de generación T_1 (en las mutagénesis con ADN-T) o M_1 (en los restantes casos). La autofecundación de las plantas M_1 y T_1 da lugar a los individuos denominados M_2 y T_2 , respectivamente. Las plantas M_1 presentan mosaicismo, ya que sólo una parte de sus células, las descendientes de aquélla que sufrió la mutación, son heterocigóticas para esta última. De las 15.000 a 20.000 células que contiene una semilla (Jürgens y Mayer, 1994), sólo entre 2 y 3 contribuyen a generar la parte aérea de la planta en la que se formarán los gametos, un valor que se denomina “número de células genéticamente efectivas” (Müller, 1965; Li y Rédei, 1969; Grinikh *et al.*, 1974; Grinikh y Shevchenko, 1976). Una célula M_1 genéticamente efectiva que haya sufrido una mutación será heterocigótica, al igual que las flores M_1 de las que sea precursora. En consecuencia, la mutación aparecerá en homocigosis en la cuarta parte de las semillas M_2 producidas por la flor heterocigótica. Puede estimarse la eficacia de una mutagénesis determinando la frecuencia de letales embrionarios y plántulas albinas, dos fenotipos de fácil escrutinio. Se consideran aceptables aquellas mutagénesis tras las que entre un 5 y un 10% de las plantas M_1 muestran en sus silicuas algún embrión letal, y al menos una de cada 250 plántulas M_2 es albina (Feldmann *et al.*, 1994).

Los individuos T_2 de *Arabidopsis thaliana* obtenidos a partir de una mutagénesis insercional con ADN-T son siempre heterocigóticos para las inserciones de éste, cuya integración en el genoma de la planta ocurre durante el desarrollo de los tejidos reproductivos femeninos de las flores (Ye *et al.*, 1999; Desfeux *et al.*, 2000). Por este motivo, las mutaciones recesivas permanecen en heterocigosis durante la generación T_2 y sus efectos fenotípicos se manifiestan en la generación T_3 y las siguientes.

I.3.4.3.- Cartografía génica

Una parte importante de la caracterización genética de una mutación es la determinación de su posición de mapa, que constituye un paso previo a la identificación del gen afectado, y se ve facilitada por la gran abundancia de marcadores en el mapa genético de *Arabidopsis thaliana*.

I.3.4.3.1.- Marcadores clásicos

Los primeros grupos de ligamiento establecidos en *Arabidopsis thaliana*, que fueron posteriormente asignados a cromosomas mediante análisis de estirpes trisómicas (Lee-Chen y Steinitz-Sears, 1967; Sears y Lee-Chen, 1970), incluían algunas mutaciones

morfológicas y otras metabólicas, que provocaban auxotrofia para ciertas sustancias (Rédei, 1962; Rédei y Hirono, 1964). Algunas de estas mutaciones dan lugar a fenotipos muy manifiestos y fueron las primeras en ser empleadas para el análisis de ligamiento en *Arabidopsis thaliana*, por lo que se les denomina “marcadores clásicos”. En esta modalidad de cartografía génica se cruza el mutante a estudio por líneas portadoras de marcadores clásicos de posición conocida, denominadas “estirpes marcadoras” (Koorneef y Stam, 1992). El estudio de la segregación fenotípica en la F₂ resultante de la autofecundación de la progenie F₁ del cruzamiento permite establecer las eventuales desviaciones, causadas por el ligamiento, de las proporciones mendelianas esperadas de un cruzamiento dihíbrido.

I.3.4.3.2.- Marcadores moleculares

Se denomina marcador molecular a cualquier polimorfismo en la secuencia del ADN que pueda ser visualizado para estudiar su eventual ligamiento a un locus dado. Los marcadores moleculares no interfieren entre sí y su espectro se ha visto ampliado recientemente como resultado de la secuenciación del genoma de *Arabidopsis thaliana* (Koorneef, 1994; The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). A diferencia de los marcadores clásicos, la mayoría de los marcadores moleculares son codominantes, lo que les confiere un alto valor informativo, al posibilitar la distinción de los tres genotipos posibles para un locus bialélico. La lógica de los cruzamientos necesarios para llevar a cabo un análisis del ligamiento a marcadores moleculares es esencialmente la misma que la utilizada para los clásicos, con la única salvedad de que la estirpe mutante a estudio debe ser cruzada por un ecotipo distinto de su ancestro silvestre, con el fin de que exista polimorfismo entre ambos.

Se describen a continuación los tres tipos de marcadores moleculares que han sido utilizados en esta Tesis, cuya visualización se consigue tras la amplificación de determinadas regiones del genoma de la planta mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; *Polymerase Chain Reaction*; Mullis *et al.*, 1986), seguida o no por la restricción de los productos obtenidos.

I.3.4.3.2.1.- Polimorfismos en la longitud de secuencias simples

La técnica de los polimorfismos en la longitud de secuencias simples (SSLP; *Simple Sequence Length Polymorphisms*) se basa en la existencia, en todos los genomas eucarióticos estudiados, de microsatélites, loci que incluyen repeticiones en tándem de una secuencia de menos de 6 pb (Litt y Luty, 1989). El polimorfismo de los microsatélites

es muy alto, principalmente por la variación en el número de las unidades que se repiten en tándem. Por este motivo, estos marcadores moleculares también reciben la denominación de repeticiones cortas en tándem (STR; *Short Tandem Repeats*; Edwards *et al.*, 1991).

Los SSLP se analizan amplificando mediante PCR la región que contiene al microsatélite, utilizando para ello oligonucleótidos complementarios a las secuencias que lo flanquean, y determinando posteriormente el tamaño de los productos de la amplificación en geles de agarosa o acrilamida. Los microsatélites, que han sido descritos fundamentalmente en intrones y en regiones próximas a los extremos 5' de algunas unidades de transcripción, fueron identificados por primera vez en algunos mamíferos (Litt y Luty, 1989; Smeets *et al.*, 1989; Tautz, 1989; Weber y May, 1989) y se han utilizado con profusión desde entonces para el análisis de ligamiento (Hearne *et al.*, 1992), razón por la cual existen mapas de estos marcadores para los genomas del hombre, la rata y el ratón, entre otros (Dietrich *et al.*, 1992; Hazan *et al.*, 1992; Serikawa *et al.*, 1992; Todd, 1992). Los genomas de las plantas también contienen microsatélites, que son tres veces más abundantes en las dicotiledóneas que en las monocotiledóneas (Schwarzacher, 1994). Mientras que en los genomas animales el microsatélite más frecuente y polimórfico es (GT)_n, en los vegetales es (AT)_n (Lagercrantz *et al.*, 1993). *Arabidopsis thaliana* fue la primera planta en la que se emplearon microsatélites para el análisis de ligamiento (Bell y Ecker, 1994). Estos autores identificaron 30 microsatélites, cuyo polimorfismo estudiaron en 6 ecotipos distintos, y determinaron sus posiciones de mapa. Se ha descrito más recientemente un procedimiento, basado en la amplificación simultánea de 21 microsatélites polimórficos mediante PCR múltiple, que hace posible una cartografía génica de alto rendimiento en *Arabidopsis thaliana* (Ponce *et al.*, 1999; Robles y Micol, 2001).

I.3.4.3.2.2.- Secuencias polimórficas amplificadas y cortadas

La técnica de las secuencias polimórficas amplificadas y cortadas (CAPS; *Cleaved Amplified Polymorphic Sequences*) se basa en la restricción de los productos de la amplificación mediante PCR de un locus de secuencia total o parcialmente conocida (Konieczny y Ausubel, 1993). Los polimorfismos que se detectan por este procedimiento, al igual que los denominados polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP; *Restriction Fragment Length Polymorphisms*; Botstein *et al.*, 1980; Wyman y White, 1980), corresponden a variaciones en la presencia de las dianas de restricción. Mientras que con la técnica de los RFLP se pueden detectar polimorfismos de restricción

en secuencias próximas, pero distintas, a la de la molécula que se emplea como sonda, la técnica de los CAPS requiere que el polimorfismo se encuentre en el interior de la molécula que se amplifica. Los CAPS son marcadores codominantes, habiéndose catalogado más de cien en *Arabidopsis thaliana* (<http://www.arabidopsis.org/aboutcaps.html>).

I.3.4.3.2.3.- Polimorfismos de un solo nucleótido

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP; *Single Nucleotide Polymorphisms*; Kruglyak, 1997) constituyen el grupo más amplio de variaciones en la secuencia del ADN en todos los organismos en los que han sido estudiados, entre ellos, *Arabidopsis thaliana* (Cho *et al.*, 1999). Un 30% de los SNP corresponde a dianas de restricción polimórficas que pueden usarse como CAPS. Se conocen 37.344 SNP, 18.579 inserciones y deleciones pequeñas (In/Del; *small insertions/deletions*) y 747 In/Del grandes entre los ecotipos Ler y Col, según se indica en la base de datos de Cereon (<http://www.arabidopsis.org/Cereon/>). Estos polimorfismos aparecen con una frecuencia que oscila de 5 a 85 SNP y de 5 a 60 In/Del pequeñas (Jander *et al.*, 2002) en cada inserto de ADN genómico clonado en vectores BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*; Choi *et al.*, 1995; Mozo *et al.*, 1998; 1999).

I.4.- El desarrollo de la hoja

I.4.1.- Estructura del meristemo apical del tallo

Durante la embriogénesis de las angiospermas se forman dos estructuras, una caulinar y otra radicular, en los extremos del eje apical-basal del embrión, compuestas por células indiferenciadas y totipotentes que mantienen su capacidad de dividirse durante todo el ciclo de vida de la planta. Estas estructuras, denominadas meristemas, dan lugar a todos los órganos adultos de las plantas, como las raíces, las hojas, los tallos y las flores (Figura 4A; Clark, 1997; Evans y Barton, 1997).

El meristemo apical del tallo origina todos los tallos y los órganos laterales a lo largo del crecimiento vegetativo de las plantas (revisado en Bowman y Eshed, 2000; Fletcher, 2002). Los primordios foliares surgen del meristemo apical del tallo siguiendo un patrón específico, denominado filotaxia, que es característico de cada especie (Steeves y Sussex, 1989; Figura 4B). En *Arabidopsis thaliana*, el meristemo apical del tallo tiene forma de montículo y un tamaño de 100 a 200 μm , propiedades que varían a lo largo de

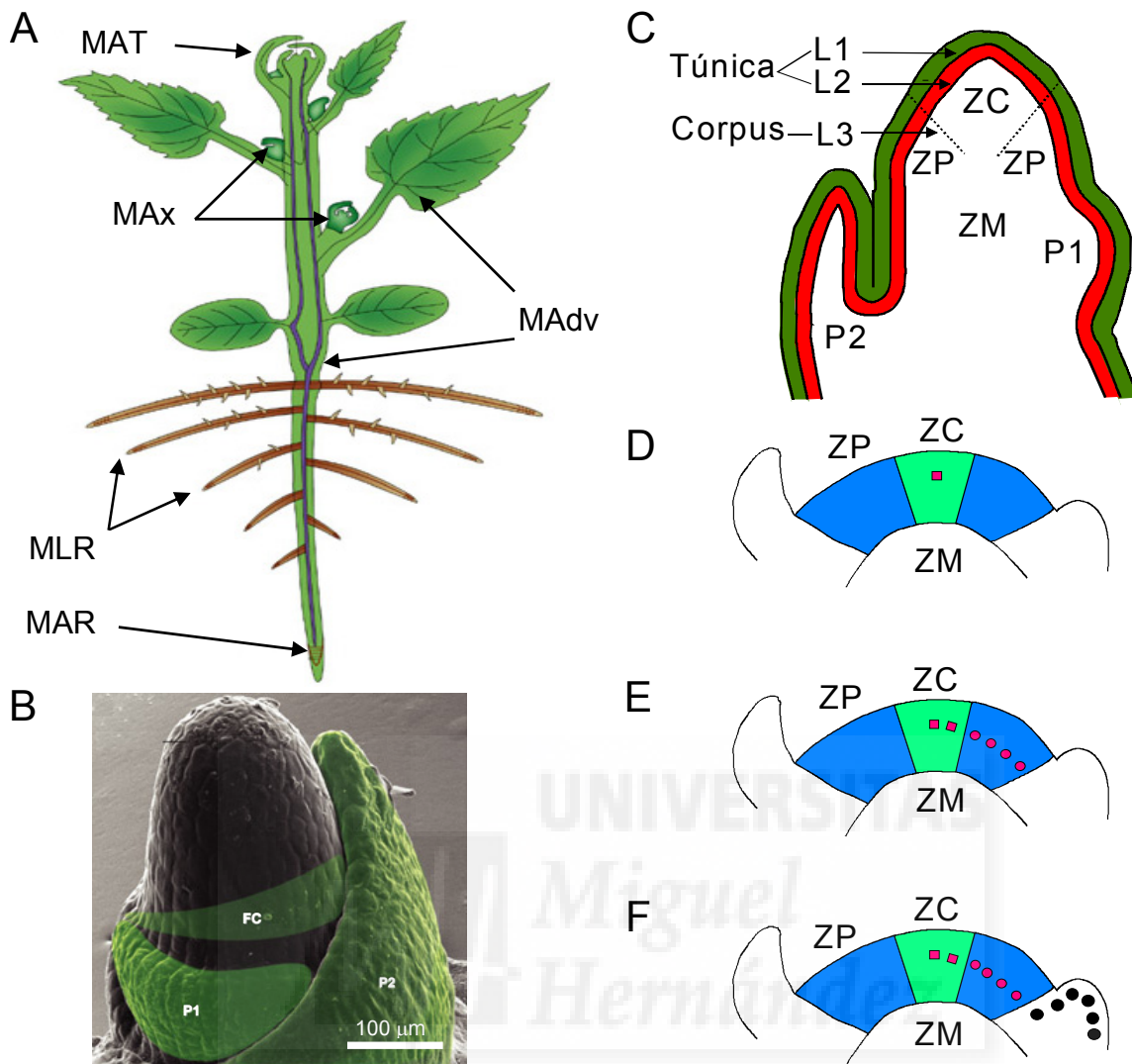


Figura 4.- Algunas propiedades del meristemo apical del tallo. (A) Representación de una angiosperma típica, con indicación de la situación de sus meristemas apicales. MAR: Meristemo apical radicular; MLR: Meristemo lateral radicular; MAT: Meristemo apical del tallo; MAx: Meristemo axilar; MAdv: Meristemo adventicio. (B) Micrografía de barrido del ápice del tallo de una planta de maíz, en la que se aprecian dos primordios foliares (P1 y P2) que emergen del meristemo. También se indica en verde la población de células fundadoras (FC) que originará el siguiente primordio. (C) Representación esquemática de la estructura del meristemo apical del tallo 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 Tsiantis y Hay, 2003 (A y B), Kerstetter y Hake, 1997 (C), y Clark, 1997 (D-F).

los periodos de tiempo que median entre la formación de dos hojas sucesivas, denominados plastocronos. Al final de un plastocrono y antes de la aparición de un primordio foliar morfológicamente diferenciado, el meristemo presenta su mayor tamaño, mientras que es mínimo al comienzo del siguiente (Medford *et al.*, 1994).

En el meristemo apical del tallo se distinguen dos regiones, denominadas túnica y corpus (Figura 4C; Satina *et al.*, 1940). En *Arabidopsis thaliana*, este meristemo consta de dos capas celulares externas (L1 y L2) que constituyen la túnica, y una multicelular más interna (L3) o corpus. Esta organización se debe a las diferencias en la orientación de las divisiones celulares. En la túnica, como consecuencia de que las divisiones celulares son casi exclusivamente anticlinales (con el plano de división perpendicular a la superficie del meristemo) se mantiene la estructura en capas de células que mantienen un linaje separado de las del corpus. Estas últimas están situadas inmediatamente debajo de la túnica y se dividen anticlinal, periclinal (con el plano de división paralelo a su 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 los órganos laterales (véase el apartado I.4.4, en la página 27), aunque ocasionalmente las células de una capa invaden la adyacente (Stewart y Dermen, 1975).

La estructura estratificada, en capas celulares, del meristemo apical del tallo debiera permitir predecir el destino de sus células. Sin embargo, los estudios de análisis clonal realizados con el fin de obtener mapas de destino en *Arabidopsis thaliana* han demostrado que existen muy pocas restricciones en cuanto al destino final de sus células, que está más determinado por su posición en el meristemo que por su linaje (Furner y Pumfrey, 1992; Irish y Sussex, 1992).

Por otra parte, en el meristemo apical del tallo mitóticamente activo se observan tres dominios citológicamente distinguibles, superpuestos a la estructura laminar descrita anteriormente (Figura 4C): (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 (ZM), debajo de la anterior, cuyas células se dividen rápidamente, formando los tejidos del tallo (Leyser y Furner, 1992).

El meristemo apical del tallo es una estructura muy dinámica, que experimenta constantemente división celular y organogénesis. Aunque su organización interna se mantiene prácticamente constante a lo largo del desarrollo vegetativo de la planta, la

posición de las células derivadas del meristemo cambia continuamente (Figura 4D-F; Clark, 1997). En *Arabidopsis thaliana*, el meristemo apical del tallo cambia su identidad al finalizar el desarrollo vegetativo. La transformación del meristemo vegetativo en inflorescente tiene como consecuencia el alargamiento de los entrenudos y la aparición de los tallos inflorescentes, en los que se generan las hojas caulinares y las flores (revisado en Levy y Dean, 1998; Piñeiro y Coupland, 1998; Simpson *et al.*, 1999; Simpson y Dean, 2002).

I.4.2.- Genes implicados en el desarrollo del meristemo apical del tallo

El meristemo apical del tallo se manifiesta tempranamente en el embrión, cuya región apical se divide progresivamente dando lugar a distintos dominios, cada uno de los cuales cuenta con patrones de expresión génica específicos (Sharma y Fletcher, 2002). En *Arabidopsis thaliana* se han descrito muchas mutaciones que alteran la formación del meristemo apical del tallo durante el desarrollo embrionario (Evans y Barton, 1997; Hudson y Goodrich, 1997; Barton, 1998; Laux y Mayer, 1998; y Lenhard y Laux, 1999; Traas y Doonan, 2001), como las que se describen a continuación y en la Tabla 1, algunas de las cuales perturban subsidiariamente el desarrollo foliar. Todas las mutaciones que se mencionan en esta Introducción son recesivas e hipomorfas, salvo que se indique lo contrario.

Para la iniciación del meristemo apical del tallo es imprescindible la actividad del gen *SHOOTMERISTEMLESS (STM)*, cuyo producto es un miembro de la clase I de la familia de las proteínas *KNOTTED* con homeodominio (Long *et al.*, 1996; véase el apartado I.4.5.1, en la página 30). A tal conclusión se ha llegado a partir de la observación de que los mutantes *stm/stm* carecen de meristemo apical del tallo y de que su desarrollo se interrumpe tras la expansión de los cotiledones (Barton y Poethig, 1993). *STM* inhibe la diferenciación de las células meristemáticas de la región central del meristemo (Long y Barton, 1998), mientras que en la periferia de éste impide el crecimiento de los primordios foliares, al reprimir a los genes de identidad foliar (Byrne *et al.*, 2000; véase el apartado I.4.5.1, en la página 30).

Otros dos genes necesarios para la iniciación del meristemo apical del tallo en el embrión son *CUP-SHAPED COTYLEDON1 (CUC1)* y *CUC2*. Son funcionalmente redundantes y muestran el mismo patrón de expresión, que se circunscribe a la región del meristemo apical embrionario en la que se produce división celular (Takada *et al.*, 2001). Sus dobles mutantes presentan los cotiledones fusionados y no desarrollan un meristemo apical embrionario funcional (Aida *et al.*, 1997). Se ha propuesto que su jerarquía es

Tabla 1.- Algunos genes implicados en el desarrollo del meristemo apical del tallo y la especificación de los primordios

| Gen ^a | Naturaleza del producto | Patrón de expresión espacial | Efectos fenotípicos de su insuficiencia | Función propuesta |
|--|---|--|---|---|
| <i>SHOOTMERISTEMLESS (STM)</i> ¹ | Proteína KNOTTED con homeodominio de la clase I | Meristemo apical del tallo embrionario, excepto en los primordios foliares | Ausencia del meristemo apical del tallo | Establecimiento de la identidad del meristemo apical del tallo embrionario |
| <i>CUP-SHAPED COTYLEDON1 (CUC1)</i> ² | Factores de transcripción | Meristemo apical del tallo embrionario | Los dobles mutantes <i>cuc1 cuc2</i> presentan los cotiledones fusionados y carecen de meristemo apical del tallo embrionario | |
| <i>CUC2</i> ³ | | Entre el meristemo y los primordios de los órganos laterales | | |
| <i>CLAVATA1 (CLV1)</i> ⁴ | Receptor extracelular LRR con actividad quinasa de serina y treonina | Células basales del meristemo apical del tallo, solapándose parcialmente con el dominio de expresión de CLV3 | Incremento del tamaño del meristemo apical del tallo, y del número de órganos laterales y tallos fasciados | Mantenimiento del estado indiferenciado de las células en el meristemo apical del tallo |
| <i>CLV2</i> ⁵ | Receptor extracelular de la familia LRR que carece de actividad quinasa | Toda la planta | | |
| <i>CLV3</i> ⁶ | Péptido pequeño, que actúa como ligando de CLV1-CLV2 | Células apicales de la región central del meristemo apical del tallo | | |
| <i>WUSCHEL (WUS)</i> ⁷ | Factor de transcripción con homeodominio | Centro organizador del meristemo apical del tallo | Interrupción prematura del crecimiento del meristemo apical del tallo | |
| <i>FASCIATA1 (FAS1)</i> ⁸ | Subunidades del complejo CAF-1 de ensamblaje de la cromatina | Meristemo apical del tallo | Tallos fasciados y hojas estrechas y dentadas | Mantenimiento del dominio de expresión de <i>WUS</i> |

^aVéase el pie de esta Tabla en la página siguiente.

Tabla 1 (continuación).- Algunos genes implicados en el desarrollo del meristemo apical del tallo y la especificación de los primordios

| Gen | Naturaleza del producto | Patrón de expresión | | Efectos fenotípicos de su | | Función propuesta |
|--|--|---------------------|---|--|-------------------------------------|---|
| | | espacial | Toda la planta | insuficiencia | expresión constitutiva | |
| POLTERGEIST (POL) ^{9, 10} | Subunidad 2C de una fosfatasa, aparentemente nuclear | | Toda la planta | Supresión del fenotipo de los mutantes <i>clv</i> | | Actúa de forma redundante con WUS en el mantenimiento del estado indiferenciado de las células del meristemo apical del tallo |
| ZWILLE (ZLL) ¹¹ | Proteína presuntamente implicada en el silenciamiento génico posttranscripcional | | Toda la planta | El crecimiento del meristemo apical del tallo se detiene prematuramente | | Mantenimiento de las células meristemáticas en un estado indiferenciado |
| KNOTTED1 (KN1) ¹² <i>Zea mays</i> | Proteína con homeodominio | | Meristemo apical del tallo, excepto en los primordios foliares | | Lobulación de las hojas | Mantenimiento de las células meristemáticas en un estado indiferenciado |
| KNAT1 ^{13, 14} | Proteína con homeodominio | | Meristemo apical del tallo, excepto en los primordios foliares | Pedicelos cortos y frutos orientados hacia el suelo | Lobulación de las hojas | |
| ASYMMETRIC LEAVES1 (AS1) ¹⁵ | Factor de transcripción MYB | | Primordios foliares y hojas. No se expresan en el meristemo apical del tallo. | Lobulación de las hojas y expresión ectópica de los genes <i>KNAT</i> en las hojas | | Establecimiento de la identidad del primordio, mediante la represión de los genes <i>KNOX</i> de la clase I |
| AS2 ^{16, 17} | Proteína con cremalleras de leucina | | | | Curvatura de las hojas hacia el haz | |
| LATERAL ORGAN BOUNDARIES (LOB) ¹⁸ | Proteína con cremalleras de leucina | | Dominio abaxial de los órganos laterales | Ninguno | Curvatura de las hojas hacia el haz | Identidad abaxial de las células en los primordios |

Todos los genes que se describen son de *Arabidopsis thaliana*, salvo que se indique lo contrario. La insuficiencia de función y la expresión constitutiva de estos genes se han estudiado, respectivamente, en mutantes y en plantas transgénicas. ¹Long *et al.* (1996); ²Takada *et al.* (2001); ³Ishida *et al.* (2000); ⁴Clark *et al.* (1997); ⁵Jeong *et al.* (1999); ⁶Fletcher *et al.* (1999); ⁷Mayer *et al.* (1998); ⁸Kaya *et al.* (2001); ⁹Laux *et al.* (1996); ¹⁰Yu *et al.* (2003); ¹¹Lynn *et al.* (1999); ¹²Smith *et al.* (1992); ¹³Chuck *et al.* (1996); ¹⁴Venglat *et al.* (2002); ¹⁵Byrne *et al.* (2000); ¹⁶Semiarti *et al.* (2001); ¹⁷Iwakawa *et al.* (2002); ¹⁸Shuai *et al.* (2002).

superior a la de *STM*, al que regulan indirectamente, y que su función es la de mantener una población de células indiferenciadas durante la formación del meristemo (Takada *et al.*, 2001). Los productos de los genes *CUC* son factores de transcripción homólogos entre sí que presentan un dominio amino-terminal que está conservado en varias especies vegetales (Aida *et al.*, 1997; Takada *et al.*, 2001).

Tras la iniciación del meristemo apical del tallo, el mantenimiento del estado indiferenciado de sus células a lo largo del desarrollo vegetativo parece depender de la ruta de transducción de señales de *CLAVATA* (revisado en Clark, 2001). En *Arabidopsis thaliana*, las mutaciones en los genes *CLAVATA1* (*CLV1*), *CLV2* y *CLV3* causan la acumulación de células meristemáticas en el meristemo apical del tallo, cuyo tamaño resulta mayor que el silvestre, y se produce un aumento en el número de los órganos laterales (Figura 5B). Los productos de estos tres genes son elementos de una ruta de señalización (Figura 5C; revisado en Clark, 2001). *CLV1* (Clark *et al.*, 1993) presenta actividad quinasa de serina y treonina y pertenece a la familia de los receptores extracelulares con repeticiones ricas en leucina (LRR; *Leucine Rich Repeat*; Clark *et al.*, 1997), que incluye al producto del gen *BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1* (*BRI1*), cuyas mutaciones causan insensibilidad a los brasinosteroides (Li y Chory, 1997; véase el apartado V.4 de la Discusión, en la página 204). *CLV2* es otro receptor extracelular LRR, que cuenta con un pequeño dominio citoplásmico que carece de actividad quinasa (Jeong *et al.*, 1999). Por su parte, *CLV3* es un pequeño polipéptido (Fletcher *et al.*, 1999) que actúa como ligando extracelular del complejo receptor formado por *CLV1* y *CLV2* (Trotochaud *et al.*, 2000). El complejo receptor *CLV1-CLV2*, que también incluye a *ROP*, una GTPasa de la subfamilia *RHO* (*RAS homolog gene family*) de proteínas de unión a GTP (Kahn *et al.*, 1992; Zheng y Yang, 2000), y una fosfatasa de proteínas asociada a quinasas (*KAPP*; *Kinase-Associated Protein Phosphatase*), radica en la membrana celular y transduce al núcleo la señal que recibe, presuntamente mediante varias fosforilaciones sucesivas (Trotochaud *et al.*, 1999), según se describe en la Figura 5C.

En las estirpes silvestres de *Arabidopsis thaliana*, el ARNm de *CLV3* se detecta únicamente en las células apicales del meristemo apical del tallo (Fletcher *et al.*, 1999), y el de *CLV1* sólo en las basales, en la capa L3 (Clark *et al.*, 1997), solapándose parcialmente ambos dominios de expresión (Figura 5A). Por su parte, el gen *CLV2* se expresa en todo el meristemo apical del tallo (Jeong *et al.*, 1999). La ruta de señalización de *CLV* está conservada al menos en especies como el arroz y el maíz, en las que se han identificado los ortólogos de los genes *CLV* (Kim *et al.*, 2000; Taguchi-Shiobara *et al.*, 2001).

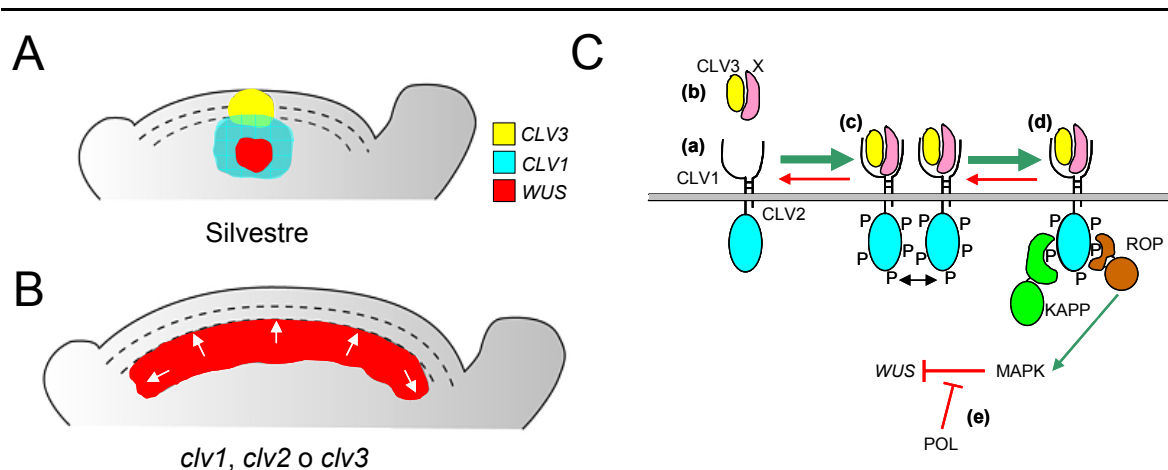


Figura 5.- Regulación de la expresión de *WUS* mediante los genes *CLV* en el meristemo apical del tallo. (A) Dominios de expresión de los genes *CLV3*, *CLV1* y *WUS* en el meristemo apical del tallo. (B) Las mutaciones *clavata* causan la desrepresión ectópica de *WUS* y el engrosamiento del meristemo. (C) Un modelo de la ruta de CLV. El complejo receptor CLV1-CLV2 (a) se une al ligando CLV3 (b), lo que conduce a la activación del receptor por fosforilación (c). El receptor activado se une a una fosfatasa asociada a quinasas (KAPP) y a la GTPasa RHO (ROP) (d). Mediante fosforilaciones mediadas por quinasas (MAPK), la señal se transduce al núcleo, en donde reprime la expresión de *WUS* (e). Tomado, con pequeñas modificaciones, de Clark, 2001.

El gen *WUSCHEL* (*WUS*), que cifra una proteína con homeodominio y cuyas mutaciones interrumpen la proliferación celular en el meristemo apical del tallo, también es necesario para el mantenimiento del estado indiferenciado de las células meristemáticas (Mayer *et al.*, 1998; Brand *et al.*, 2000; Schoof *et al.*, 2000). *WUS* se expresa en una región central del meristemo, que se denomina centro organizador (*organizing center*), situada inmediatamente debajo del dominio de expresión de *CLV3* (Figura 5A; Mayer *et al.*, 1998). El fenotipo del doble mutante *wus/wus;clv/clv* es similar al de los mutantes *wus/wus*, lo que indica la epistasia de *wus* sobre *clv*. En las plantas transgénicas en las que se expresa *CLV3* de forma constitutiva, que presentan un fenotipo similar al de los mutantes *wus/wus*, el gen *WUS* está reprimido (Brand *et al.*, 2000). Estos resultados sugieren que la ruta de CLV regula negativamente la expresión de *WUS* en las células del meristemo apical del tallo (Figura 5C; Schoof *et al.*, 2000). La activación del complejo CLV restringe la expresión de *WUS* al centro organizador, que actúa como reservorio de células meristemáticas indiferenciadas.

Al mantenimiento del dominio de expresión de *WUS* también contribuyen *FASCIATA1* (*FAS1*) y *FAS2*, que son componentes del complejo CAF-1 (*Chromatin Assembly Factor-1*), del que se supone que modula la transcripción de algunos genes mediante la modificación de la estructura de la cromatina (Kaya *et al.*, 2001). Las

mutaciones *fas* causan, en homocigosis, un fenotipo similar al de los mutantes *wus/wus*, interrumpiéndose prematuramente la proliferación celular en el meristemo apical del tallo (Laux *et al.*, 1996).

Los mutantes *poltergeist* (*pol*) fueron aislados en una búsqueda de supresores del fenotipo de las mutaciones *clv* (Yu *et al.*, 2000). El fenotipo de los dobles mutantes *pol/pol;wus/wus* es aditivo, lo que sugiere que *POL* actúa de forma redundante con *WUS* para el mantenimiento del estado indiferenciado de las células del meristemo apical del tallo. Estos resultados son coherentes con el papel represor de *POL* en la ruta de *CLV* (Figura 5C; Yu *et al.*, 2000). *POL* es una subunidad de una fosfatasa implicada en procesos de señalización intracelular (Yu *et al.*, 2003).

Las mutaciones en el gen *ZWILLE* (*ZLL*), también llamado *PINHEAD* (*PNH*; McConnell y Barton, 1995), impiden el crecimiento del meristemo apical del tallo casi inmediatamente después de la germinación. Se deriva de lo anterior que el gen *ZLL* es también necesario para el mantenimiento de las células meristemáticas en un estado indiferenciado (Moussian *et al.*, 1998). La proteína *ZLL* (Lynn *et al.*, 1999) pertenece a la familia *PAZ/Piwi*, muy conservada entre los eucariotas, cuyos miembros participan en procesos de regulación de la expresión génica mediante silenciamiento génico postranscripcional (Fagard *et al.*, 2000). A esta familia también pertenece el gen *ARGONAUTE1* (*AGO1*) de *Arabidopsis thaliana*, cuyas mutaciones perturban el desarrollo de la hoja, reprimiendo la expansión del limbo (Bohmert *et al.*, 1998; véase el apartado I.4.5.2, en la página 32). El gen *ZLL* se transcribe en etapas muy tempranas del desarrollo en el meristemo apical del tallo, en donde parece ser necesario para el mantenimiento de la expresión de *STM* (Lynn *et al.*, 1999).

I.4.3.- Estructura de la hoja

Las hojas son órganos laterales determinados (de crecimiento limitado) cuya función es producir, mediante la fotosíntesis, los hidratos de carbono que la planta utiliza como fuente de energía, un proceso del que depende la vida en el planeta. *Arabidopsis thaliana* cuenta con dos tipos de hojas: las de la roseta o vegetativas y las caulinares, que aparecen en los nudos basales de cada rama de la inflorescencia. En las hojas vegetativas se distinguen dos regiones diferenciadas a lo largo del eje proximodistal, que corresponden a las partes más próximas y más alejadas del tallo, que se denominan peciolo y limbo, respectivamente (Figura 6A), mientras que las caulinares carecen de peciolo. Las hojas de *Arabidopsis thaliana* son estructuras laminares que manifiestan asimetría dorsoventral, presentando dos caras con características distintas, una dorsal o

adaxial, el haz, y otra ventral o abaxial, el envés. A lo largo del tercer eje de la hoja, el mediolateral, pueden distinguirse dos partes relativamente simétricas, cada una de las cuales está delimitada por la vena primaria y el margen foliar (Byrne *et al.*, 2001).

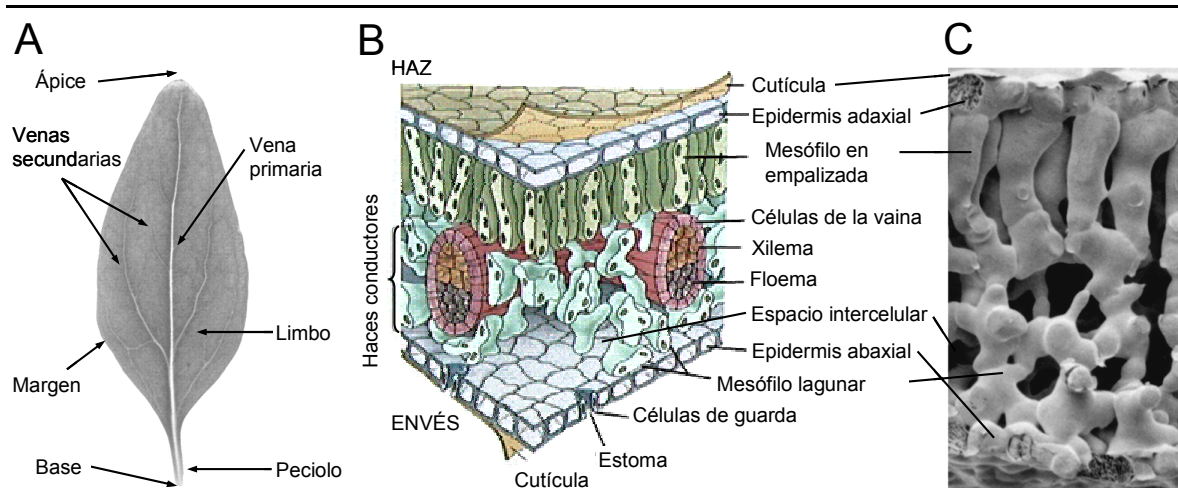


Figura 6.- Anatomía de la hoja de una planta C3. Se representan esquemáticamente las partes de una hoja simple (A) y su estructura interna (B, C). Las figuras se han tomado de Golz y Hudson, 2002 (A), Purves *et al.*, 1998 (B), y Martin *et al.*, 2001 (C).

La epidermis aísla a la planta de su entorno y regula el intercambio de sustancias con el exterior (Becraft, 1999). En la hoja de *Arabidopsis thaliana*, que presenta las características típicas de una planta C3, se distinguen la epidermis adaxial y la abaxial, que envuelven a otras cinco capas de tejidos internos (Figura 6B-C). La epidermis foliar de *Arabidopsis thaliana* está constituida por una única capa de células pavimentosas (*pavement cells*) de forma irregular, excepto en el pecíolo, en el margen del limbo y junto a la vena primaria, en donde son alargadas y estrechas. La superficie de la epidermis adaxial es relativamente lisa, mientras que la abaxial es rugosa y sus células son más pequeñas. El tamaño de las células pavimentosas de la epidermis varía en función de su nivel de ploidía, que oscila entre 2C y 16C (Melaragno *et al.*, 1993).

Las células que se encuentran inmediatamente debajo de la epidermis adaxial constituyen el mesófilo en empalizada, son alargadas y están densamente empaquetadas, de manera que se optimiza la captación de la luz necesaria para realizar la fotosíntesis. Entre esta capa y la epidermis abaxial existen otras cuatro de mesófilo lagunar o esponjoso, formado por células más pequeñas, de tamaños irregulares y separadas por amplios espacios intercelulares, lo que facilita la difusión de los gases. A

través del mesófilo esponjoso transcurren los haces vasculares, en los que el xilema ocupa una posición adaxial y el floema la abaxial (Figura 6B).

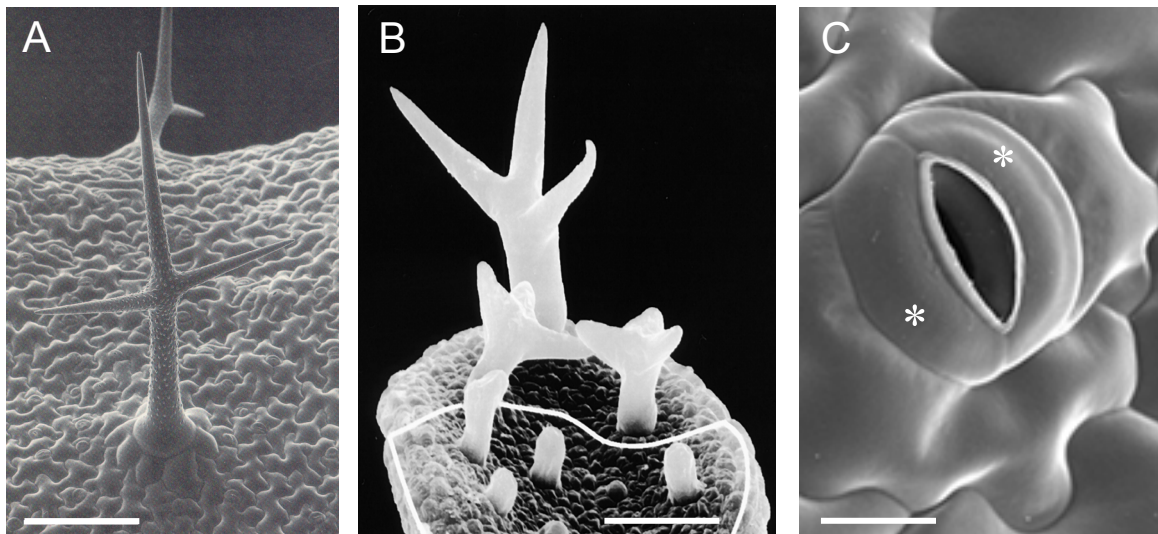


Figura 7.- Células especializadas de la epidermis foliar de *Arabidopsis thaliana*. (A) Un tricoma, rodeado de células pavimentosas de la epidermis. (B) Diferenciación basípeta de los tricomas en una hoja en expansión. (C) Un estoma, en el que se destacan con un asterisco las dos células oclusivas. Las barras de escala indican 100 (A) y 50 μm (B, C). Las figuras se han tomado de Bowman, 1994 (A), Schnittger *et al.*, 1999 (B), y Yang *et al.*, 2002 (C), con ligeras modificaciones.

Los tricomas son células epidérmicas especializadas que probablemente actúan como elementos protectores contra los insectos o reflectores del exceso de luz incidente (Johnson, 1975). Están formados por una única célula grande y polarizada que contiene un núcleo de gran tamaño, como consecuencia de las sucesivas rondas de endorreducción que sufre su ADN (Figura 7A; Hülskamp *et al.*, 1994). El extremo distal del tricoma se ramifica dando lugar a tres o cuatro brazos en la mayoría de los ecotipos de *Arabidopsis thaliana*. Los tricomas constituyen uno de los tipos celulares que más precozmente se diferencian a partir del primordio foliar, siguiendo un patrón basípeta en la hoja en expansión, ya que maduran antes los de la región apical del limbo que los de la basal (Figura 7B). El número de tricomas varía entre las diferentes hojas vegetativas de una misma planta, siendo menor en las dos primeras. En estas últimas, así como en la tercera, sólo aparecen tricomas en la epidermis adaxial (Van Lijsebettens y Clarke, 1998). Es éste uno de los rasgos de la heteroblastia que existe entre las hojas vegetativas de *Arabidopsis thaliana* (véase el apartado I.4.5.5, en la página 52), ya que las adultas presentan tricomas adaxiales y abaxiales pero las juveniles sólo los muestran en su epidermis adaxial (Telfer *et al.*, 1997). Por el contrario, todas las hojas caulinares

presentan tricomas abaxiales, reduciéndose el número de los adaxiales en las más tardías.

Otras células especializadas de la epidermis son las que forman parte de los estomas, que en *Arabidopsis thaliana* están compuestos por dos células oclusivas de forma arriñonada, que participan en el intercambio gaseoso necesario para la fotosíntesis y la respiración (Figura 7C; Zhao y Sack, 1999). Tanto las células que forman los estomas como las adyacentes están relacionadas clonalmente (Serna y Fenoll, 1997), ya que proceden de un precursor denominado meristemoide (Yang y Sack, 1995). Existen diferencias en la distribución espacial de los estomas entre distintos ecotipos, entre las hojas de la misma planta y entre las superficies adaxial y abaxial de cada hoja (Rüffer-Turner y Napp-Zinn, 1979).

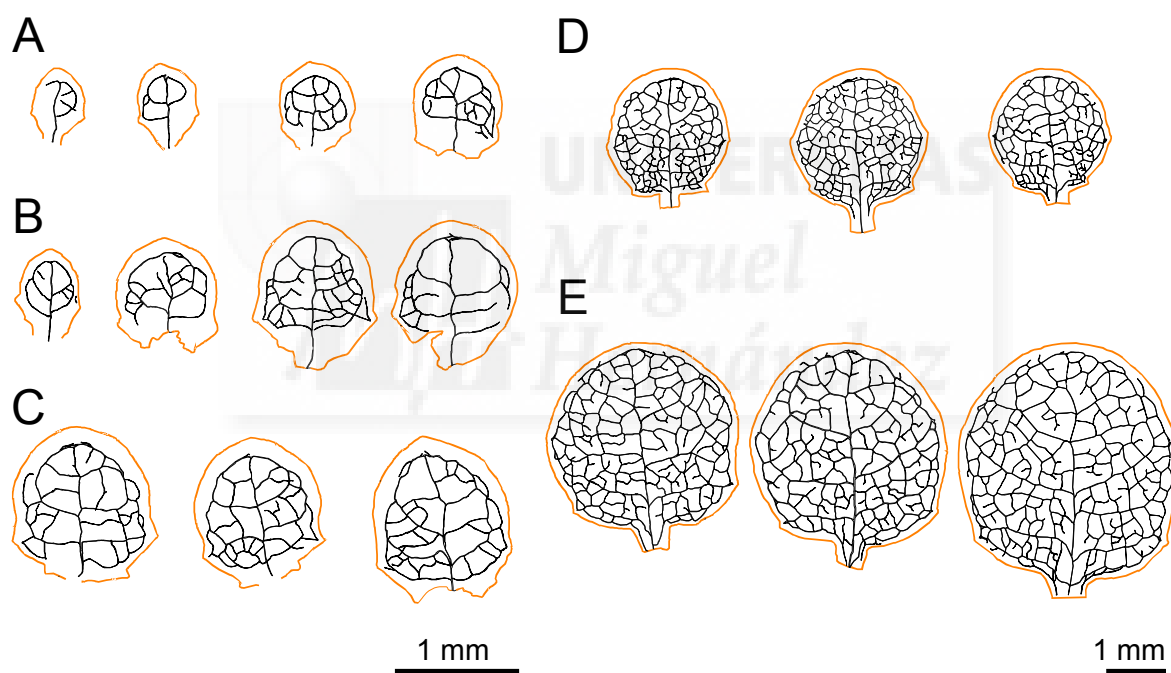


Figura 8.- Variación con el tiempo del patrón de venación de las hojas vegetativas del tercer nudo de la roseta basal del ecotipo *Ler*. Cada grupo de diagramas incluye hojas procedentes de diferentes plantas cultivadas en cajas de Petri y cosechadas 12 (A), 13 (B), 14 (C), 16 (D) y 18 (E) días tras la siembra. Los trazos discontinuos indican elementos vasculares en diferenciación, parcialmente lignificados. Los trazos continuos que no representan el margen de la hoja indican haces de xilema apreciablemente lignificados. Tomado de Candela, 2001.

El patrón de venación foliar de *Arabidopsis thaliana* es broquidódromo, es decir, incluye una vena primaria de la que surgen las venas secundarias formando bucles (Figura 8A-E). El patrón de venación de las hojas del ecotipo *Landsberg erecta* (*Ler*) ha

sido descrito muy detalladamente (Figura 8; Candela *et al.*, 1999; Candela, 2001), así como la distribución de los hidatodos, glándulas dispuestas cerca del margen foliar, que están asociadas a los conductos vasculares, a través de las que se produce la gutación o secreción de agua líquida.

Las hojas del maíz, por su parte, presentan la estructura típica de las monocotiledóneas (Freeling y Lane, 1994), con una vaina (*sheath*) basal que envuelve al tallo, un limbo distal con forma de cinta, y, entre ambos, la región ligular, formada por un par de aurículas en forma de cuña y una lígula que es el resultado de la fusión de varios tricomas. Las hojas del maíz también muestran diferencias entre sus dominios adaxial y abaxial, y manifiestan simetría bilateral con respecto a la vena primaria, que se encuentra en el centro de una región triangular muy lignificada, denominada costilla central (*midrib*).

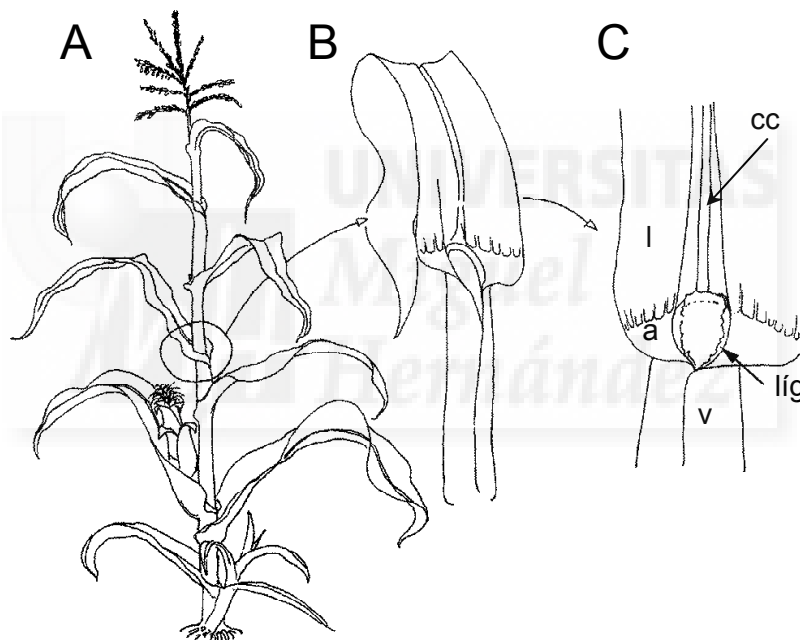


Figura 9.- Estructura de la hoja del maíz. (A) Planta adulta del maíz. (B) Hoja adulta. (C) Detalle de la región ligular. El significado de las abreviaturas es el siguiente: cc, costilla central; l, limbo; a, aurícula; líg, lígula; v, vaina. Tomado, con pequeñas modificaciones, de Harper y Freeling, 1996.

1.4.4.- Organogénesis foliar

A pesar de que la hoja es, a primera vista, una estructura simple (véase la Figura 6A, en la página 24), 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 a la variación de su forma entre distintas especies.

Con el fin de estudiar el desarrollo de la hoja, es útil dividirlo en varias etapas (Sylvester *et al.*, 1996). La primera de ellas es la iniciación del primordio foliar, en la que adquiere una identidad diferenciada del resto del meristemo. En la segunda, la mayor parte de la hoja comienza a determinarse y adquiere su forma básica, completándose la histogénesis en la etapa final.

El origen meristemático de cada uno de los tejidos que conforman la hoja de las dicotiledóneas ha sido establecido mediante análisis clonal (Figura 10; Stewart, 1978; Tilney-Basset, 1986). La capa L1 del meristemo apical, la más externa, da lugar a la epidermis adaxial y abaxial, mientras que las más internas, L2 y L3, generan los tejidos internos de la hoja. Para el seguimiento de los linajes de L1, L2 y L3 se han empleado las denominadas quimeras periclinales (Figura 10B), en las que las células de una capa del meristemo difieren de las restantes en algún aspecto, como el grado de ploidía o la carencia de clorofila (Satina *et al.*, 1940; Satina y Blakeslee, 1941; citados en Smith y Hake, 1992).

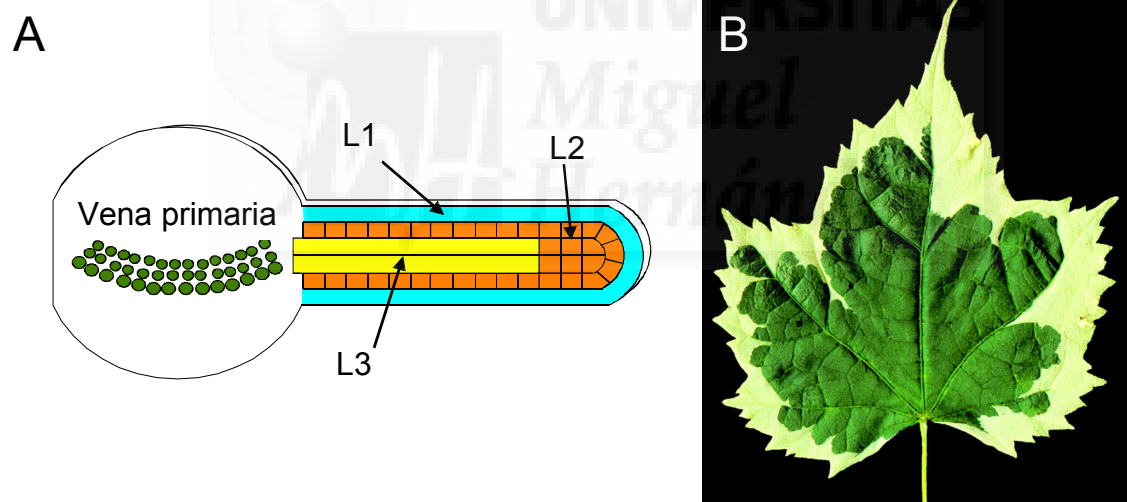


Figura 10.- Análisis clonal del desarrollo de la hoja. (A) Representación del linaje de las células del limbo en las hojas de *Nicotiana tabacum*. Mientras que la capa L1 del meristemo apical origina la epidermis adaxial y abaxial, la L2 da lugar a todo el mesófilo en el margen. Por último, la capa L3 genera la parte central del mesófilo, en torno a la vena primaria. (B) Una quimera periclinal de un mutante de *Abutilon × hybridum* en el que la capa L2 es incapaz de producir clorofila. Tomado, con pequeñas modificaciones de McHale, 1993 (A), y Golz y Hudson, 2002 (B).

La iniciación de una hoja se manifiesta en un grupo de células del meristemo apical del tallo en las que se produce un cambio en el patrón de sus divisiones, habitualmente anticlinales, que pasan a ser periclinales, con lo que se genera una

protuberancia que se denomina primordio foliar (Cunninghame y Lyndon, 1986). Este cambio en el patrón de las divisiones parece deberse a un proceso de expansión celular polarizada, ya que los meristemas que han sido irradiados, cuyas células son por ello incapaces de dividirse, forman una protuberancia similar a un primordio (Foard, 1971). Por otro lado, los mutantes *shoot meristemless* (*stm*; Long *et al.*, 1996; véase el apartado I.4.2, en la página 18), que carecen de meristemo apical del tallo, suelen producir tejidos foliares a partir del hipocotilo, lo que indica que el meristemo no es imprescindible para la formación de las hojas (Barton y Poethig, 1993).

La dorsoventralidad de las hojas adultas de *Arabidopsis thaliana* puede apreciarse desde los estadios más tempranos de su desarrollo, ya que los primordios foliares son semicirculares pero presentan una región aplanada que corresponde a su cara adaxial (Pyke *et al.*, 1991). Esta asimetría dorsoventral se hace más pronunciada en los tejidos internos conforme el primordio incrementa su tamaño.

Se ha aceptado durante mucho tiempo que el limbo de las dicotiledóneas se originaba a partir de un pequeño grupo de células meristemáticas ubicadas en el margen de la hoja, denominadas células marginales iniciales (Avery, 1933; citado en Dolan y Poethig, 1991). Sin embargo, los estudios de análisis clonal (Poethig y Sussex, 1985a; Dolan y Poethig, 1991) y de expresión de genes de la división celular, como el de la ciclina1 de *Arabidopsis thaliana* (*cyclin1At*; Donnelly *et al.*, 1999; véase el apartado I.4.5.3.3, en la página 47) demuestran que la división celular se produce durante el desarrollo de la hoja en toda su superficie, sin que se conozca indicio alguno de la existencia de zonas meristemáticas, cuya ausencia confirman también los estudios anatómicos de las primeras hojas de *Arabidopsis thaliana* (Pyke *et al.*, 1991).

La epidermis es el primer tejido foliar que deja de dividirse, siguiéndole el mesófilo esponjoso, y finalmente, el mesófilo en empalizada (Dale, 1988; Pyke *et al.*, 1991). La formación de los espacios intercelulares comienza con la digestión enzimática de la pared de las células del mesófilo, que se separan como consecuencia de la tensión generada por la expansión de las células epidérmicas (Avery, 1933).

Se han obtenido cortes paradérmicos (paralelos a la epidermis) de hojas de *Arabidopsis thaliana* en expansión, en los que se observa que las divisiones celulares dejan de producirse en la región apical del limbo antes que en la basal (Figura 11), siguiendo un patrón basípeto similar al que se ha descrito también para la lignificación de los elementos del patrón vascular (Candela *et al.*, 1999), o la diferenciación de los tricomas (Schnittger *et al.*, 1999).

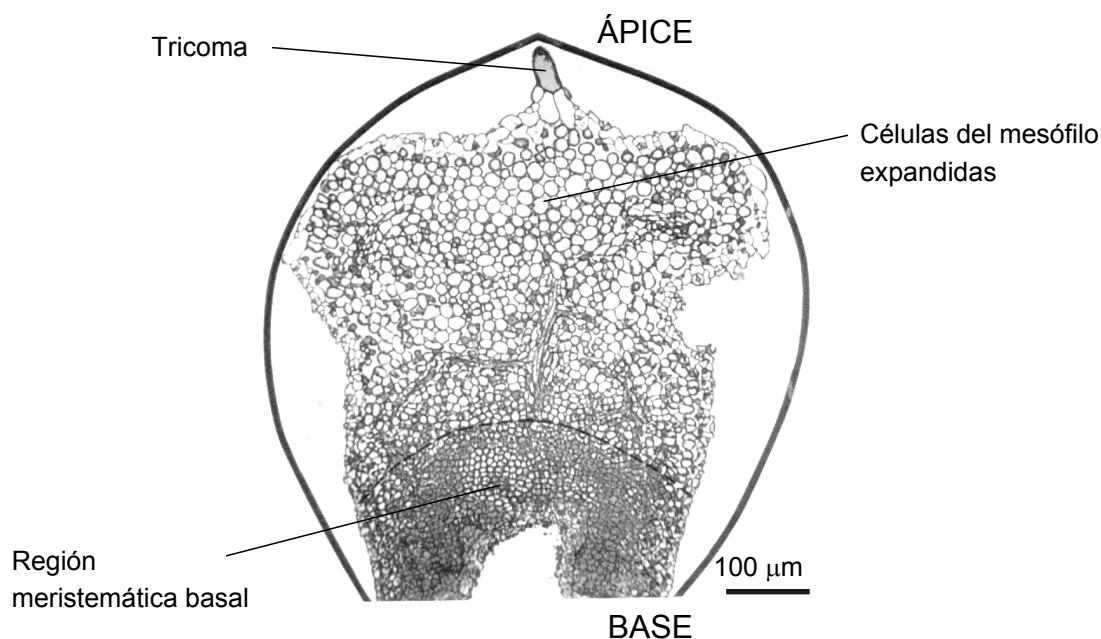


Figura 11.- Corte paradérmico de 1 μm de grosor de la primera hoja de *Arabidopsis thaliana*. Casi todas las células que se aprecian en la imagen pertenecen al mesófilo en empalizada, ya que el corte, que corresponde al 75% de la superficie de la hoja, fue realizado por debajo de la epidermis adaxial. La línea discontinua delimita la región basal con actividad mitótica, y la continua el margen. La hoja fue recolectada 19 días después de la siembra. Tomado, con pequeñas modificaciones, de Pyke *et al.*, 1991.

I.4.5.- Disección genética del desarrollo de la hoja

Son numerosos los mutantes en varias especies vegetales con una morfología foliar alterada que se han aislado. Dado que el desarrollo foliar es un proceso complejo, en los apartados que siguen hemos agrupado las mutaciones previamente descritas según el proceso que perturban: la especificación de la identidad del primordio, el establecimiento de la polaridad a lo largo de los ejes de desarrollo del órgano, su crecimiento y expansión, la formación de patrones y el cambio de fase.

I.4.5.1.- Especificación de la identidad del primordio foliar

El producto del gen *KNOTTED1* (*KN1*) del maíz es una proteína con homeodominio, homóloga a las de los animales (Vollbrecht *et al.*, 1991), que se expresa en las células del meristemo apical del tallo, excepto en las que originan los primordios de los órganos laterales (Smith *et al.*, 1992; Jackson *et al.*, 1994). Las mutaciones dominantes *Kn1* causan la desrepresión ectópica del gen *KN1* en los primordios foliares, lo que hace aparecer ectópicamente tejido meristemático en las hojas (Smith *et al.*, 1992;

Sinha *et al.*, 1993b). La clase I de los genes *KNOX* (*KNOTTED1-LIKE HOMEODOMAIN*; Jackson *et al.*, 1994; Kerstetter *et al.*, 1994) incluye genes que se expresan en el meristemo apical del tallo, pero no en los primordios foliares. La desrepresión ectópica de estos genes en los primordios foliares causa la lobulación de las hojas, que manifiestan actividad meristemática, así como alteraciones en la identidad celular de los tejidos situados sobre el eje proximodistal de la hoja, tal como se ha comprobado en varias especies (Figura 12B; Sinha *et al.*, 1993b; Lincoln *et al.*, 1994; Chuck *et al.*, 1996; Sentoku *et al.*, 2000). En *Arabidopsis thaliana*, los genes *KNAT1*, *KNAT2*, *KNAT6* y *STM* constituyen la clase I de los genes *KNOX*, cuya expresión se restringe al meristemo apical del tallo y que se requieren para su correcto desarrollo (revisado en Barton, 2001). La lobulación de las hojas de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* en las que se expresa *KNAT1* de forma constitutiva se debe a que se mantiene la proliferación meristemática en los tejidos adultos (Figura 12B; Lincoln *et al.*, 1994; Chuck *et al.*, 1996).

Los productos del gen *ROUGH SHEATH2* (*RS2*) del maíz y su ortólogo *PHANTASTICA* (*PHAN*) de *Antirrhinum majus* son factores de transcripción de la familia MYB (Schneeberger *et al.*, 1998; Waites *et al.*, 1998; Timmermans *et al.*, 1999; Tsiantis *et al.*, 1999a) que reprimen a los genes *KNOX* en las hojas. Las hojas de los mutantes *rs2/rs2* manifiestan transformaciones de las regiones distales en proximales, y las de las plantas *phan/phan* están radializadas, como consecuencia de la transformación de los tejidos adaxiales en abaxiales (Waites y Hudson, 1995; véase el apartado I.4.5.2, en la página 32). En base a estas observaciones se ha propuesto que el gen *PHAN*, al reprimir a los genes *KNOX*, contribuye al establecimiento de la identidad foliar en el meristemo y a la especificación del eje dorsoventral de la hoja (Waites y Hudson, 1995; véase el apartado I.4.5.2, en la página 32).

Las mutaciones de insuficiencia de función de los genes *ASYMMETRIC LEAVES1* (*AS1*) y *AS2* de *Arabidopsis thaliana* causan la lobulación de las hojas y transformaciones de los tejidos distales en proximales, similares a las observadas en las plantas *rs2/rs2* del maíz (Ori *et al.*, 2000; Byrne *et al.*, 2000). Este fenotipo es a su vez semejante al de las plantas transgénicas en las que se expresa constitutivamente algún gen *KNOX* de la clase I. Dado que los genes *KNAT1* y *KNAT2* están desreprimidos ectópicamente en las hojas de los mutantes *as1/as1* y *as2/as2*, se ha propuesto que la función de los genes *AS1* y *AS2* es reprimir a los genes *KNOX* en las hojas. *AS1* es una proteína MYB homóloga a *PHAN* y *RS2* (Byrne *et al.*, 2000), mientras que *AS2* es una proteína con cremalleras de leucina (Iwakawa *et al.*, 2002). En el meristemo apical del tallo, *STM* reprime a *AS1*, lo que permite la expresión de *KNAT1* y *KNAT2*, que promueven la

proliferación celular (Figura 12A). Por su parte, en los primordios foliares, en los que *STM* no se expresa, *AS1* reprime a *KNAT1* y *KNAT2* (Figura 12A), y posiblemente activa a otros genes, como *LATERAL ORGAN BOUNDARIES (LOB)*, cuya actividad es necesaria para el correcto desarrollo de la hoja (Barton, 2001; Byrne *et al.*, 2002). El producto del gen *LOB*, cuya expresión en el tipo silvestre está restringida al dominio abaxial de los órganos laterales (Shuai *et al.*, 2002), es similar a *AS2*, y su desrepresión ectópica causa la curvatura de la hoja hacia el haz.

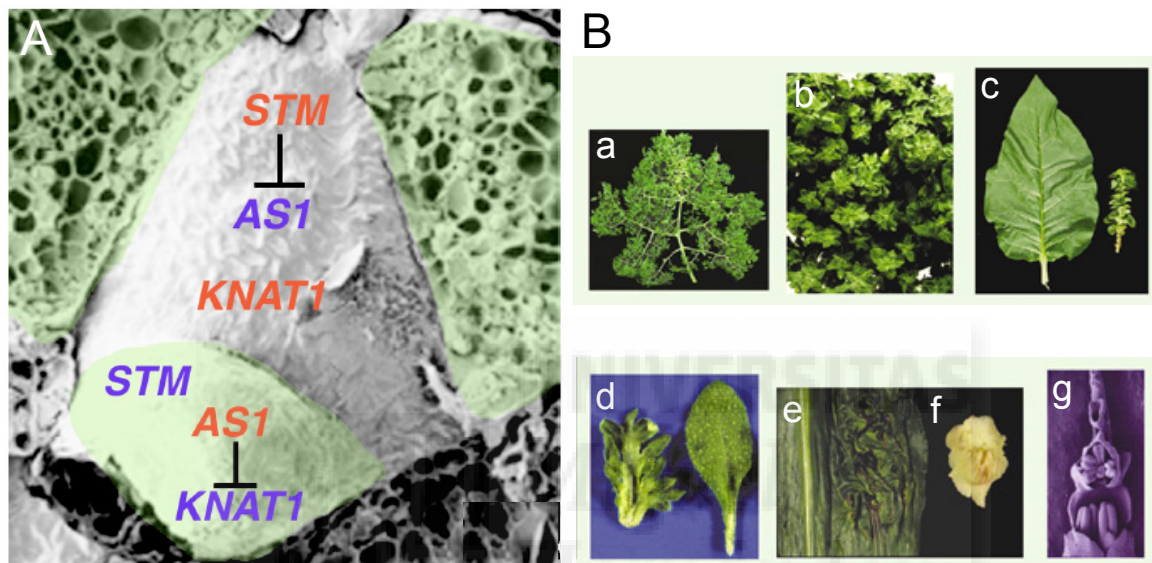


Figura 12.- Regulación de los genes *KNOX* y efectos fenotípicos de su expresión constitutiva. (A) Microfotografía de barrido del meristemo apical del tallo de *Arabidopsis thaliana*, en la que se destaca en verde un primordio foliar. Los genes activos se indican en rojo y los inactivos en azul. En el meristemo, *STM* reprime a *AS1*, por lo que los genes *KNOX*, como *KNAT1*, pueden expresarse. En el primordio foliar, *AS1* se expresa y reprime a los genes *KNOX*. (B) Efectos fenotípicos de los alelos dominantes de los genes *KNOX*. Las fotografías corresponden a hojas de plantas transgénicas del tomate (a), el tabaco (b-c) y *Arabidopsis thaliana* (d, imagen de la izquierda; la de la derecha corresponde a una hoja silvestre) en las que se expresa constitutivamente el gen *KNI* del maíz. Las restantes hojas corresponden a mutantes *Kn1* del maíz (e), el gladiolo (f) y la cebada (g). Tomado, con pequeñas modificaciones, de Barton, 2001 (A), y Hake y Ori, 2002 (B).

1.4.5.2.- Establecimiento de la polaridad del órgano

Mientras que la simetría de la raíz y el tallo es radial, la de los órganos laterales, como los foliares y los florales, es bilateral. En los primordios foliares se distinguen tres ejes principales de desarrollo, en función de su posición respecto al meristemo apical: el proximodistal, el mediolateral y el dorsoventral (véase el apartado 1.4.3, en la página 23).

Las variaciones en el crecimiento a lo largo de estos tres ejes son la causa fundamental de la enorme diversidad de las formas de los órganos laterales de las plantas que pueblan nuestro planeta. En la Tabla 2 se recogen algunas mutaciones que perturban la polaridad de los primordios, que se describen a continuación con más detalle.

Se conocen varias mutaciones que perturban la polaridad a lo largo del eje proximodistal en diferentes especies vegetales. A este grupo pertenecen las mutaciones recesivas en los genes *LIGULELESS1* (*LG1*) y *LG2*, que causan la desaparición de la lígula, una estructura proximal de las hojas del maíz (véase la Figura 9, en la página 27; Becraft *et al.*, 1990; Harper y Freeling, 1996). Se ha propuesto que estos dos genes regulan el establecimiento de la región ligular de la hoja y su diferenciación (Harper y Freeling, 1996). *LG1* (Moreno *et al.*, 1997) es similar a dos proteínas que se unen al promotor del gen *SQUAMOSA* (*SQUA*) de *Antirrhinum majus*, el ortólogo de *APETALA1* (*AP1*) de *Arabidopsis thaliana*, mientras que *LG2* contiene cremalleras de leucina (Walsh *et al.*, 1998). Las mutaciones semidominantes en los genes *LG3* y *LG4* causan la desaparición de la región ligular, que se transforma en vaina, una estructura distal de las hojas del maíz (véase la Figura 9, en la página 27). Este fenotipo es similar al producido por las mutaciones dominantes en los genes *KNOX* de la clase I (Fowler y Freeling, 1996). De hecho, *LG3* presenta un homeodominio similar al de las proteínas *KNOX* (Muehlbauer *et al.*, 1999).

La mutación dominante *lettuce* (*let*) de *Arabidopsis thaliana* determina que las hojas vegetativas carezcan de peciolo (Van der Graaff *et al.*, 2000). Esta alteración se debe a que el gen *LEAFY PETIOLE* (*LEP*) está activado de forma ectópica en la hoja, en la que normalmente no se expresa. *LEP* es una proteína con un dominio de unión a ADN del tipo *APETALA2/EREBP* (Van der Graaff *et al.*, 2000). Un fenotipo similar es causado por las mutaciones recesivas *blade-on-petiole1* (*bop1*), que causan en homocigosis la aparición ectópica de células del limbo en la región adaxial de los peciolos, así como la desrepresión de los genes *KNAT1*, *KNAT2* y *KNAT6* en la hoja. Los dobles mutantes *bop1/bop1;as1/as1* y *bop1/bop1;as2/as2* presentan fenotipos sinérgicos (Ha *et al.*, 2003), lo que sugiere que *BOP1* también controla la actividad meristemática a lo largo del eje proximodistal de los primordios mediante la represión de los genes *KNOX* (Ha *et al.*, 2003).

Tabla 2.- Algunos genes cuyas mutaciones perturbaban el establecimiento de la polaridad proximodistal o la dorsoventral

| Genes ^a | Naturaleza del producto | | Expresión espacial | | Efectos fenotípicos de su expresión constitutiva | | Función propuesta |
|---|---|---|-------------------------------------|--|--|------------------------|---|
| | Factor de transcripción | Región ligular de los primordios | Proteína con cremalleras de leucina | Meristema apical del tallo y región ligular de los primordios | insuficiencia | expresión constitutiva | |
| <i>LIGULESS1 (LG1)</i> ¹ <i>Zea mays</i> | Factor de transcripción | Región ligular de los primordios | | Desaparición de la ligula | | | Establecimiento de la región ligular de las hojas del maíz |
| <i>LG2</i> ² <i>Zea mays</i> | Proteína con cremalleras de leucina | Meristema apical del tallo y región ligular de los primordios | | | | | |
| <i>LEAFY PETIOLE (LEP)</i> ³ <i>BLADE-ON-PETIOLE1 (BOP1)</i> ⁴ | Proteína de unión a ADN con un dominio APETALA2/EREBP | Región meristemática de los primordios | | Las hojas vegetativas carecen de peciolo | | | Regulación de la actividad meristemática en el eje proximodistal |
| <i>ROUGH SHEATH2 (RS2)</i> ⁵ <i>Zea mays</i> | Factor de transcripción MYB | Primordios foliares | | Aparición de limbo ectópico en la región adaxial de los peciolos | | | |
| <i>PHANTASTICA (PHAN)</i> ⁶ <i>Antirrhinum majus</i> | Factor de transcripción MYB | Todas las células de los primordios foliares | | La ligula se desplaza hacia el ápice, lo que causa la desaparición del limbo | | | Establecimiento de la polaridad proximodistal y represión de genes <i>KNOX</i> en la hoja |
| <i>LEAFBLADELESS1 (LBL1)</i> ⁷ <i>Zea mays</i> | Factor de transcripción MYB | Región meristemática de los primordios foliares | | Hojas filiformes de simetría radial, con ausencia de estructuras adaxiales | | | Establecimiento de la polaridad dorsoventral |
| <i>LAM1</i> ^{8,9} <i>Nicotiana sylvestris</i> | | | | Hojas abaxializadas de simetría radial | | | Establecimiento de la identidad dorsal de los primordios |

^aSe siguen las pautas definidas para la Tabla 1, en la página 19. ¹Moreno *et al.* (1997); ²Walsh *et al.* (1998); ³Van de Graaff *et al.* (2000); ⁴Ha *et al.* (2003);⁵Timmermans *et al.* (1999); ⁶Waite *et al.* (1998); ⁷Timmermans *et al.* (1998); ^{8,9}McHale (1992, 1993)

Tabla 2 (continuación). - Algunos genes cuyas mutaciones perturban el establecimiento de la polaridad proximodistal o la dorsoventral

| Genes ^a | Naturaleza del producto | | Expresión espacial | | Efectos fenotípicos de su | | Función propuesta |
|--|---|------------------|---|---|--|---|--|
| | Proteínas homólogas | Proteínas HD-ZIP | Primordios foliares | Región adaxial de los órganos laterales | insuficiencia | expresión constitutiva | |
| <i>PHABULOSA (PHB)</i> ¹⁰ <i>ATHB-14 (PHB)</i> y <i>ATHB-9 (PHV)</i> de la subfamilia III de las proteínas HD-ZIP | | | Primordios foliares | Región adaxial de los órganos laterales | Las mutaciones semidominantes en estos genes producen hojas cilíndricas, de simetría radial, en cuya superficie abaxial se aprecian rasgos adaxiales | expresión constitutiva | Establecimiento de la identidad de las células en la región abaxial de los primordios de los órganos laterales |
| <i>PHAVOLUTA (PHV)</i> ¹⁰ | | | | | | | |
| <i>REVOLUTA (REV)</i> ^{11, 12} | Factor de transcripción de la subfamilia III de las proteínas HD-ZIP | | Región adaxial de los órganos laterales | Región adaxial de los órganos laterales | Desaparición de los meristemas axilares, en la región adaxial de las hojas caulinares | | |
| <i>FILAMENTOUS FLOWER (FIL)</i> ¹³ <i>YABBY2 (YAB2)</i> ¹³ <i>YAB3</i> ¹³ | Factores de transcripción con un dominio de dedos de zinc | | Región abaxial de los órganos laterales | Región abaxial de los órganos laterales | En los dobles mutantes <i>fil/fil; yab3/yab3</i> se adaxializan todos los tejidos derivados de los primordios foliares | Órganos laterales filiformes, con células abaxiales en la región adaxial | Establecimiento de la identidad de las células en la región abaxial de los primordios de los órganos laterales |
| <i>KANADI1 (KAN1)</i> ^{14, 15, 16} <i>KAN2</i> ^{14, 15, 16} <i>KAN3</i> ^{14, 15, 16} | Factores de transcripción con un dominio GARP | | Región abaxial de los órganos laterales | Región abaxial de los órganos laterales | En las plantas <i>kan2/kan2</i> y <i>kan1/kan1; kan2/kan2</i> se pierde la identidad abaxial de los órganos laterales | Órganos laterales radializados, cuyos tejidos presentan identidad abaxial | Establecimiento de la identidad de las células en la región abaxial en los primordios |
| <i>ARGONAUTE1 (AGO1)</i> ¹⁷ <i>PINHEAD (PNH)</i> ^{18, 19} | Proteínas de la familia PAZ/Piwi, implicadas en el silenciamiento génico postranscripcional | | Toda la planta | Toda la planta | Órganos laterales radializados, con pérdida de identidad abaxial | Hojas adaxializadas, de morfología radial | Especificación de la identidad abaxial, mediante silenciamiento génico postranscripcional |

Implicados en la dorsoventralidad (continuación)

^aSe siguen las pautas definidas para la Tabla 1, en la página 19. ¹⁰McConnell *et al.* (2001); ¹¹Ratcliffe *et al.* (2000); ¹²Otsuga *et al.* (2001); ¹³Revisado en Bowman (2000); ^{14, 15}Eshed *et al.* (1999, 2001); ¹⁶Kerstetter *et al.* (2001); ¹⁷Bohmert *et al.* (1998); ¹⁸Lynn *et al.* (1999); ¹⁹Fagard *et al.* (2000).

El cultivo de primordios foliares extirpados del meristemo apical del tallo da lugar a órganos cilíndricos de identidad aparentemente abaxial (Sussex, 1954; 1955). Esta observación clásica sugiere que la identidad abaxial se establece por defecto y que la dorsoventralidad de las hojas aparece como consecuencia de la percepción de una señal emitida por el meristemo apical del tallo (Sussex, 1954). Por otro lado, la ausencia de expansión lateral en estos cultivos de primordios aislados sugiere que el establecimiento de la polaridad dorsoventral es necesario para el crecimiento del limbo a lo largo del eje mediolateral (Sussex, 1954).

En los homocigotos para las mutaciones recesivas *phan* (Waites y Hudson, 1995) de *Antirrhinum majus* (véase el apartado I.4.5.1, en la página 30), cuya expresividad es variable, se observan ocasionalmente hojas filiformes de simetría radial, en las que no se aprecian estructuras adaxiales (Figura 13B). De hecho, en la superficie adaxial de las primeras hojas de los mutantes *phan/phan* aparecen sectores ectópicos de células con morfología abaxial, que están delimitados por protrusiones aparentemente originadas por expansión lateral ectópica. Se ha propuesto, de acuerdo con el modelo de Sussex (1954), que la yuxtaposición de un dominio abaxial y otro adaxial, cuya identidad podría deberse a la expresión de *PHAN*, es necesaria para que se produzca la expansión lateral de la hoja (Waites y Hudson, 1995). El gen *PHAN*, cuyo producto es un factor de transcripción de la familia MYB, se expresa en todas las células precursoras de los primordios foliares del meristemo apical del tallo, por lo que se ha sugerido que algún control postranscripcional restringe su actividad a los tejidos adaxiales (Waites *et al.*, 1998). La función de *PHAN* es necesaria también para el crecimiento proximodistal de los primordios y el mantenimiento de la actividad y la estructura del meristemo apical del tallo, esto último a través de la regulación de los genes *KNOX* (véase el apartado I.4.5.2, en la página 32; Waites *et al.*, 1998).

El gen *RS2* es el ortólogo de *PHAN* en el maíz (Timmermans *et al.*, 1999; Tsiantis *et al.*, 1999a). Los mutantes *rs2/rs2* manifiestan diversas alteraciones en la morfología foliar, que incluyen la aparición de algunas hojas sin limbo y otras arrugadas como consecuencia de la presencia de células de la vaina en el limbo, lo que hace que la lígula se desplace hacia el ápice foliar (Schneeberger *et al.*, 1998). El producto del gen *RS2* también se requiere para reprimir en la hoja la expresión de varios genes *KNOX* como *KN1* y *LG3*. Estos resultados sugieren que los controles genéticos que establecen los ejes proximodistal y dorsoventral están muy relacionados.

Otro de los genes presuntamente implicados en el establecimiento y/o el mantenimiento de la identidad adaxial en la hoja del maíz es *LEAFBLADELESS1* (*LBL1*).

Sus alelos mutantes causan, en homocigosis, un fenotipo similar al de las mutaciones *phan* de *Antirrhinum majus*, que se caracterizan por la presencia de hojas abaxializadas de simetría radial, en las que *KN1* se expresa de forma ectópica (Timmermans *et al.*, 1998). De la misma forma, los mutantes *lam1/lam1* de *Nicotiana tabacum* muestran hojas radializadas (McHale, 1992; 1993), que manifiestan rasgos abaxiales en su superficie adaxial, así como la ausencia de las células alargadas que delimitan el haz y el envés en el margen de la hoja silvestre (McHale y Marcotrigiano, 1998). La existencia de estas mutaciones recesivas que causan la abaxialización de la hoja sugiere que la función de los genes que dañan es el establecimiento de la identidad adaxial en los primordios.

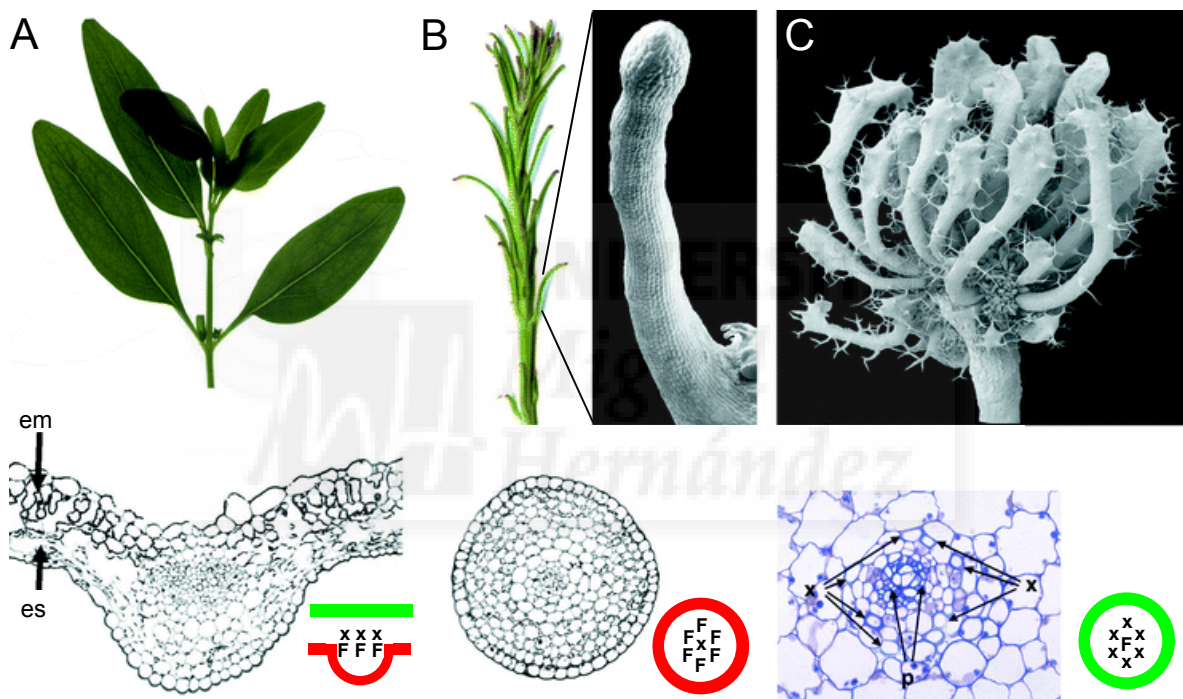


Figura 13.- Establecimiento de la identidad adaxial en las hojas de las angiospermas. (A) En las hojas de *Antirrhinum majus*, la dorsoventralidad se manifiesta en la existencia del mesófilo en empalizada (em) en el dominio adaxial y el esponjoso (es) en el abaxial. Se destacan en verde los tejidos adaxiales y en rojo los abaxiales. Los haces vasculares también muestran polaridad, situándose el xilema (x) en posición adaxial con respecto al floema (F). (B) Las plantas *phan/phan* presenta hojas radializadas, cuyos tejidos sólo poseen identidad abaxial, en las que el xilema (x) está rodeado por el floema (F). (C) El fenotipo de las mutaciones *phb-1d* de *Arabidopsis thaliana* es el opuesto del anterior, ya que las hojas radializadas de las plantas *phb-1d/phb-1d* sólo presentan tejidos adaxiales, según sugiere la morfología de sus células epidérmicas y la distribución espacial de los tricomas y los haces vasculares. Las hojas radializadas de ambos mutantes no presentan expansión lateral. Tomado, con ligeras modificaciones, de Bowman *et al.*, 2002.

Las mutaciones semidominantes *phabulosa-1d* (*phb-1d*) y *phavoluta-1d* (*phv-1d*) de *Arabidopsis thaliana* causan la adaxialización de los órganos laterales (Figura 13C; McConnell y Barton, 1998; McConnell *et al.*, 2001). Las hojas de las plantas *phb-1d/phb-1d* y *phv-1d/phv-1d* son cilíndricas y de simetría radial, lo que apoya la hipótesis, antes mencionada, de que es necesaria la yuxtaposición de los dominios adaxial y abaxial para el crecimiento lateral del limbo. PHB y PHV, también denominadas ATHB-14 (*Arabidopsis thaliana* homeobox-14) y ATHB-9, respectivamente, pertenecen a la subfamilia III de las proteínas que presentan un homeodominio y cremalleras de leucina (HD-ZIP; *homeodomain-leucine zipper*, McConnell *et al.*, 2001). Se asume el carácter hiperomorfo de las mutaciones *phb* y *phv*, todas las cuales dañan el dominio denominado START de PHB y PHV, que es homólogo de la región de unión a esteroides de algunas proteínas de los mamíferos (McConnell *et al.*, 2001). La actividad del gen *PHB* se manifiesta muy pronto en todas las células de los primordios foliares, restringiéndose después a las adaxiales. Se ha propuesto que PHB se activa mediante su unión a un ligando distribuido según un gradiente de concentración definido por la proximidad al meristemo (McConnell *et al.*, 2001; revisado en Bowman *et al.*, 2002).

El producto del gen *REVOLUTA* (*REV*; Talbert *et al.*, 1995), también llamado *INTERFASCICULAR FIBERLESS1* (*IFL1*; Zhong y Ye, 1999), es otro miembro de la subfamilia III de las HD-ZIP (Ratcliffe *et al.*, 2000) y se expresa en la región adaxial de los órganos laterales (Otsuga *et al.*, 2001). Sus mutaciones de insuficiencia de función causan, en homocigosis, la desaparición de los meristemos axilares, los que dan lugar a las inflorescencias secundarias. Dado que estos últimos aparecen en la axila de las hojas caulinares silvestres, que es una estructura adaxial, se ha sugerido que el fenotipo de las plantas *rev/rev* pudiera corresponder a una pérdida parcial de la identidad adaxial (Long y Barton, 2000). Estos resultados apoyan la hipótesis de que la especificación de la identidad adaxial de los primordios es llevada a cabo, en *Arabidopsis thaliana*, por los productos de *PHB*, *PHV* y *REV*, entre otros.

La familia de los genes *YABBY* (*YAB*) de *Arabidopsis thaliana* incluye seis miembros, cuyos productos son factores de transcripción con un dominio de dedos de zinc, que se expresan en la región abaxial de los órganos laterales (revisado en Golz y Hudson, 2002; Bowman, 2000). Son miembros de esta familia los genes *FILAMENTOUS FLOWER* (*FIL*; también denominado *YAB1*), *YAB2* y *YAB3*, que se expresan en los tejidos abaxiales de todos los órganos laterales, así como *CRABS CLAW* (*CRC*) e *INNER NO OUTER* (*INO*; también denominado *YAB4*), que lo hacen en los del fruto (Kidner, 1999; Siegfried *et al.*, 1999). Se han obtenido plantas transgénicas en las que se expresa

constitutivamente el gen *FIL*, que presentan células aparentemente abaxiales en la región adaxial de los órganos laterales (Sawa *et al.*, 1999; Siegfried *et al.*, 1999). La expresión constitutiva de *YAB3* produce resultados similares. La inactivación de estos genes en las células abaxiales, tal como sucede en el doble mutante *fil/fil;yab3/yab3*, produce la diferenciación adaxial de todos los tejidos derivados del primordio foliar (Siegfried *et al.*, 1999). Considerados en conjunto, estos resultados indican que *FIL*, *YAB2* y *YAB3* contribuyen de forma redundante a la especificación de la identidad abaxial de los órganos laterales de *Arabidopsis thaliana* (Siegfried *et al.*, 1999). En el doble mutante *fil/fil;yab3/yab3*, la desrepresión ectópica de los genes de identidad meristemática *STM*, *KNAT1* (también denominado *BREVIPEDICELLUS*, *BP*; Venglat *et al.*, 2002) y *KNAT2* induce la proliferación celular en las hojas adultas, lo que sugiere que los genes *YAB* reprimen además a los genes *KNOX* en los órganos laterales (Kumaran *et al.*, 2002).

Por su parte, los genes *KANADI1* (*KAN1*), *KAN2* y *KAN3*, cuyos productos son factores de transcripción con un dominio GARP (que debe su nombre a su presencia en las proteínas *GOLDEN2* del maíz, *ARR* de *Arabidopsis thaliana* y *Psr1* de *Chlamydomonas reinhardtii*), participan, junto con los genes *YAB*, en el establecimiento de la identidad abaxial en los primordios de los órganos laterales de *Arabidopsis thaliana* (Eshed *et al.*, 1999; 2001; Kerstetter *et al.*, 2001). Las mutaciones *kan1*, cuyo fenotipo foliar apenas difiere del silvestre, fueron aisladas merced a su capacidad de extremar el fenotipo mutante *crc* (Eshed *et al.*, 1999). En las plantas *kan2/kan2* y en los dobles mutantes *kan1/kan1;kan2/kan2* se pierde la identidad abaxial en los órganos laterales. Las plantas transgénicas en las que se expresan de forma constitutiva los genes *KAN1*, *KAN2* o *KAN3* muestran órganos laterales radializados, cuyos tejidos presentan exclusivamente identidad abaxial (Eshed *et al.*, 2001; Kerstetter *et al.*, 2001). Los genes *KAN* no intervienen en la activación inicial de la expresión de los genes *YAB*, pero su producto es necesario para la aparición de las proteínas *YAB* en la región abaxial del primordio (Eshed *et al.*, 2001).

Las mutaciones recesivas *argonaute1* (*ago1*; Bohmert *et al.*, 1998) y *pinhead* (*pnh*; McConnell y Barton, 1995; Moussian *et al.*, 1998; Lynn *et al.*, 1999; véase el apartado I.4.2, en la página 18), también causan, en homocigosis, la aparición de órganos laterales de morfología radial, en los que se observa la pérdida de la identidad adaxial. Las plantas transgénicas en las que *AGO1* se expresa de forma constitutiva presentan hojas adaxializadas, lo que indica que podría estar implicado en la especificación de la identidad adaxial de los órganos laterales. *AGO1* y *PNH* son proteínas homólogas, implicadas en la maquinaria del silenciamiento postranscripcional

de otros genes (Lynn *et al.*, 1999; Fagard *et al.*, 2000; véase el apartado I.4.2, en la página 18). Estos últimos, que constituyen las dianas de la actividad reguladora de AGO1, son candidatos a estar implicados en el establecimiento de la polaridad.

I.4.5.3.- Control genético de la expansión de la hoja

Para que el crecimiento del limbo se lleve a cabo deben coordinarse la división y la expansión celular. La perturbación de cualquiera de estos procesos o su descoordinación produce hojas de morfología anormal, tal como se destaca a continuación y en las Tablas 3, 4 y 5.

I.4.5.3.1.- La expansión foliar

El análisis genético de los mutantes de *Arabidopsis thaliana* que presentan alteraciones en las proporciones del limbo de sus hojas vegetativas ha permitido identificar algunos genes que contribuyen a determinar la forma y el tamaño final de este órgano (Tsuge *et al.*, 1996; Tsukaya, 2002; véase la Tabla 3, en la página 43). Tal es el caso de las plantas homocigóticas para la mutación recesiva *angustifolia* (*an*; Rédei, 1962), cuyos cotiledones y hojas son más estrechos y gruesos que los silvestres, mientras que su longitud no se ve modificada (Tsuge *et al.*, 1996). Este fenotipo se debe principalmente a una reducción de la expansión de sus células en la dirección mediolateral (Figura 14). Por su parte, los homocigotos para la mutación recesiva *rotundifolia3* (*rot3*) presentan hojas redondeadas y con el peciolo corto, debido a un defecto en la expansión proximodistal de sus células (Figura 14; Tsuge *et al.*, 1996). El doble mutante *an/an;rot3/rot3* presenta un fenotipo aditivo, lo que sugiere que *AN* y *ROT3* operan en dos procesos independientes que regulan la expansión del limbo, y que actúan sobre la elongación polar de las células a lo largo de los ejes mediolateral y proximodistal, respectivamente (Tsuge *et al.*, 1996).

El producto del gen *ROT3* es una citocromo P450 hidroxilasa (CYP901C; Kim *et al.*, 1998), homóloga de las hidroxilasas de esteroides de animales. Aunque no se ha descartado que *ROT3* participe en la biosíntesis de los brasinosteroides, unas fitohormonas similares estructuralmente a las hormonas esteroides de animales, se ha comprobado que la adición de brasinólido al medio de cultivo no corrige el fenotipo de los mutantes *rot3/rot3* (Kim *et al.*, 1998). Las hojas de las plantas transgénicas en las que se expresa *ROT3* de forma constitutiva presentan un limbo más largo que el silvestre, no estando alterada su expansión mediolateral (Kim *et al.*, 1999). Por otra parte, aunque la expresión de *ROT3* es ubicua, es mayor en la región distal de las hojas (Kim *et al.*, 1999).

Estos resultados sugieren que *ROT3* estimula la elongación proximodistal de las células del limbo, probablemente a través de una señal hormonal mediada por los brasinosteroides (Tsukaya, 2002).

El producto del gen *AN* es una proteína homóloga del represor transcripcional CtBP humano (Kim *et al.*, 2002). Se ha sugerido que *AN* reprime a genes que son necesarios para la elongación polar de las células, uno de los cuales podría ser *MERISTEM-5 (MERI-5)*, cuya expresión está incrementada en los mutantes *an/an* (Kim *et al.*, 2002) y cifra una enzima implicada en la síntesis de la pared celular.

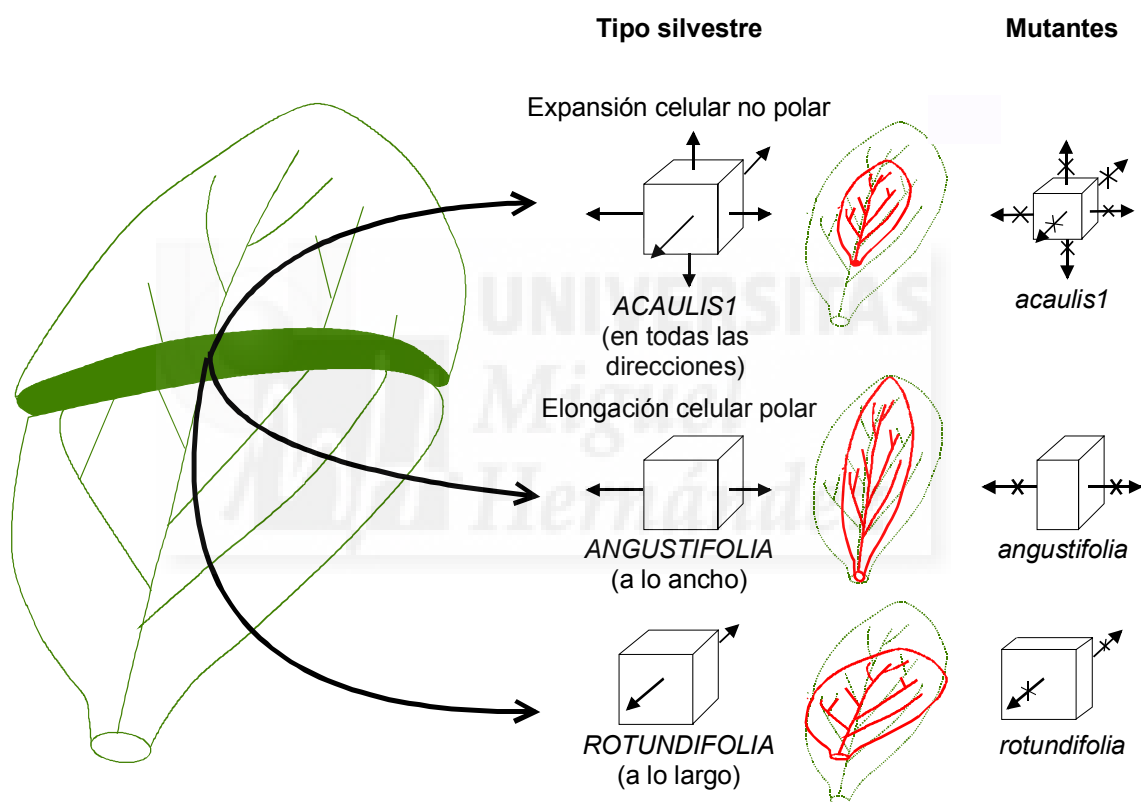


Figura 14.- Presunto papel de los productos de los genes *AN*, *ROT3* y *ACL1* en la expansión de las células de la hoja en *Arabidopsis thaliana*. Cada poliedro representa una célula, y las flechas que parten de sus caras indican las direcciones en las que ocurre (→) o se inhibe (—×→) la expansión celular. Los esquemas de color verde y rojo representan hojas silvestres y mutantes, respectivamente. Para más aclaraciones, véase el texto. Redibujado a partir de Tsukaya, 1995, y Tsuge *et al.*, 1996.

Otros mutantes de *Arabidopsis thaliana* también presentan alteraciones en las proporciones del limbo. Los homocigotos para las mutaciones *rotunda2 (ron2*; Berná, 1997; Berná *et al.*, 1999), que han resultado ser alelos del gen previamente descrito *LEUNIG (LEU*; Liu y Meyerowitz, 1995), presentan hojas vegetativas anchas y con el

margen ligeramente aserrado (Cnops *et al.*, en preparación). RON2 (LUG) es una proteína con repeticiones WD40, homóloga de los represores transcripcionales Tup1 de *Saccharomyces cerevisiae* (Williams y Trumbly, 1990) y Groucho de *Drosophila melanogaster* (Conner y Liu, 2000), que contribuye al desarrollo de la hoja participando en el control de la expansión celular (Cnops *et al.*, en preparación).

Las mutaciones recesivas *deformed root and leaf1* (*drl1*; Bancroft *et al.*, 1993) y *elongata4* (*elo4*; Berná, 1997; Berná *et al.*, 1999), causan el estrechamiento de la hoja y el acortamiento de la raíz (Nelissen *et al.*, 2003). Ambas son alelos del gen *DRL1*, cuyo producto es homólogo de la proteína TOT4 (también llamada KTI12) de *Saccharomyces cerevisiae*, que forma parte del complejo de la elongación (*Elongator*) de la transcripción de la ARN polimerasa II eucariótica (Nelissen *et al.*, 2003). Los alelos recesivos del gen *STRUWWELPELTER* (*SWP*) causan enanismo, la aparición de tallos fasciados y esterilidad. Las plantas *swp/swp* muestran además cotiledones y hojas vegetativas pequeños y muy estrechos (Autran *et al.*, 2002). *SWP* es una proteína homóloga a la subunidad Med150 (también llamada RGR1) del complejo mediador (*Mediator*) requerido por la ARN polimerasa II de *Saccharomyces cerevisiae* para unirse a sus promotores en respuesta a determinadas señales hormonales (Autran *et al.*, 2002).

Los genes *NARROW SHEATH1* (*NS1*) y *NS2* del maíz desempeñan funciones redundantes durante el desarrollo de la hoja (Scanlon, 2000a). Mientras que los mutantes *ns1/ns1* y *ns2/ns2* son fenotípicamente silvestres, los dobles mutantes *ns1/ns1;ns2/ns2* presentan hojas estrechas y tallos cortos (Scanlon *et al.*, 1996). El fenotipo foliar de estos dobles mutantes se debe a la desaparición del dominio lateral del primordio en un momento temprano del desarrollo, lo que origina la ausencia del margen en las hojas maduras (Scanlon y Freeling, 1997). El gen *NS2* cifra una proteína homóloga a las nitrilasas, que son enzimas implicadas en la biosíntesis de las auxinas, lo que sugiere la implicación de estas fitohormonas en la regulación del crecimiento lateral de la hoja en el maíz (revisado en Micol y Hake, 2003).

Los mutantes alterados en la síntesis o la percepción de los brasinosteroides también manifiestan perturbaciones de la elongación polar de sus células, a lo largo tanto del eje mediolateral como del proximodistal (revisado en Altmann, 1999). Las mutaciones hipomorfas del gen *DIMINUTO* (*DIM*), cuyo producto es una enzima implicada en la síntesis de los brasinosteroides (Klahre *et al.*, 1998), causan enanismo y una fertilidad reducida, así como alteraciones en la expansión de las hojas (Takahashi *et al.*, 1995). Este fenotipo es similar al causado por las mutaciones recesivas *acaulis1* (*acl1*) y *acl2* de

Tabla 3.- Algunos genes implicados en la expansión de la hoja

| Gen | Naturaleza del producto | Expresión espacial | Efectos fenotípicos de su | | Función propuesta |
|--|--|---|---|----------------------------------|---|
| | | | insuficiencia | expresión constitutiva | |
| <i>ANGUSTIFOLIA (AM)</i> ^{1,2} | Factor de transcripción CIBP | Toda la planta | Cotiledones y hojas más estrechos y gruesos que los silvestres | | Control del citoesqueleto y la elongación celular a lo largo del eje mediolateral |
| <i>ROTUNDIFOLIA3 (ROT3)</i> ^{1,3,4} | Citocromo P450 hidroxilasa | Toda la hoja y a un nivel más elevado en su región distal | Hojas redondeadas con el peciolo corto | Limbo más largo que el silvestre | Síntesis de una señal que estimula la elongación proximodistal |
| <i>ROTUNDA2 (RON)</i> ⁵ <i>LEUNIG (LUG)</i> | Presunto represor transcripcional con repeticiones WD40 | | Hojas redondeadas y ligeramente aserradas | | |
| <i>DEFORMED ROOT AND LEAF1 (DRL1)</i> ⁶ | Proteína homóloga a TOT4 (KT112) del complejo elongador de la ARN polimerasa II | Toda la planta | Hojas estrechas | | |
| <i>STRUWWELPETER (SWP)</i> ⁷ | Proteína homóloga a Med150 (RGR1) del complejo mediador de la ARN polimerasa II | Toda la planta | Cotiledones y hojas vegetativas pequeños y estrechos | | Duración de la proliferación celular en los primordios foliares |
| <i>NARROW SHEATH1 (NS1)</i> ^{8,9} <i>Zea mays</i> <i>NS2</i> ^{8,9,10} <i>Zea mays</i> | Proteína homóloga a las nitrilasas, que participan en la síntesis de las auxinas | | Los dobles mutantes <i>ns1 ns2</i> presentan hojas estrechas, mientras que los mutantes individuales son fenotípicamente silvestres | | Regulación de la identidad del dominio lateral de las hojas del maíz |
| <i>DIMINUTO (DIM)</i> ^{11,12} | Oxidoreductasa dependiente de FAD | Toda la planta | Plantas enanas, con hojas pequeñas debido a defectos en la expansión celular | | Biosíntesis de los brasinosteroides, que regulan la elongación celular |
| <i>ACAULIS1 (ACL1)</i> ¹³ <i>ACL2</i> ¹⁴ | | | Hojas pequeñas, retorcidas y recurvadas hacia el envés Hojas con el peciolo corto | | Regulación de la elongación de las células en todas las direcciones |

Véanse las correspondientes referencias en el pie de la Tabla 5, en la página 45, en la página 19, en la página 19, en la página 19.

Tabla 4.- Algunos genes implicados en la organización del citoesqueleto y la síntesis de la pared celular

| Gen | Naturaleza del producto | Expresión espacial | Efectos fenotípicos de su insuficiencia | Función propuesta |
|--|---|--|---|--|
| <i>FRAGILE FIBER (FRA2)</i> ¹⁵ | Subunidad p60 de la katanina, que interacciona con los microtúbulos | Acorchamiento del limbo y el peciolo | Plantas enanas, de roseta compacta, y enrollamiento en espiral de algunos órganos | Estabilización de los microtúbulos corticales |
| <i>MICROTUBULE ORGANIZATION (MOR1)</i> ¹⁶ | Proteína asociada a los microtúbulos | Toda la planta | Plantas enanas, de roseta compacta, y enrollamiento en espiral de algunos órganos | Organización de los microtúbulos |
| <i>SPIRAL1 (SPR1)</i> ¹⁷ | | | Enrollamiento en espiral y dextrógiro de algunos órganos, como los peciolo y las raíces | Control de la elongación celular |
| <i>SPR2</i> ¹⁷ | | | | |
| <i>LEFTY1</i> ¹⁸ | α -tubulina TUA6 | Raíces, flores y hojas | Las mutaciones semidominantes en estos genes producen un enrollamiento en espiral y levógiro de algunos órganos | Estabilización del citoesqueleto a través de su interacción con las β -tubulinas |
| <i>LEFTY2</i> ¹⁸ | α -tubulina TUA4 | | | |
| <i>TONNEAU2 (TON2)</i> ^{19, 20} | Subunidad reguladora de una fosfatasa del tipo 2A | Toda la planta | Plantas enanas con alteraciones en los planos de división celular | Control de la organización del citoesqueleto |
| <i>ECTOPIC LIGNIFICATION (EL)</i> ²¹ | | | Plantas enanas de tallos y hojas retorcidos, con alteraciones en la diferenciación vascular | Regulación de la expansión celular mediante la síntesis de la pared celular |
| <i>RADIAL SWELLING1 (RSW1)</i> ²² | Subunidad catalítica de la sintetasa de celulosa | Toda la planta | Plantas enanas | Síntesis de la pared celular primaria |
| <i>KORRIGAN (KOR)</i> ²³ | Endo-1,4- β -D-glucanasa | Toda la planta | Plantas enanas | Síntesis de la pared celular primaria |
| <i>AtEXP10</i> ²⁴ | Expansina | Órganos laterales, como las hojas y las flores | Plantas pequeñas con peciolo y limbo cortos | Promueve la expansión celular mediante el reblandecimiento de la pared celular |

Véanse las correspondientes referencias en el pie de la Tabla 5, en la página 45, en la página 45. Se siguen las pautas definidas para la Tabla 1, en la página 19.

Tabla 5.- Algunos genes implicados en la proliferación celular y los mecanismos de compensación de la morfogénesis foliar

| Gen | Naturaleza del producto | | Expresión espacial | | Efectos fenotípicos de su expresión constitutiva | | Función propuesta |
|--|--|----------------------------|--------------------|--|---|---|---|
| | | | | | insuficiencia | | |
| <i>TANGLED1 (TAN1)</i> ^{25, 26} | Proteína de unión a los microtúbulos | | | | Hojas pequeñas y de crecimiento lento, con alteraciones en la orientación de los planos de división celular | | Control espacial de la división celular |
| <i>AINTEGUMENTA (ANT)</i> ²⁷ | Factor de transcripción con un dominio APETALA2/EREBP | Meristemo apical del tallo | | Hojas y flores pequeñas, debido a una proliferación celular reducida | Órganos laterales mayores que los silvestres | Mantenimiento de la competencia meristemática de las células durante la organogénesis | |
| <i>CYCLIND2 (CYCD2)</i> ²⁸ | Ciclina de tipo D | Células en división activa | | | Mayor ritmo de crecimiento de los órganos laterales, cuyo tamaño y morfología son normales | Control del ciclo celular, mediante la regulación de la entrada en la fase de síntesis del ADN | |
| <i>CYCD3</i> ²⁹ | Ciclina de tipo D | | | | Hojas arrugadas y pequeñas | Promueve la división celular de forma independiente de la organogénesis | |
| <i>KRP2</i> ³⁰ | Inhibidores de las quinasas dependientes de las ciclinas | | | | Hojas pequeñas en las que la proliferación celular es inferior a la silvestre | Control del ciclo celular, mediante la regulación de la actividad de las quinasas dependientes de ciclina | |
| <i>ICK1 (KRP1)</i> ³¹ | | | | | Menor crecimiento de todos sus órganos y hojas aserradas | | |

³Referencias de las Tablas 3, 4 y 5: ¹Tsuge *et al.* (1996); ²Kim *et al.* (1998, 1999); ^{3, 4}Kim *et al.* (1998, 1999); ⁵Cnops *et al.*, en preparación; ⁶Nelissen *et al.* (2003); ⁷Autran *et al.* (2002); ⁸Scanlon *et al.* (2000a); ⁹Scanlon y Freeling (1997); ¹⁰citado en Micol y Hake (2003); ¹¹Takahashi *et al.* (1995); ¹²Klahre *et al.* (1998); ¹³Tsukaya *et al.* (1993, 1995); ¹⁴Burk *et al.* (2001); ¹⁵Burk *et al.* (2001); ¹⁶Whittington *et al.* (2001); ¹⁷Furutani *et al.* (2000); ¹⁸Thitamadee *et al.* (2002); ¹⁹Traas *et al.* (1995); ²⁰Camilleri *et al.* (2002); ²¹Caño-Delgado *et al.* (2000); ²²Arioli *et al.* (1998); ²³Nicol *et al.* (1998); ²⁴Cho y Cosgrove (2000); ^{25, 26}Smith *et al.* (1996, 2001); ²⁷Mizukami y Fischer (2000); ²⁸Cockcroft *et al.* (2000); ²⁹Dewitte *et al.* (2003); ³⁰De Veylder *et al.* (2001); ³¹Wang *et al.* (2000). Se siguen las pautas definidas para la Tabla 1, en la página 19.

Arabidopsis thaliana, que también perturban la expansión celular (véase la Figura 14, en la página 41). Las plantas *acl1/acl1* presentan hojas pequeñas, retorcidas y recurvadas hacia el envés, probablemente como consecuencia de una interrupción, en los estadios tempranos del desarrollo foliar, de la expansión celular en todas las direcciones (Tsukaya *et al.*, 1993). Por otro lado, los mutantes *acl2/acl2* parecen estar afectados de forma específica en la elongación de las células del peciolo y del tallo, ya que ambos órganos son más cortos que los silvestres (Tsukaya *et al.*, 1995; Tsukaya *et al.*, 2002).

I.4.5.3.2.- Papel de los microtúbulos y la pared celular en el desarrollo de la hoja

Tal como se ha comentado en el apartado anterior, al crecimiento de la hoja y de otros órganos de las plantas contribuye la expansión de sus células en todas las direcciones. Esta expansión se manifiesta preferentemente a lo largo de uno de sus ejes, un proceso que es dependiente de la orientación de los microtúbulos corticales durante la división celular (Shibaoka, 1994; Kropf *et al.*, 1998). En *Arabidopsis thaliana*, las mutaciones recesivas *fragile fiber2* (*fra2*; también denominadas *botero1*; Bichet *et al.*, 2001) producen alteraciones en la orientación de los microtúbulos corticales durante la interfase, y reducen la longitud del limbo y el peciolo de sus hojas (Burk *et al.*, 2001). El producto de *FRA2* es homólogo a la subunidad p60 de la katanina, una proteína que interacciona con los microtúbulos corticales y contribuye a su estabilización (Burk *et al.*, 2001). Los alelos hipomorfos termosensibles del gen *MICROTUBULE ORGANIZATION1* (*MOR1*), causan en homocigosis enanismo, la compacidad de la roseta y el enrollamiento en espiral de algunos órganos radiales, como las raíces (Whittington *et al.*, 2001). Dado que *MOR1* pertenece a una familia muy conservada de proteínas asociadas a los microtúbulos, se ha sugerido que participa en la organización de éstos en *Arabidopsis thaliana* (Whittington *et al.*, 2001).

Otros mutantes de *Arabidopsis thaliana* afectados en la organización del citoesqueleto presentan alteraciones en la estructura de la roseta debido al enrollamiento en espiral de los peciolos. Los homocigotos para las mutaciones recesivas *spiral1* (*spr1*) y *spr2* (también denominada *tortifolia1* y *convoluta*; Bürger, 1971; Relichova, 1976) presentan un enrollamiento espiral y dextrógiro (Furutani *et al.*, 2000). Por su parte, los mutantes *lefty1* y *lefty2*, identificados en una búsqueda de mutaciones semidominantes y supresoras del fenotipo de las plantas *spr1/spr1*, presentan un enrollamiento espiral y levógiro (Thitamadee *et al.*, 2002). *LEFTY1* y *LEFTY2* son dos α -tubulinas homólogas,

TUA6 y TUA4, que forman dímeros con las β -tubulinas, contribuyendo a la estabilización de los microtúbulos (Thitamadee *et al.*, 2002).

Las mutaciones recesivas *tonneau* (*ton*) causan enanismo, alterando los planos de división celular, al modificar la orientación de los microtúbulos (Traas *et al.*, 1995). El producto del gen *TON2*, también denominado *fass* (*fas*; Mayer *et al.*, 1991), es la subunidad reguladora B' de una fosfatasa de tipo 2A (PP2A B') que participa en el control de la organización del citoesqueleto (Camilleri *et al.*, 2002).

Los mutantes *ectopic lignification* (*eli*) presentan una expansión reducida de todas sus células, por lo que las plantas son enanas y muestran hojas y tallos retorcidos, apreciándose una diferenciación anormal de sus haces vasculares, que son más gruesos (Caño-Delgado *et al.*, 2000). Este fenotipo es similar al de los homocigotos para los alelos termosensibles de *RADIAL SWELLING1* (*RSW1*), cuyo producto es la subunidad catalítica de una sintetasa de celulosa implicada en la síntesis de la pared celular secundaria (Arioli *et al.*, 1998). Por otro lado, las mutaciones nulas en el gen *KORRIGAN* (*KOR*), cuyo producto es una endo-1,4- β -D-glucanasa implicada en la síntesis de la pared celular primaria, también causan enanismo (Nicol *et al.*, 1998). Todos estos resultados indican que las mutaciones en genes de *Arabidopsis thaliana* que cifran enzimas de la síntesis de la pared celular o que alteran la organización del citoesqueleto causan enanismo como consecuencia de una deficiente elongación de sus células.

Las expansinas son unas proteínas que participan en la digestión de las fibras de celulosa de la pared celular y facilitan su expansión (revisado en Cosgrove, 2000a; 2000b). La expresión de una construcción antisentido del gen de la expansina *AtEXP10* de *Arabidopsis thaliana* tiene como resultado una reducción severa del tamaño de las plantas transgénicas, cuyas hojas presentan peciolo y limbo cortos que están recurvados transversalmente hacia el envés (Cho y Cosgrove, 2000), como consecuencia de una menor expansión de sus células. Por otro lado, la expresión constitutiva del gen *AtEXP10* aumenta el tamaño de las hojas, cuyas células se elongan más que las silvestres (Cho y Cosgrove, 2000).

1.4.5.3.3.- Los mecanismos de compensación de la proliferación celular

Se asume generalmente que las diferencias entre especies en cuanto al tamaño de las hojas son consecuencia de la existencia de distintos patrones espaciales y temporales de división celular (Poethig y Sussex, 1985b). Sin embargo, los controles de la expansión y las divisiones celulares podrían ser independientes, tal como se ha

sugerido en base a la observación de que la irradiación con rayos γ impide la división de las células pero no su expansión (Haber y Foard, 1963).

Las hojas de las plantas homocigóticas para la mutación *tangled1* (*tan1*) del maíz son pequeñas y crecen lentamente pero la morfología del órgano es por lo demás normal.

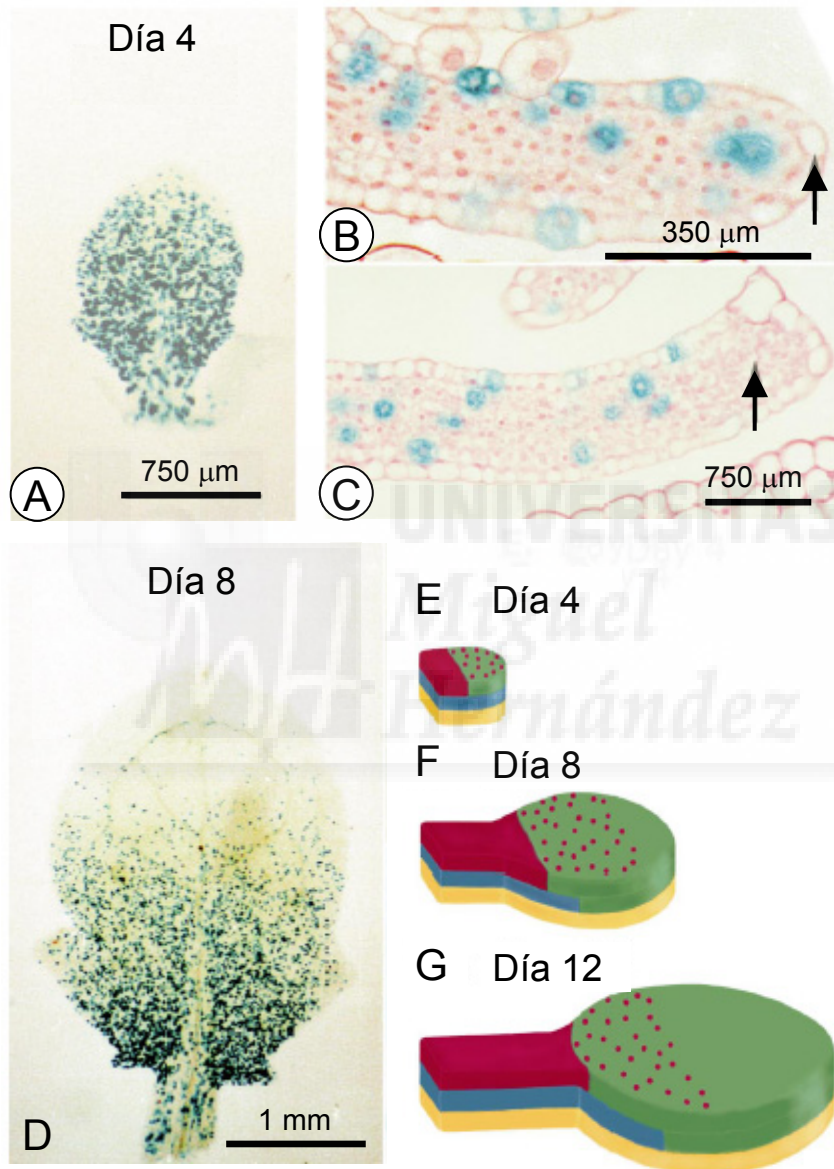


Figura 15.- División celular durante el desarrollo de la hoja en *Arabidopsis thaliana*. Las imágenes corresponden a hojas enteras (A, D) y sus respectivos cortes transversales (B y C), del octavo nudo, que han sido despigmentadas y teñidas para detectar la actividad GUS (β -glucuronidasa) en las células en proliferación, en las que se expresa el transgén *cyc1At::\beta*-glucuronidasa (destacadas en azul). Las flechas indican la ausencia de divisiones en las células del margen foliar. (E-G) Diagramas que muestran los distintos patrones de división celular a lo largo del desarrollo de la hoja. Se representan en rojo las células con actividad proliferativa en la epidermis adaxial y en azul las del mesófilo en empalizada. Tomado, con ligeras modificaciones, de Donnelly *et al.*, 1999.

Los planos de las divisiones celulares en las plantas *tan1/tan1* parecen orientarse al azar (Smith *et al.*, 1996). El producto de *TAN1* es una proteína de unión a los microtúbulos (Smith *et al.*, 2001), implicada en el control espacial de la división celular y contribuye a orientar correctamente las fibras del citoesqueleto durante la citoquinesis (Cleary y Smith, 1998; Smith *et al.*, 2001).

Las divisiones celulares ocurren en todas las fases del crecimiento de la hoja, fundamentalmente en sus primeros estadios (Donnelly *et al.*, 1999). El patrón espacial y temporal de las divisiones celulares ha sido estudiado con mucho detalle en la octava hoja de *Arabidopsis thaliana*, mediante la detección de la expresión de una construcción que contiene la unidad de transcripción del gen de la β -glucuronidasa, fusionado al promotor de *cyc1At*. El producto de este último es una ciclina implicada en la progresión del ciclo celular (Figura 15; Donnelly *et al.*, 1999), que se expresa en las células que se encuentran en división en los primordios foliares. Se ha confirmado de este modo que durante la expansión de la hoja la división celular progresa según un gradiente proximodistal, observándose una tasa de proliferación mayor en la región basal del limbo que en la apical. La diferenciación celular sigue un patrón basípeto, ya que maduran antes los tejidos apicales que los basales. Las células precursoras de los estomas y de los tejidos vasculares, sin embargo, siguen dividiéndose durante todo el desarrollo de la hoja. Estos resultados confirman que la división y la diferenciación celular ocurren de forma simultánea a lo largo del desarrollo de la hoja (Figura 15; Donnelly *et al.*, 1999).

En el ala de *Drosophila melanogaster* se ha demostrado que puede alterarse el número de sus células sin modificar sustancialmente el tamaño final del órgano (revisado en Day y Lawrence, 2000). Para explicar este efecto de compensación, se ha propuesto que el tamaño de un órgano está controlado por mecanismos que miden su masa final (*total mass checkpoint*; revisado en Potter y Xu, 2001) y que actúan sobre el control de la proliferación y la expansión celular. Según esta idea, la así denominada teoría organísmica (*organismal theory*) del desarrollo de la hoja propone que la forma de este órgano es independiente de los controles genéticos que operan sobre el tamaño y la forma de sus células, y de los de la orientación de las divisiones celulares (Kaplan y Hagemann, 1991; Tsukaya, 2003). Este control global de la morfogénesis de la hoja podría establecerse mediante la comunicación entre células adyacentes. De este modo, las variaciones en la tasa de proliferación de algunas células podrían verse compensadas por cambios en la división o la expansión de sus vecinas. Algo similar ocurre en las hojas del mutante *warty-1 (wrt-1)* del maíz (Reynolds *et al.*, 1998), cuya forma y tamaño es normal, aunque su división celular está alterada.

Los homocigotos para la mutación *aintegumenta* (*ant*; Elliott *et al.*, 1996; Klucher *et al.*, 1996) de *Arabidopsis thaliana* presentan hojas y flores pequeñas, debido a una proliferación celular reducida, aunque el tamaño de sus células es ligeramente mayor que el silvestre (Mizukami y Fischer, 2000). La expresión constitutiva de *ANT*, tanto en *Arabidopsis thaliana* como en el tabaco, produce un aumento del tamaño de los órganos derivados del meristemo apical del tallo, causado por el incremento en el número de sus células sin que se altere la morfología final del órgano (Mizukami y Fischer, 2000). En las hojas de estas plantas transgénicas en las que se expresa *ANT* de forma constitutiva se ha observado además la desrepresión ectópica en las hojas del gen *CyclinD3* (*CycD3*), cuyo producto es una ciclina implicada en el ciclo celular. *ANT* es un factor de transcripción con un dominio APETALA2/EREBP que regula la proliferación celular y el crecimiento de los órganos (Mizukami y Fischer, 2000).

En los animales, las ciclinas de tipo D (*cycD*) regulan positivamente la actividad de las quinasas dependientes de ciclina, proteínas que controlan la entrada de las células en la fase S del ciclo celular en la que se produce la síntesis del ADN que precede a la mitosis (Pines, 1994). Aunque la expresión constitutiva del gen *CycD2* de *Arabidopsis thaliana* acelera el ritmo de iniciación de los órganos en el meristemo apical del tallo en plantas transgénicas del tabaco, el tamaño final y la morfología de sus hojas no varía (Cockcroft *et al.*, 2000). Sin embargo, la expresión constitutiva de *CycD3* en *Arabidopsis thaliana* produce hojas arrugadas y recurvadas hacia el envés, cuyas células son más pequeñas y numerosas que las silvestres (Dewitte *et al.*, 2003). Este último resultado sugiere que *CycD3* promueve la división celular en las hojas.

Los inhibidores de las quinasas dependientes de ciclina son unas proteínas que regulan la activación de estas últimas, y que también controlan la entrada de las células en la fase S del ciclo celular en respuesta a las señales hormonales y ambientales (Sherr y Roberts, 1995; 1999). En las plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* en las que se expresa de forma constitutiva el gen *KRP2* (*Kip1-related protein2*, llamado así por su homología con la proteína p27^{Kip1} de mamíferos), cuyo producto es un inhibidor de las quinasas dependientes de ciclina, se inhibe la proliferación pero no la diferenciación celular en los primordios foliares. Las hojas de estas plantas transgénicas son más pequeñas que las silvestres y presentan el margen fuertemente serrado, a la vez que menos células aunque más grandes que las silvestres (De Veylder *et al.*, 2001). Resultados similares se han obtenido en plantas transgénicas en las que se expresa de forma constitutiva el gen *KRP1*, también llamado *ICK1*, cuyo producto es otro inhibidor de quinasas dependientes de ciclina (Wang *et al.*, 2000).

I.4.5.4.- La venación

En *Arabidopsis thaliana* y en otras especies vegetales se conocen mutantes cuyos fenotipos pleiotrópicos incluyen alteraciones de sus tejidos vasculares. Las mutaciones recesivas *cotyledon vascular pattern2 (cvp2)*, *scarface (scf)* y *vascular network1 a vascular network7 (van1-van7)* se aislaron en búsquedas de mutantes con anomalías en la venación de los cotiledones. A diferencia de la mayoría de estos mutantes, cuyo patrón de venación es anormal tanto en los cotiledones como en las hojas (Deyholos *et al.*, 2000; Koizumi *et al.*, 2000), el de *cvp1* está alterado en los cotiledones pero no en las hojas (Carland *et al.*, 1999). El producto de *CVP1* es una esteroil metil-transferasa (STEROL METHYLTRANSFERASE2; SMT2) que participa en la biosíntesis de los esteroides de membrana (Carland *et al.*, 2002).

Se han identificado otros genes cuya expresión en los tejidos vasculares sugiere que podrían estar implicados en el desarrollo de éstos. El gen *ARABIDOPSIS THALIANA HOMEODOMAIN-8 (ATHB-8)*, cuyo producto es un factor de transcripción de la subfamilia III HD-ZIP, se expresa en el procámbium del embrión y de los órganos en desarrollo (Baima *et al.*, 1995; 2001). Otros genes de esta familia también se expresan específicamente en los tejidos vasculares, como *VASCULAR ASSOCIATED HOMEODOMAIN1 (VAHOX1)*, que lo hace en el floema durante el desarrollo secundario de *Lycopersicon esculentum* (Torneró *et al.*, 1996), y *PRHA*, en los tejidos vasculares en desarrollo de *Arabidopsis thaliana* (Plesch *et al.*, 1997). El producto del gen *VASCULAR HIGHWAY1 (VH1)* de *Arabidopsis thaliana* es un receptor de la familia LRR de quinasas que participa en la diferenciación espacial y temporal de las células del procámbium en respuesta a las señales que inducen su diferenciación (Clay y Nelson, 2002).

Son varios los mutantes que presentan un patrón de venación alterado cuyo fenotipo se ha asociado a ciertas deficiencias en el transporte polar de las auxinas. Tal es el caso de las mutaciones recesivas *monopteros (mp)*; Przemeczek *et al.*, 1996) y *lopped1 (lop1)*; Carland y McHale, 1996), cuyos homocigotos presentan una tasa de transporte polar de auxinas inferior a la silvestre. Éstos y otros estudios sugieren que la auxina (el ácido indol-acético; IAA) es la señal inductora del patrón vascular, ya que su distribución en las hojas en desarrollo coincide con la de las células vasculares (Avsian-Kretschmer *et al.*, 2002). Se ha demostrado además que las alteraciones en el transporte polar de las auxinas perturban el desarrollo de la venación (Mattsson *et al.*, 1999; Sieburth *et al.*, 1999).

I.4.5.5.- El cambio de fase

Durante el desarrollo vegetativo de las plantas pueden distinguirse dos fases con características morfológicas y fisiológicas específicas: la fase juvenil y la adulta. En esta última el meristemo apical del tallo adquiere la capacidad de responder a los estímulos que inducen la floración (Conway y Poethig, 1993). La transición entre la fase juvenil y la adulta es gradual a lo largo del desarrollo vegetativo y recibe la denominación de cambio de fase (*vegetative phase change*).

Arabidopsis thaliana, al igual que muchas otras plantas, presenta heteroblastia, nombre que recibe la existencia de diferencias morfológicas entre hojas vegetativas sucesivas. Tales diferencias dependen de la edad del meristemo del que se originan los correspondientes primordios foliares (Röbbelen, 1957; Telfer *et al.*, 1997), que a su vez se debe a cambios en la identidad del meristemo apical del tallo y a influencias hormonales (Kerstetter y Poethig, 1998). Las primeras hojas juveniles son pequeñas, redondeadas, de margen entero y de filotaxia decusada u opuesta (cada 180°), y presentan pocos tricomas en el haz y ninguno en el envés (Telfer y Poethig, 1994). En la fase adulta, las hojas se disponen según una filotaxia espiral, cada 139,5°, son espatuladas y con el margen aserrado, y se atenúa la demarcación entre el peciolo y el limbo, a la vez que aparecen progresivamente tricomas en el envés y se incrementa su densidad en el haz (Medford *et al.*, 1992). La aparición de tricomas en la epidermis abaxial de las hojas vegetativas puede utilizarse como un marcador fenotípico del cambio de fase en *Arabidopsis thaliana*, aunque este carácter depende tanto de la estirpe silvestre como de las condiciones del fotoperiodo (Telfer *et al.*, 1997).

En *Arabidopsis thaliana*, las mutaciones recesivas *extra cotyledon1 (xtc1)*, *xtc2* y *altered meristem programming1 (amp1)* transforman las primeras hojas juveniles en estructuras similares a cotiledones (Conway y Poethig, 1997). En los mutantes *leafy cotyledon (lec)*, por el contrario, los cotiledones presentan algunas de las características de las hojas vegetativas, como su patrón de venación complejo (Meinke, 1992). En el mutante *paused (psd)* (Telfer *et al.*, 1997), la iniciación de las hojas está retrasada respecto de la silvestre, y las primeras hojas que se producen presentan características fenotípicas adultas. En base a esta observación, se ha propuesto que los rasgos heteroblásticos que distinguen a las hojas juveniles de las adultas podrían estar controlados independientemente (Tsukaya *et al.*, 2000). Algo similar ocurre en los mutantes *wus* (véase el apartado I.4.2, en la página 18), que carecen de hojas juveniles (Hamada *et al.*, 2000).

En el maíz, las fases juvenil y adulta del desarrollo vegetativo pueden distinguirse en función de algunas características de la epidermis foliar, como la presencia de ceras en las hojas juveniles y de pelos epidérmicos en las adultas (Freeling y Lane, 1994; Bongard-Pierce *et al.*, 1996). Se han descrito varias mutaciones heterocrónicas recesivas que prolongan el periodo de expresión de los rasgos juveniles y retrasan la aparición de los adultos. Tal es el caso de los mutantes enanos y deficientes en giberelinas *an1*, *dwarf1* (*d1*), *d3*, *d5* (Evans y Poethig, 1995) y *viviparous8* (*vp8*; Evans y Poethig, 1997). Las mutaciones dominantes de ganancia de función *Teopod1* (*Tp1*), *Tp2*, *Tp3* y *Corngrass* (*Cg*) prolongan el periodo de expresión de los rasgos juveniles, lo que sugiere que estos genes promueven el desarrollo juvenil participando en una ruta independiente de la que corresponde a los caracteres adultos (Poethig, 1988). Otras dos mutaciones dominantes del maíz, *Hairy sheath frayed-O* (Bertrand-García y Freeling, 1991) y *Lax midrib-O* (Schichnes *et al.*, 1997), afectan no sólo a la expresión de los marcadores del cambio de fase, sino también a otros aspectos de la morfogénesis foliar, por lo que no se consideran específicas del cambio de fase.

En el mutante heterocrónico *mori1* del arroz, que manifiesta únicamente caracteres juveniles, parece no inducirse la fase adulta, lo que sugiere la implicación del gen *MOR1* en el cambio de fase (Asai *et al.*, 2002). Por el contrario, las mutaciones recesivas en el gen *GLOSSY15* (*GL15*) del maíz causan la transformación de la epidermis foliar juvenil en adulta, sin alterar la morfología de la hoja o el desarrollo del tallo (Evans *et al.*, 1994; Moose y Sisco, 1994). *GL15* es una proteína con un dominio de unión a ADN, similar al de *APETALA2/EREBP* de *Arabidopsis thaliana* (Moose y Sisco, 1996), que está aparentemente implicada en la inducción del desarrollo juvenil.

Las mutaciones recesivas en el gen *EARLY PHASE CHANGE* (*EPC*; Vega *et al.*, 2002) fueron identificadas porque acortaban la fase juvenil, así como por su floración temprana. La función más verosímil de *EPC* es la de promover la fase juvenil del desarrollo e inhibir la adulta, aunque también parece implicado en el mantenimiento del meristemo caulinar y la iniciación foliar, entre otros procesos (Vega *et al.*, 2002).

En *Arabidopsis thaliana*, la administración de giberelinas induce la aparición prematura de tricomas en la epidermis abaxial (Chien y Sussex, 1996). El mutante *spindly* (*spy*; Jacobsen y Olszewski, 1993) presenta respuesta constitutiva a las giberelinas, floración temprana y una densidad incrementada de tricomas en la epidermis abaxial de sus primeras hojas (Telfer *et al.*, 1997). Por otro lado, las mutaciones en el gen *SERRATE* (*SE*), cuyo producto es una proteína con dedos de zinc (Prigge y Wagner, 2001), hacen aparecer rasgos adultos en las primeras hojas vegetativas, lo que se ha

interpretado también como una alteración en el cambio de fase (Clarke *et al.*, 1999; Serrano-Cartagena *et al.*, 1999).

Los mutantes *hasty* (*hst*), también denominados *incurvata3* (*icu3*; Serrano-Cartagena *et al.*, 2000), presentan hojas vegetativas recurvadas hacia el haz y floración temprana (Telfer y Poethig, 1998). Manifiestan prematuramente caracteres adultos, como la presencia de tricomas abaxiales en sus hojas juveniles y una mayor sensibilidad a la inducción de la floración causada por la expresión constitutiva del gen *LEAFY* (Telfer y Poethig, 1998). HST es una proteína homóloga a los transportadores nucleares MSN5 de levadura y la exportina-5 de *Homo sapiens*. Se ha demostrado la presencia de HST en la membrana nuclear y su implicación en el transporte de moléculas desde el núcleo al citoplasma (Bollman *et al.*, 2003).

Los mutantes *squnt* (*sqn*) presentan tricomas abaxiales en las hojas juveniles, el momento de su floración es normal (Berardini *et al.*, 2001) e interaccionan de forma sinérgica con *hst* (Bollman *et al.*, 2003). SQN es homóloga a la ciclofilina 40 (CyP40), una proteína que puede interaccionar con el complejo multiproteico de la chaperona Hsp90 de levaduras y mamíferos, implicado en la activación del receptor intracelular de esteroides. Estos resultados sugieren que SQN se requiere para la activación de la fase juvenil del desarrollo vegetativo (Berardini *et al.*, 2001).

Se han identificado otros genes implicados en el cambio de fase, que pueden clasificarse en: (a) los que participan también en la inducción de la floración, muchos de los cuales están relacionados con la síntesis de las giberelinas (*D1*, *D3* y *D5* del maíz; *GA1*, *GA4* y *GA5* de *Arabidopsis thaliana*) o en la transducción de la señal de éstas (*VP8* del maíz; *SE* y *SPY* de *Arabidopsis thaliana*), (b) aquéllos cuyas mutaciones alteran la duración de la fase adulta sin modificar la juvenil, como *INDETERMINATE* (*ID*) del maíz, cuyo producto regula la producción de un factor difusible requerido para la floración (Colasanti *et al.*, 1998), y (c) aquéllos cuyas mutaciones alteran la duración de la fase juvenil pero no la adulta, como *EPC* o *GL15* del maíz y *HST* o *SQN* de *Arabidopsis thaliana*. En esta última clase se incluiría también *EARLY FLOWERING1* (*EAF1*; Scott *et al.*, 1999) de *Arabidopsis thaliana*, cuyas mutaciones producen un fenotipo similar al de los mutantes *hst*.

I.4.5.6.- Otros aspectos del desarrollo foliar

El análisis detallado de los mutantes afectados en la biogénesis de los cloroplastos sugiere que el desarrollo normal del mesófilo foliar parece estar íntimamente ligado al de estos orgánulos. El mutante *arc6* de *Arabidopsis thaliana*, que manifiesta

anomalías en la división de los cloroplastos de las células del mesófilo, presenta una roseta menor que la silvestre y sus hojas están recurvadas hacia el envés (Pyke *et al.*, 1994; Robertson *et al.*, 1995). Otros mutantes con alteraciones en la biogénesis de los cloroplastos, como *CAB protein-underexpressed* (*cue*; Li *et al.*, 1995; López-Juez *et al.*, 1998), *differential development of vascular associated cells* (*dov*; Kinsman y Pyke, 1998) y *pale cress* (*pac*; Reiter *et al.*, 1994) presentan también alteraciones severas de la estructura del mesófilo. En el mutante *defective chloroplast and leaf* del tomate (*dcl*; Keddie *et al.*, 1996), las células del mesófilo en empalizada no se expanden correctamente, lo que altera la morfología foliar.

Algunos mutantes con anomalías en la diferenciación de la epidermis presentan fusión de órganos. Uno de ellos, *fiddlehead* (*fdh*), muestra fusiones entre hojas y entre algunos órganos florales (Lolle *et al.*, 1992). El producto de este gen es una enzima implicada en la síntesis de los ácidos grasos de cadena larga de la cutícula, por lo que sus mutaciones podrían alterar la composición lipídica de la epidermis (Yephremov *et al.*, 1999; Pruitt *et al.*, 2000). Por su parte, el producto del gen *LACERATA* (*LCR*), cuyas mutaciones también causan fusiones de órganos, es una citocromo P450 hidroxilasa, CYP86A8, que cataliza la ω -hidroxilación de ácidos grasos (Wellesen *et al.*, 2001). Las mutaciones recesivas en los genes *ADHERENT1* y *ADHERENT2* del maíz producen también fusiones de órganos mediante un mecanismo similar al de los mutantes *fdh* de *Arabidopsis thaliana* (Neuffer *et al.*, 1997; Sinha, 1998). Se han aislado otros 29 mutantes que muestran fusiones de órganos en *Arabidopsis thaliana* y que corresponden a 9 genes (Lolle *et al.*, 1998). Pertenecen a este grupo los mutantes *abnormal leaf shape1* (*ale1*), que presentan alteraciones en la cutícula de la epidermis foliar y fusión de las hojas juveniles. ALE1 es una proteasa de serina de la subfamilia de las subtilisinas que se expresa en el endospermo del embrión y que se requiere para el desarrollo de la cutícula embrionaria (Tanaka *et al.*, 2001). A diferencia de los anteriores, en el mutante *crinkly4* (*cr4*) del maíz, que también muestra fusión de órganos foliares, la diferenciación, el tamaño y la morfología de las células de la epidermis están alterados como consecuencia de una aparente pérdida de su identidad celular (Becraft *et al.*, 1996). El producto de *CR4* es una quinasa de proteínas con un dominio LRR que podría actuar como receptor de una señal extracelular inductora de la diferenciación de la epidermis (Becraft *et al.*, 1996; Jin *et al.*, 2000).

I.4.6.- Evolución de las hojas compuestas de las angiospermas

Existe una gran diversidad de morfologías foliares entre las angiospermas. Algunas son enteras como las del maíz, el arroz, *Arabidopsis thaliana*, el tabaco y *Antirrhinum majus*, otras son lobuladas como las del algodón, y otras compuestas como las del tomate, el guisante y la zanahoria.

Las hojas compuestas, tanto las de las monocotiledóneas como las de las dicotiledóneas, son estructuras de crecimiento determinado cuyo limbo está dividido en varias unidades repetidas que reciben el nombre de foliolos, que se disponen sobre una estructura central denominada raquis (Steeves y Sussex, 1989; Sinha, 1997; Bharathan y Sinha, 2001). Está en discusión si las hojas simples de las dicotiledóneas derivan de las de un ancestro con hojas compuestas (Hagemann, 1984) o si, alternativamente, éste presentaba hojas simples (Earnes, 1961). El registro fósil sugiere que la estructura foliar del ancestro de las angiospermas fue simple (Doyle, 1998) y que las hojas compuestas aparecieron independientemente en varias familias (Goliber *et al.*, 1999). En algunas familias, como en las Asteráceas, en las Brasicáceas y en las Solanáceas, existen especies relacionadas del mismo género, como *Solanum nigrum* y *Solanum lycopersicoides*, que presentan hojas simples y compuestas, respectivamente. Por otro lado, algunas especies acuáticas son heterofilicas, presentando hojas simples y compuestas en la misma planta (Allsopp, 1965).

El tomate (*Lycopersicon esculentum*) es una Solanácea con hojas compuestas que presentan varias parejas de foliolos lobulados en su región basal y un único foliolo terminal. Las mutaciones dominantes *Mouse-ear* (*Me*) y *Petroselinum* (*Pts*) y las recesivas *bipinnate* (*bip*), *tripinnate* (*tp*) y *clausa* (*clau*) hacen aparecer hojas compuestas más complejas que las silvestres. Por su parte, las mutaciones *Lanceolate* (*La*), *entire* (*e*) y *trifoliolate* (*tf*) reducen el número de foliolos. Otras mutaciones, como *solanifolia* (*sf*) o *potato leaf* (*c*), determinan la aparición de foliolos no lobulados (revisado en Sinha, 1997).

Los genes *KNOX* de la clase I (como *STM* de *Arabidopsis thaliana*, o *RS1* y *KN1* del maíz; véase el apartado I.4.5.1, en la página 30) desempeñan una función fundamental en la iniciación y el mantenimiento del meristemo apical del tallo (revisado en Barton, 2001; véase el apartado I.4.5.1, en la página 30). Estos genes se expresan en el meristemo apical del tallo de las plantas con hojas simples, pero no en los primordios foliares. Su expresión constitutiva en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* hace aparecer hojas lobuladas (Chuck *et al.*, 1996; Ori *et al.*, 2000; véase el apartado I.4.5.1, en la página 30). Sin embargo, los genes *KNOX* de la clase I del tomate, *LeT6* y *TKN1*, se expresan tanto en el meristemo apical del tallo como en los primordios foliares.

Además, la expresión ectópica en las hojas del tomate del gen *KN1* del maíz o de *LeT6* del tomate hace que las hojas sean mucho más compuestas que las silvestres y similares a las de los mutantes *Me* o *Pts* (Hareven *et al.*, 1996; Janssen *et al.*, 1998). La expresión de los antes mencionados genes *KNOX* de la clase I en los primordios foliares del tomate parece ser una condición necesaria, pero no suficiente, para originar una hoja compuesta, ya que la expresión constitutiva de *KN1* en los mutantes *La* y *e* no da lugar a hojas compuestas, sino simplemente lobuladas.

El patrón de expresión del gen *PHAN* de *Antirrhinum majus* y el de su ortólogo en el maíz, *RS2* (véase el apartado I.4.5.1, en la página 30), son complementarios del de *STM1* (Waites *et al.*, 1998). Tanto *PHAN* como *RS2* reprimen la expresión de los genes *KNOX* de la clase I en las hojas (véase el apartado I.4.5.1, en la página 30; Timmermans *et al.*, 1999; Tsiantis *et al.*, 1999a).

Las hojas compuestas del guisante (*Pisum sativum*), una Fabácea, son alternas y presentan heteroblastia. Las hojas adultas presentan una morfología característica a lo largo de su eje proximodistal, con dos estípulas basales y varias parejas de folíolos laterales a lo largo del raquis. Presenta además dos zarcillos laterales en la zona distal del raquis, y otro terminal (revisado en Hofer y Ellis, 1998). Algunas mutaciones recesivas alteran la estructura de la hoja del guisante a lo largo de su eje proximodistal, como *tendril-less* (*tl*), *afila* (*af*) y *cochleata* (*coch*), dado que transforman, respectivamente, los zarcillos en folíolos, los folíolos en zarcillos, y las estípulas en hojas compuestas (Hofer y Ellis, 1998). Las mutaciones *unifoliata* (*uni*) transforman las hojas compuestas en simples. El gen *UNIFOLIATA* (*UNI*, también llamado *PEAFLO*; Hofer *et al.*, 1997), el ortólogo de *FLORICAULA* (*FLO*) de *Antirrhinum majus* y *LEAFY* (*LFY*) de *Arabidopsis thaliana*, es necesario para el mantenimiento del estado indeterminado de los meristemas florales (Coen *et al.*, 1990; Weigel *et al.*, 1992). A diferencia de *FLO* y *LFY*, *UNI* se expresa en los primordios foliares y se restringe después a las zonas más distales de éstos, asegurando así la correcta iniciación de los folíolos (Hofer *et al.* 1997). El gen *UNI* se expresa de forma constitutiva en los mutantes *tl*, *af* y *coch*, por lo que se ha sugerido que los genes *TL*, *AF* y *COCH* participan en el establecimiento de la identidad de las estructuras del eje proximodistal de la hoja, regulando la expresión de *UNI*. En las hojas compuestas del guisante tampoco se expresan los genes *KNOX* de la clase I tal como ocurre en las plantas de hojas simples, como *Arabidopsis thaliana* o el maíz (Gourlay *et al.*, 2000).

Las mutaciones en el gen *STAMINA PISTILLOIDA* (*STP*, también llamado *PEAFIM*) reducen la complejidad de la hoja del guisante. *STP* es el ortólogo de *FIMBRIATA* (*FIM*) de *Antirrhinum majus* y *UNUSUAL FLORAL ORGANS* (*UFO*) de

Arabidopsis thaliana, que especifican, junto con *FLO* y *LFY*, respectivamente, la identidad del meristemo floral en estas especies (Lee *et al.*, 1997). Los alelos *stp* interactúan sinérgicamente con las mutaciones *uni*, lo que sugiere que la expresión de *STP* es necesaria, junto con la de *UNI*, para el desarrollo de las hojas compuestas del guisante (Taylor *et al.*, 2001).

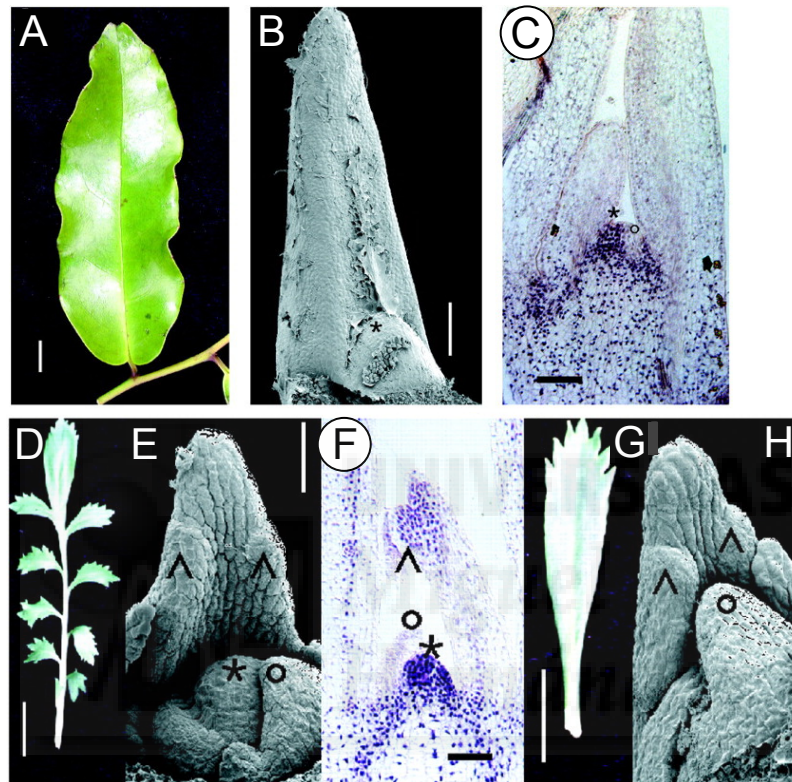


Figura 16.- Relación entre la morfología de las hojas, la de sus primordios y el patrón de expresión espacial de los genes *KNOX* de la clase I. Las imágenes corresponden a (A) una hoja simple de *Amborella trichopoda* y (B) su primordio. La proteína *KNOX*, indicada en azul, aparece en el meristemo apical del tallo pero no en el primordio (C). Hoja compuesta de *Lepidium hyssopifolium* (D) y detalle de su primordio (E). La proteína *KNOX* aparece en el meristemo apical del tallo y en los foliolos (F). Hoja aparentemente simple de *Lepidium oleraceum* (G), y detalle de su primordio, de morfología compleja (H). Los símbolos *, ° y ^ indican que la proteína *KNOX* aparece en el meristemo apical del tallo, falta en el primordio y está presente en los foliolos, respectivamente. Las barras de escala indican 1 cm (A, D y G), 50 μm (B, E y H) y 100 μm (C y F). Tomado, con algunas modificaciones, de Bharathan *et al.*, 2002.

El género *Lepidium* es un grupo de brasicáceas que incluye especies de hojas simples y otras de hojas compuestas. Se asume que sus ancestros presentaban hojas compuestas. En las especies de hojas simples, como *Lepidium africanum* o *Amborella trichopoda*, los genes *KNOX* de la clase I no se expresan en los primordios foliares

(Figura 16A-C), al igual que ocurre en *Arabidopsis thaliana*, mientras que en las de hojas compuestas, como *Lepidium hyssopifolium*, sí lo hacen (Figura 16D-F). Constituyen una excepción a lo anterior algunas especies de hojas simples, como *Lepidium oleraceum*, cuyos primordios foliares presentan una morfología compleja y actividad de los genes *KNOX* de la clase I (Figura 16G-H; Bharathan *et al.*, 2002). En la brassicácea acuática *Neobeckia aquatica*, que cuenta con hojas simples y compuestas, se ha observado una correlación directa entre la expresión de los genes *KNOX* de la clase I en los primordios foliares y la complejidad morfológica del órgano que generan (Bharathan *et al.*, 2002).





II.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

II.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

El desarrollo es un proceso complejo, cuyo estudio es de gran interés. La comprensión de los mecanismos genéticos que controlan el crecimiento y la morfogénesis de las plantas tiene una gran relevancia, tanto en su vertiente básica como en la aplicada. Por una parte, su estudio puede aportar conocimientos sobre los procesos del desarrollo que son específicos de las plantas y que las distinguen de los animales. Por otra, estos conocimientos facilitan la mejora de la calidad o la rentabilidad de las especies cultivables y de sus productos, útiles para las industrias alimentaria y farmacológica o como materiales de construcción.

Las hojas son órganos esenciales en las plantas, responsables de la productividad primaria en la biosfera. A pesar de su importancia, la información acerca de los procesos genéticos que controlan su desarrollo es relativamente escasa (Hake y Sinha, 1991; Smith y Hake, 1992; Sinha *et al.*, 1993a; Telfer y Poethig, 1994; Tsukaya, 1995; Hall y Langdale, 1996; Sylvester *et al.*, 1996; Poethig, 1997; Brutnell y Langdale, 1998; Howell, 1998b; Tsiantis y Langdale, 1998; Van Lijsebettens y Clarke, 1998; Pozzi *et al.*, 1999; Sinha, 1999; Scanlon, 2000b; Byrne *et al.*, 2001; Fleming, 2002; Tsukaya, 2002; Micol y Hake, 2003; Tsiantis y Hay, 2003).

Con la intención de contribuir a una mejor comprensión de los mecanismos genéticos que controlan el desarrollo vegetal, se está llevando a cabo, en el laboratorio de J.L. Micol, un análisis causal de la ontogenia de la hoja en el sistema modelo *Arabidopsis thaliana*. La forma y el tamaño de este órgano es el resultado de la división y la expansión de las células que constituyen el mesófilo, la epidermis adaxial y la abaxial. El crecimiento de las superficies del haz y el envés, que son equivalentes, debe estar coordinado por medio de algún mecanismo que se desconoce, cuya perturbación tendría como consecuencia una alteración de la forma plana de la hoja. En esta Tesis, que es parte de dicho intento de identificar genes implicados en el desarrollo de la hoja, se ha empleado como material de partida un grupo de mutantes que manifiestan alteraciones en la morfología foliar. Estos mutantes han sido aislados en el laboratorio de J.L. Micol y son candidatos a estar perturbados en genes implicados en el desarrollo de la hoja. Algunos de ellos fueron obtenidos mediante mutagénesis química, por tratamiento con metanosulfonato de etilo (Berná, 1997; Berná *et al.*, 1999; Robles y Micol, 2001), mientras que otros derivan de mutagénesis física, por bombardeo con neutrones rápidos (Robles, 1999; Robles *et al.*, en preparación) o fueron aislados a partir de una colección de estirpes portadoras de inserciones del ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens*.

Uno de los grupos de mutantes obtenidos son los pertenecientes a la clase fenotípica que se denominó Ultracurvata (*Ucu*), cuyos individuos se caracterizan por presentar hojas recurvadas hacia el envés y a lo largo de la vena primaria, a diferencia de sus equivalentes silvestres, que son órganos planos. Esta deformidad característica de las hojas de los mutantes *ucu* nos ha hecho considerarlos candidatos a estar dañados en genes que participan de algún modo en la dorsoventralidad foliar.

El primer objetivo que nos propusimos para esta Tesis fue la caracterización fenotípica de los mutantes *ucu*. Esto implica la descripción minuciosa de su arquitectura foliar, mediante la utilización de técnicas de microscopía que permitan estudiar a nivel celular las alteraciones causadas por las mutaciones *ucu*. Dada la pleiotropía del fenotipo de los mutantes *ucu*, lo anterior debe complementarse con el estudio de otros aspectos de su estructura corporal y de sus respuestas a determinadas variables ambientales y a la administración de fitohormonas, sustancias que es sabido participan en la regulación del crecimiento y el desarrollo de las plantas.

Otro objetivo de esta Tesis fue la identificación de los genes *UCU1* y *UCU2*, es decir, su clonación, que debía llevarse a cabo mediante un abordaje posicional. Su primera etapa es la cartografía de baja resolución de las mutaciones a estudio, que permite iniciar un análisis del ligamiento a marcadores moleculares que estrecha progresivamente las regiones candidatas a contener a los genes a estudio. Una vez identificados estos genes y determinada la naturaleza molecular de sus mutaciones, se debe confirmar su identidad mediante la restauración del fenotipo silvestre en los mutantes, transfiriéndoles transgenes que contengan alelos silvestres de los genes candidatos.

Una parte importante de la caracterización de los mutantes *ucu* consiste en el análisis de sus eventuales interacciones con otras mutaciones, previamente descritas, que perturban al proceso a estudio. Para ello, deben realizarse cruzamientos, entre los mutantes *ucu* y con otros, con el objetivo de obtener y estudiar dobles mutantes. La información derivada del estudio del fenotipo de estos dobles mutantes debiera permitir definir sus relaciones funcionales y proponer hipótesis acerca de la naturaleza de los genes *UCU* y su papel en el desarrollo de la hoja.



III.- MATERIALES Y MÉTODOS

III- MATERIALES Y MÉTODOS

III.1.- 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, 1996), según se detalla a continuación.

III.1.1.- Gramática y terminología

Se ha procurado seguir el Diccionario de la Lengua Española de la Real Academia Española [Vigésima segunda edición (2001). Espasa-Calpe, Madrid], el Vocabulario Científico y Técnico de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales [Tercera edición (1996). Espasa Calpe, Madrid] la Ortografía de la Lengua Española [Primera edición (2000). Espasa-Calpe, Madrid] y la Gramática de la Lengua Española [Emilio Alarcos (1994). Real Academia Española. 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, ésto se ha hecho sólo la primera de las veces en que se emplea una determinada palabra.

Algunas expresiones de uso común en los laboratorios o la literatura cuyo idioma predominante es el inglés son de difícil traducción al español, si se persigue la obediencia a una norma lingüística. Así, hemos empleado expresiones tales como 2×SSC por su fidelidad a las originales en inglés, en ausencia de una norma al respecto en nuestra lengua. Del mismo modo, se ha preferido utilizar en su forma original, aunque destacada en cursiva, términos para los que no se ha encontrado un equivalente razonable en español, tales como *ependorf* o *vortex*. Hemos estimado que el primero de estos vocablos es intraducible y que la traducción más verosímil para el segundo, “vórtice”, confundiría al lector más de lo que le informaría.

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.

III.1.2.- Abreviaturas, acrónimos y fórmulas químicas

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

cación 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 y la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, 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.

En esta memoria se emplean numerosas abreviaturas y acrónimos, la mayoría de los cuales se definen la primera vez que aparecen en el texto. Además, se han utilizado las abreviaturas siguientes, correspondientes en su mayoría a las unidades de medida empleadas, que son las del Sistema Internacional:

| | |
|---|-------------------------------|
| cm: centímetros. | MΩ: megaohmios. |
| cM: centimorgans. | N: normal. |
| dNTP: desoxinucleótido trifosfato. | ng: nanogramos. |
| <i>et al.</i> : <i>et alii</i> (y otros). | nm: nanometros. |
| g: gramos. | nM: nanomolar. |
| g: aceleración de la gravedad. | pb: pares de bases. |
| h: horas. | pg: picogramos. |
| kb: kilobases. | pm: picomoles. |
| kDa: kilodaltones. | pM: picomolar. |
| kg: kilogramos. | rpm: revoluciones por minuto. |
| l: litros. | s: segundos. |
| lx: luxes. | U: unidades enzimáticas. |
| m: metros. | UV: ultravioleta. |
| M: molar. | V: voltios. |
| mg: miligramos. | v/v: volumen/volumen. |
| min: minutos. | W: vatios. |
| ml: mililitros. | μg: microgramos. |
| mm: milímetros. | μJ: microjulios. |
| mM: milimolar. | μl: microlitros. |
| ms: milisegundos. | μm: micrómetros o micras. |
| m/v: masa/volumen. | μM: micromolar. |
| Mb: megabases. | °C: grados centígrados. |
| mb: milibares. | |

III.1.3.- Citas bibliográficas

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 aquél en el 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.

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.

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

La nomenclatura que se aplica en esta memoria a genes, mutaciones y fenotipos nuevos se atiene estrictamente a las pautas propuestas para *Arabidopsis thaliana* por Meinke y Koornneef (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 los mutantes estudiados en esta Tesis presentan el fenotipo Ultracurvata (Ucu), habiéndose definido, mediante análisis de complementación, dos genes *ULTRACURVATA* (*UCU*), uno de los cuales es *UCU1*, del que se han descrito tres alelos mutantes, numerados como *ucu1-1*, *ucu1-2* y *ucu1-3*. El producto del gen *UCU1* es la proteína UCU1.

III.3.- Estirpes utilizadas en este trabajo

III.3.1.- Estirpes de *Arabidopsis thaliana*

III.3.1.1.- Estirpes silvestres

En esta Tesis se han empleado dos estirpes silvestres de *Arabidopsis thaliana*: Landsberg *erecta* (Ler) y Columbia-0 (Col-0), cuyos números de catálogo del NASC son NW20 y N1092, respectivamente.

III.3.1.2.- Estirpes mutantes

Las estirpes mutantes empleadas en esta Tesis pueden clasificarse en dos grupos, en función de su origen y utilización. El primero de ellos incluye aquellas estirpes aisladas y caracterizadas parcialmente por autores anteriores, que fueron empleadas para realizar los análisis de complementación y para la obtención de algunos dobles mutantes. Todas estas estirpes mutantes se describen en la Tabla 6, con indicación de su procedencia.

Tabla 6.- Mutantes aislados por autores anteriores, que se han empleado en los ensayos de alelismo y de interacciones genéticas

| Estirpe | Alelo | Gen dañado por la mutación | Rasgos destacables | Referencia |
|---------|------------------------------------|---|---|------------|
| CS6159 | <i>det2-1</i> | <i>DE-ETIOLATED2</i> | Deficiente en brasinosteroides | 2 |
| CS8100 | <i>dim-1</i> | <i>DIMINUTO</i> | Deficiente en brasinosteroides | 3 |
| CS3723 | <i>bri1-1</i> | <i>BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1</i> | Insensible a los brasinosteroides | 4 |
| CS3077 | <i>axr2-1</i> | <i>AUXIN RESISTANT2</i> | Resistente a las auxinas | 5 |
| N345 | <i>icu1-3</i> (<i>clf-18</i>) | <i>INCURVATA1</i> (<i>CURLY LEAF</i>) | Incurvata. Desrepresión ectópica del gen AG | 1, 6 |
| N329 | <i>icu2</i> | <i>INCURVATA2</i> | Incurvata | 1 |
| N314 | <i>icu3-1</i> (<i>hst-5</i>) | <i>INCURVATA3</i> (<i>HASTY</i>) | Incurvata | 1, 7 |
| N400 | <i>icu4-1</i> | <i>INCURVATA4</i> | Incurvata | 1 |
| N379 | <i>icu5</i> | <i>INCURVATA5</i> (<i>SUPPRESSOR OF HY2</i>) | Incurvata. Resistente a las auxinas | 1, 8 |
| CS3151 | | | Tetraploide | 9 |
| CS62 | <i>ga5-1</i> | <i>GIBERELLIN REQUIRING5</i> | Deficiente en giberelinas | 10 |
| N3074 | <i>aux1-7</i> | <i>AUXIN-HERBICIDE RESISTANT1</i> | Transporte de las auxinas alterado | 11 |

¹Serrano-Cartagena (1998); ²Li *et al.* (1996); ³Takahashi *et al.* (1995); ⁴Clouse *et al.* (1996); ⁵Wilson *et al.* (1990); ⁶Goodrich *et al.* (1997); ⁷Telfer y Poethig (1998); ⁸Tian y Reed (1999); ⁹Depositado por G. Rédei en el ABRC; ¹⁰Talon *et al.* (1990); ¹¹Bennett *et al.* (1996).

La Tabla 7 describe el segundo grupo de estirpes empleado, que incluye mutantes con hojas anormales que habían sido aislados previamente en el laboratorio de J.L. Micol (Berná, 1997; Berná *et al.*, 1999; Robles, 1999; Robles y Micol, 2001).

Tabla 7.- Mutantes obtenidos en el laboratorio de J.L. Micol que se han empleado en esta Tesis

| Estirpe | Alelo | Gen dañado por la mutación | Rasgos destacables | Referencia |
|----------|-------------------------|--------------------------------------|--------------------|------------|
| P2 46.8 | <i>ucu2-1</i> | <i>ULTRACURVATA2</i> | Ultracurvata | 1 |
| CS3397 | <i>ucu2-2</i> | <i>ULTRACURVATA2</i> | Ultracurvata | 1, 5 |
| P18.3 | <i>ucu2-3</i> | <i>ULTRACURVATA2</i> | Ultracurvata | 5 |
| N512836 | <i>ucu2-4</i> | <i>ULTRACURVATA2</i> | Ultracurvata | 5 |
| P1 4.5 | <i>ucu1-1</i> | <i>ULTRACURVATA1</i> | Ultracurvata | 2 |
| P9 36.1 | <i>ucu1-2a</i> | <i>ULTRACURVATA1</i> | Ultracurvata | 2 |
| P9 42.1 | <i>ucu1-2b</i> | <i>ULTRACURVATA1</i> | Ultracurvata | 2 |
| P14 12.1 | <i>ucu1-3</i> | <i>ULTRACURVATA1</i> | Ultracurvata | 2 |
| P10 16.4 | <i>icu7-1</i> | <i>INCURVATA7</i> | Incurvata | 2 |
| P8 49.6 | <i>icu9-1 (ago1-51)</i> | <i>INCURVATA9 (ARGONAUTE1)</i> | Incurvata | 2 |
| P10 37.1 | <i>tcu1-1a</i> | <i>TRANSCURVATA1</i> | Transcurvata | 2 |
| P14 20.1 | <i>tcu2-1b</i> | <i>TRANSCURVATA2</i> | Transcurvata | 2 |
| P14 2.2 | <i>tcu3-1a</i> | <i>TRANSCURVATA3</i> | Transcurvata | 2 |
| P12 32.1 | <i>as2-11</i> | <i>ASYMMETRIC LEAVES2</i> | Hojas asimétricas | 2 |
| N3c | <i>sañ5 (abi4-2)</i> | <i>SALOBREÑO5 (ABA INSENSITIVE4)</i> | Insensible al ABA | 3, 4 |

¹Robles (1999); ²Berná (1997); ³Quesada (1999); ⁴Finkelstein *et al.* (1998); ⁵esta Tesis.

III.3.2.- Estirpes bacterianas

En esta Tesis se han usado estirpes de *Escherichia coli* portadoras de clones BAC (*Bacterial artificial chromosomes*; Shizuya *et al.*, 1992) procedentes de dos genotecas de ADN genómico distintas. Hemos utilizado los clones BAC F28J12, F28A21 y F13C5 de la genoteca IGF, obtenida en el Institut für Genbiologische Forschung Berlin GmbH y construida con el vector pBeloBAC-Kan, que confiere resistencia a kanamicina, en la estirpe DH10B de *Escherichia coli* (Mozo *et al.*, 1998; 1999). El clon MIL23 pertenece a la genoteca Mitsui P1 obtenida en el Kazusa DNA Research Institute (<http://www.kazusa.or.jp/kaos/>), que fue construida usando el vector P1 pAd10sacB(I), empaquetado *in vitro* en bacteriófagos que se utilizaron para infectar *Escherichia coli* (Liu

et al., 1995). Las estirpes bacterianas empleadas en este trabajo se recogen en la Tabla 8, así como algunos aspectos relevantes de su genotipo.

Tabla 8.- Estirpes bacterianas utilizadas en este trabajo

| Especie | Estirpe | Parte relevante de su genotipo | Utilidad |
|-----------------------|----------------------|---|---|
| <i>E. coli</i> | DH5 α | <i>endA1</i> | Mejora la calidad del ADN plasmídico en las minipreparaciones |
| | | <i>recA1</i> | Reduce la recombinación |
| | DH10B | <i>endA1 recA1</i> ϕ 80d/ <i>lacZ</i> Δ M15 <i>deoR</i> | Selección de colonias blancas/azules en presencia de X-Gal e IPTG Permite la clonación de fragmentos de ADN de gran tamaño |
| <i>A. tumefaciens</i> | C58C1 ¹ | | |
| | LBA4404 ² | pAL4404 | Incorpora un plásmido Ti que sólo incluye los genes <i>vir</i> necesarios para la transferencia del ADN-T a la planta |

¹Zambryski *et al.* (1983); ²Hoekema *et al.* (1983).

III.3.3.- Conservación de estirpes

Las semillas de las estirpes mutantes y silvestres de *Arabidopsis thaliana* utilizadas en esta Tesis se almacenaron en tubos *ependorf* que se conservaron a 4°C, comprobándose la viabilidad de las semillas, en caso necesario, cada dos años.

Las estirpes bacterianas se han conservado a -80°C. Para ello, se realizaron cultivos en medio líquido, en presencia de los antibióticos necesarios (véase el apartado III.5.1.2.1, en la página 75), y se tomaron a continuación 800 μ l de cada uno de ellos en un tubo *ependorf*, que se mezclaron mediante agitación en un *vortex* con 200 μ l de glicerol esterilizado en autoclave, para congelarlos finalmente por inmersión en nitrógeno líquido.

III.4.- Cultivos

III.4.1.- 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. Los cultivos se llevaron a cabo en caja de Petri o en maceta.

III.4.1.1.- Cultivo en caja de Petri

La mayoría de los cultivos fueron iniciados en cajas de Petri de 15 cm de diámetro, que contenían unos 100 ml de medio sólido GM (véase el apartado III.5.1.1.2, en la página 73). La siembra de las semillas de *Arabidopsis thaliana* se llevó a cabo tras su esterilización por inmersión con agitación, durante 10 min, en una disolución acuosa del 40% en lejía comercial (NaClO al 4-5% m/v) y 3 μ l/ml de una disolución del 1% v/v en Triton X-100, y realizando a continuación tres lavados sucesivos con agua estéril.

La siembra en cajas de Petri se llevó a cabo con material estéril, en una cabina de flujo laminar horizontal. Se sembraron unas 100 semillas por caja de Petri, con la ayuda de una pipeta Pasteur. Para ello, se tomaron semillas en suspensión acuosa y se depositaron de una en una sobre la superficie del medio de cultivo, en las posiciones indicadas por una retícula dibujada en un papel dispuesto debajo de la caja de Petri. Tras su siembra, las cajas 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 durante 24 h en posición invertida, a 4°C y en la oscuridad, con el fin de sincronizar su germinación, tras lo que fueron incubadas a 20 \pm 1°C y 60-70% de humedad relativa, bajo iluminación continua de unos 7.000 lx de luz blanca, suministrada por tubos fluorescentes Sylvania Standard F20W/133-RS Cool White (en cámaras de cultivo Conviron TC16) y Sylvania 160 W F72T12 CW VHO Cool White o Philips F72T12/D/VHO 160 W 1500 SF (en una cámara 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.

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.

III.4.1.2.- Cultivo en maceta

Los cultivos en maceta se efectuaron en bandejas de plástico de 28 \times 50 cm, con 42 alveolos, cada uno de ellos de 5 \times 5 cm (diámetro \times altura), introducidas en cubetas de unos 7 cm de profundidad. En algunos casos se utilizaron cubetas de tamaños inferiores, con bandejas de 25 u 8 alveolos. Se empleó como sustrato una mezcla de perlita (granulometría de 1 a 3 mm; 105-125 kg/m³), vermiculita (granulometría de 0 a 3 mm; 80-100 kg/m³) 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 una proporción volumétrica 2:2:1. Las bandejas de alveolos estuvieron permanentemente subirrigadas, manteniéndose un nivel de unos 2-3 cm de agua corriente 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 (véase el apartado III.5.1.1.1, en la página 73).

Cada alveolo se destinó al cultivo de una sola planta, que en la mayoría de los casos fue transplantada, con ayuda de unas pinzas, desde la caja de Petri en la que había permanecido durante las primeras tres semanas de su ciclo de vida. En algunos casos se sembraron las semillas directamente sobre el sustrato de cultivo en maceta, sin su esterilización previa. Se introdujo en cada alveolo, previamente a su rellenado con el sustrato, una maceta de rejilla de 5 × 5 cm (diámetro × altura). Las macetas de rejilla impiden que el sustrato se adhiera al alveolo, facilitando la extracción de las plantas para la realización de cruzamientos o la recolección de semillas. Estos cultivos permanecieron cubiertos con un plástico transparente, en el que se realizaron algunos agujeros a fin de evitar una excesiva condensación de agua, durante 3 o 6 días, según se tratase de trasplantes o siembras, respectivamente. Cuando se produce el alzado (*bolting*) y la elongación de los entrenudos al término de la etapa vegetativa, se aísla a las plantas transplantadas enfundándolas con cilindros de plástico transparente, denominados aracones (*aracons*; Beta Tech) que impiden el contacto entre individuos adyacentes y facilitan la recolección de las semillas.

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 F72T12/D/VHO 160 W 1500 SF, totalizando 7.000 lx. A partir del momento en que la floración se interrumpe, y no se desarrollan más flores, se suspende el riego, facilitándose así el secado de las plantas, que son mantenidas en la cámara de cultivo dos semanas más, al menos, para proceder finalmente a la recolección de sus semillas.

III.4.1.3.- Cruzamientos y recolección de semillas

En *Arabidopsis thaliana*, las flores se agrupan en los ápices de los tallos inflorescentes, encontrándose los capullos florales más maduros en el exterior y los más jóvenes en el centro de la inflorescencia. Hemos seguido el procedimiento de emasculación descrito por Kranz y Kirchheim (1987) para la realización de cruzamientos entre estirpes distintas, una de las cuales se usa como donante y la otra como receptora

de polen (parentales masculino, ♂, y femenino, ♀, respectivamente). Este método se basa en el hecho de que en *Arabidopsis thaliana* el pistilo madura antes que las anteras. 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 con el pistilo de la flor receptora del polen. El cruzamiento se señala adheriendo al tallo, junto a la flor recién fecundada, 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 *ependorf* adecuadamente etiquetado.

Para la recolección de todas las semillas de una planta seca, producto de su autofecundación, se presiona ésta con ambas manos, 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 cuyo tamaño sea superior al de las semillas.

III.4.1.4.- Control y erradicación de plagas

El control de los parásitos habituales en las 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*, dentro de la sección *Protocols*, del servidor de web del NASC (<http://nasc.nott.ac.uk>).

Se emplearon distintos aerosoles insecticidas de amplio espectro, como Biokill (Permetrina al 0,25%; Zelnova), Raid (Tetrametrina al 0,32% y D-fenotrina al 0,07%; Johnson), Casa Jardín (Tetrametrina al 0,3% y D-fenotrina al 0,1%; Zelnova) y Pryca antimosquitos (Pinamin forte al 6%), siempre que se consideró necesario, una vez por

semana. Ante la aparición de algunos parásitos concretos, se incorporaron al agua de riego sustancias específicas como el Mesurol (Methocarb, 2 g/l; Bayer) para el exterminio de los trips (*thrips*, insectos del orden de los Tisanópteros). Para la erradicación de los esciáridos (*mushroom flies*, insectos del orden de los Dípteros) se empleó un larvicida, Basudin EW (Diazinon al 60%, 0,5 ml/l; Ciba-Geigy), y un adulticida, Atominal 10 EC (Piriproxifen al 10%, 1 ml/l; Massó). Para la eliminación de los esciáridos adultos se emplearon también hojas adhesivas de color amarillo intenso (Atrapaxon; Projar).

III.4.2.- Condiciones de los cultivos microbianos

Los cultivos líquidos se realizaron en recipientes estériles, cuya capacidad excedía al menos 5 veces el volumen de medio utilizado, garantizando así una aireación suficiente durante la incubación. Salvo que se indique lo contrario, se empleó una agitación de 225 rpm en un incubador dotado de una plataforma orbital (NBS Innova 4000 o 4260) que se mantenía a 28 o 37°C según se tratase de *Agrobacterium tumefaciens* o *Escherichia coli*, respectivamente.

La inoculación de cultivos en cajas de Petri con medio sólido se llevó a cabo, según los casos, mediante un asa de siembra o utilizando agar de cobertera (véase el apartado III.5.1.2.2, en la página 75). Fueron incubados durante el tiempo necesario a las mismas temperaturas que los cultivos líquidos.

III.5.- Disoluciones

En este apartado se detallan los medios de cultivo y disoluciones de uso general empleados en este trabajo. Las disoluciones utilizadas exclusivamente en un tipo de experimento se detallan al describir éste. 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 desionizada, con una resistividad media de 15 M Ω por cm, y las disoluciones se conservaron a temperatura ambiente, salvo que se indique lo contrario.

III.5.1.- Medios de cultivo

Los medios de cultivo mencionados en este apartado han sido preparados disolviendo sus componentes en agua. Todas las esterilizaciones en autoclave se efectuaron a 1 kg/cm² y 121°C durante 20 min. Las sustancias termolábiles fueron esterilizadas mediante filtración forzada por aspiración, a través de filtros Millipore de 0,22

o 0,45 μm de diámetro de poro. Su adición a un medio de cultivo esterilizado en autoclave se realizó después de que este último fuera estabilizado a 55°C.

III.5.1.1.- Medios de cultivo para *Arabidopsis thaliana*

III.5.1.1.1.- Medios de cultivo líquidos

Medio mínimo ATM: KNO_3 5 mM; KH_2PO_4 2,5 mM; MgSO_4 2 mM; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 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 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 1 M; 2 ml de FeNaEDTA 20 mM y 1 ml de la disolución de micronutrientes, ajustando el volumen final 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 la siguiente: 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 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 124 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 287 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 48,7 mg de $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 584,4 mg de NaCl; 2,38 mg de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Finalmente, se añade agua hasta 1 l.

III.5.1.1.2.- 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 en agua. Una vez finalizada su esterilización en autoclave, los medios de cultivo se mantuvieron durante media hora en un baño a 55°C antes de su vertido en cajas de Petri, que se realizó en una cabina de flujo laminar horizontal (Telstar BH 100). 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 10,3 mM; H_3BO_3 50,1 μM ; CaCl_2 1,5 mM; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,05 μM ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,05 μM ; Na_2EDTA 55,4 μM ; MgSO_4 0,75 mM; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 50 μM ; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,5 μM ; KI 2,5 μM ; KNO_3 9,4 mM; KH_2PO_4 0,62 mM; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 15 μM ; sacarosa 29,2 mM; MES [ácido 2-(N-morfolino)-etano sulfónico] 2,3 mM; agar 8 g/l.

Para su preparación se añaden, a 900 ml de agua, 2,2 g de sales de Murashige y Skoog (Duchefa; Murashige y Skoog, 1962), 10 g de sacarosa y 0,5 g de MES (ácido 2-[N-morpholino]etano sulfónico). Se agita la suspensión hasta la total disolución de sus componentes y se ajusta el pH a 5,7 con KOH 1 M. Posteriormente, se añaden 8 g de agar y se ajusta el volumen a 1 l. Se esteriliza en autoclave.

III.5.1.1.3.- Medios de cultivo suplementados con hormonas

El medio sólido GM descrito anteriormente se ha suplementado en algunos casos con distintas concentraciones de diferentes sustancias (véase el apartado III.15.2, en la página 100). Las disoluciones madre se prepararon tal como se indica a continuación, y se alicuotaron en tubos *ependorf* que se almacenaron a 4°C hasta su uso.

ABA 10 mM: Se preparó añadiendo 50 mg de ABA (ácido abscísico; Sigma A7383) a una mezcla de agua y DMSO (dimetil sulfóxido) al 50% v/v, en un volumen final de 19 ml.

2,4-D 10 mM: Para su preparación se añaden 110 mg de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético; Gibco BRL 11215-019) a 50 ml de NaOH 1 M.

TIBA 500 mM: Se añaden 250 mg de TIBA (ácido 2,3,5-triyodobenzoico; Sigma T5910) a 1 ml de DMSO.

NPA 500 mM: Se añaden 145 mg de NPA (ácido 1-N-naftitalámico; Riedel-de-Häen 34361) a 1 ml de DMSO.

1-NOA 500 mM: Se prepara disolviendo 100 mg de 1-NOA (ácido 1-naftoxiacético; Aldrich 25,541-6) en 1 ml de DMSO.

24-epibrasinólido 10 mM: Para su preparación se añaden 24 mg de 24-epibrasinólido (Sigma E1641) a 5 ml de etanol absoluto.

IAA 10 mM: Se prepara disolviendo 88 mg de IAA (ácido indolacético; Gibco BRL 11450-012) en 50 ml de NaOH 1 M.

BA 10 mM: Para su preparación se añaden 25 mg de BA (6-benzilaminopurina; Sigma B3408) a 11 ml de NaOH 1 M.

GA₃ 100 mM: Se añaden 175 mg de GA₃ (ácido giberélico; Sigma G1025) a 5 ml de etanol absoluto.

22(S),23(S)-homobrasinólido 1 mM: Se añaden 5 mg de 22(S),23(S)-homobrasinólido (Sigma H1267) a 10 ml de etanol absoluto.

A partir de estas disoluciones madre, se prepararon diluciones seriadas que permitiesen añadir 1 ml de cada una de ellas a 500 ml de medio GM, después de la

esterilización de éste en autoclave y su posterior estabilización a 55°C en un baño termostatzado.

III.5.1.2.- Medios de cultivo para microorganismos

III.5.1.2.1.- Medios de cultivo líquidos

Todos estos medios de cultivo líquidos fueron conservados hasta un mes a 4°C.

LB (Luria - Bertani): 1% m/v de bacto-triptona; 0,5% m/v de extracto de levadura; 1% m/v de NaCl. Para preparar un litro de medio se mezclan 10 g de bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl. Se añade 1 l de H₂O, se ajusta el pH a 7,5 con NaOH 5 N y se esteriliza en autoclave.

YM (Yeast manitol): 0,04% m/v de extracto de levadura; 1% de manitol; NaCl 1,7 mM; MgSO₄ 0,8 mM; K₂HPO₄ 2,2 mM. Para preparar un litro de medio se mezclan 0,4 g de extracto de levadura, 10 g de manitol, 0,1 g de NaCl, 0,2 g de MgSO₄, 0,5 g de K₂HPO₄, se ajusta el pH a 7,0 con NaOH 5 N y se esteriliza en autoclave.

SOC: 2% m/v de bacto-triptona; 0,5% m/v de extracto de levadura; 0,05% m/v NaCl; KCl 250 mM; MgCl₂ 2 M; glucosa 1 M. Para preparar 200 ml se disuelven en 193 ml de H₂O: 4 g de bacto-triptona, 1 g de extracto de levadura y 0,1 g de NaCl. Se añaden a continuación 2 ml de KCl 250 mM, se ajusta el pH a 7,0 con NaOH 5 N y se esteriliza en autoclave. Después de la esterilización se añaden 1 ml de MgCl₂ 2 M y 4 ml de glucosa 1 M.

III.5.1.2.2.- Medios de cultivo sólidos

Los medios de cultivo sólidos fueron preparados por adición de agar (agar bacteriológico europeo; Pronadisa), tras la disolución del resto de los componentes. La concentración de agar fue del 1,5% m/v en los medios de cultivo sólidos LB e YM, y del 0,7% m/v para el agar de cobertera (*top agar*). Una vez finalizada su esterilización en autoclave, los medios de cultivo se mantuvieron durante media hora en un baño a 55°C antes de su vertido en cajas de Petri de 90 mm, que se llevó a cabo en una cabina de flujo laminar horizontal. El agar de cobertera fue esterilizado en autoclave en matraces de tamaños 2-4 veces superiores en volumen al del medio añadido, pudiendo mantenerse a 4°C durante varios meses. Las cajas de Petri con medio sólido fueron conservadas hasta un mes a 4°C en posición invertida y precintadas.

III.5.1.3.- Medios de cultivo suplementados con antibióticos

Algunos de los medios anteriormente descritos se han suplementado en ocasiones con antibióticos, a una concentración final de 100 mg/l (ampicilina), 50 mg/l (kanamicina) o 25 mg/l (estreptomicina). La ampicilina, la kanamicina y la estreptomicina se prepararon en disoluciones madre de concentraciones 1.000 veces superiores a la de trabajo, disolviéndolas en H₂O y esterilizándolas por filtración. Estas disoluciones se conservaron a -20°C, alicuotadas en tubos *ependorf* de 1,5 ml. Los antibióticos se añaden al medio después de que éste haya sido esterilizado en autoclave y posteriormente estabilizado a 55°C en un baño termostático.

III.5.2.- Tampones y otras disoluciones de uso general

SDS al 20%: Se prepara disolviendo, a 68°C, 100 g de SDS (dodecilo sulfato de sodio) en 500 ml de agua y ajustando el pH a 7,2.

20×SSC pH 7,0: Su composición es NaCl 3 M y citrato sódico 0,3 M. Para preparar un litro se mezclan 175,3 g de NaCl y 88,2 g de citrato sódico, se ajusta el pH a 7,0 y se esteriliza en autoclave.

III.5.2.1.- Disoluciones para electroforesis

50×TAE: Tris-base [Tris-(hidroximetil)aminometano] 2 M; 5,71% v/v de ácido acético glacial; Na₂EDTA 50 mM pH 8,0. El pH final debe ser 7,6. Para preparar un litro se mezclan 242 g de Tris-base, 57,1 ml de ácido acético glacial y 100 ml de Na₂EDTA 0,5 M pH 8,0.

10×TBE: Tris-base 0,89 M; BO₃H₃ 0,89 M; Na₂EDTA 20 mM pH 8,0. El pH final debe ser 8,2. Se mezclan 108 g de Tris-base, 55 g de BO₃H₃ y 40 ml de Na₂EDTA 0,5 M pH 8,0, añadiendo agua hasta un litro.

6× tampón de carga para electroforesis en geles de agarosa: 20% m/v de Ficoll; 0,25% m/v de xilencianol; 0,25% m/v de azul de bromofenol; Na₂EDTA 10 mM.

Tampón de carga para análisis de fragmentos mediante electroforesis en geles de poliacrilamida: Es una mezcla 5:1:1, en volumen, de formamida desionizada, colorante (azul de dextrano 50 mg/ml; EDTA 25 mM) y el marcador de peso molecular GeneScan-500 (TAMRA; N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirrodamina) 4 nM (Applied Biosystems), respectivamente. Se conserva a 4°C.

Marcador de peso molecular para electroforesis en geles de agarosa: Se diluye el marcador (1 kb ladder de Gibco/BRL; 1 µg/µl) en tampón de carga hasta una

concentración de 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Se utilizan 5 μl por pocillo de un gel de agarosa convencional. Se conserva a -20°C .

III.5.2.2.- Disoluciones para la purificación de ADN genómico

Tampón de extracción para el método de Dellaporta *et al.* (1983): Tris-HCl 100 mM pH 8,0; Na_2EDTA 50 mM; NaCl 0,5 M; β -Mercaptoetanol 10 mM. Se prepara a partir de disoluciones madre Tris-HCl 1 M; Na_2EDTA 0,5 M; NaCl 5 M y β -Mercaptoetanol 14,4 M. Puede conservarse hasta un mes a 4°C .

III.5.2.3.- Disoluciones para la purificación de ADN plasmídico

Disolución de resuspensión: Glucosa 50 mM; Tris-HCl 25 mM pH 8,0; Na_2EDTA 10 mM. Se prepara a partir de disoluciones de glucosa 1 M, Tris-HCl 1 M y Na_2EDTA 0,5 M, la primera de ellas esterilizada por filtración. Se conserva a 4°C .

Disolución de lisis: NaOH 0,2 M; 1% en SDS. Se prepara en el momento de su utilización, a partir de una disolución NaOH 5 M y otra del 20% en SDS.

Disolución de neutralización: KOAc 3 M; 11,5% en CH_3COOH . Se preparan 60 ml de KOAc 5 M, a los que se añaden 11,5 ml de ácido acético glacial y 28,5 ml de H_2O . Se conserva a 4°C .

III.5.2.4.- Disoluciones para la obtención de células competentes

TFBI: KOAc 30 mM; RbCl 100 mM; CaCl_2 10 mM; MnCl_2 50 mM; 15% en glicerol. Para preparar 100 ml se mezclan 20 ml de RbCl 0,5 M, 2 ml de CaCl_2 0,5 M, 10 ml de MnCl_2 0,5 M, 0,294 g de KOAc y 11,9 ml de glicerol puro. Se añade agua hasta 100 ml, se ajusta el pH a 5,8 con CH_3COOH y se esteriliza por filtración. Se conserva a 4°C .

TFBII: MOPS [ácido 3-(N-morfolino)propano sulfónico] 10 mM; CaCl_2 75 mM; RbCl 10 mM; 15% en glicerol. Para preparar 100 ml se mezclan 5 ml de MOPS 0,5 M, 37,5 ml de CaCl_2 0,5 M, 5 ml de RbCl 0,5 M y 29,7 ml de glicerol puro. Se añade agua hasta 100 ml, se ajusta el pH a 6,5 con KOH 1N y se esteriliza por filtración. Se conserva a 4°C .

III.5.2.5.- Disoluciones para la transformación de *Arabidopsis thaliana*

Tampón de infiltración: Para su preparación se añaden, a 900 ml de H_2O , 2,2 g de sales de Murashige y Skoog (Duchefa; Murashige y Skoog, 1962), 50 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 5,8 con KOH 1 M. Posteriormente, se añade H_2O hasta 1 l, se esteriliza en

autoclave y se conserva a 4°C. En el momento de la infiltración se añaden 200 µl de Silwet L-77 (OSi Specialties Inc.).

III.6.- Obtención y manipulación de ácidos nucleicos

III.6.1.- Aislamiento de ADN genómico de *Arabidopsis thaliana*

El ADN genómico utilizado como molde en las mezclas de PCR fue purificado mediante el método de Dellaporta *et al.* (1983), modificado según se indica en <http://www.caltech.edu/~meyerowitz/protocols/quickdna.html>. Se introduce en un tubo *ependorf* una planta entera de 21 días y se le añaden 200 µl de tampón de extracción (véase el apartado III.5.2.2, en la página 77), macerándola con un palillo de polipropileno (*pellet pestle*) impulsado por un agitador rotativo (*pellet pestle motor*). A continuación, se añaden 300 µl de tampón de extracción y 35 µl de SDS al 20%, incubando la mezcla en un baño termostatzado a 65°C durante 10 min. Finalmente, se añaden 130 µl de KOAc 5 M, incubando en hielo durante 5 min, y centrifugando durante 10 min a 13.000 rpm (14.927 g) en una microfuga. El sobrenadante se transfiere a un tubo *ependorf* vacío, se precipita durante 15 min a -20°C con 640 µl de isopropanol y 60 µl de NaOAc 3 M, y se centrifuga durante otros 10 min a 13.000 rpm. El precipitado se lava con 300 µl de etanol del 70% y se centrifuga una vez más durante 5 min, tras lo cual se deja secar a temperatura ambiente, para resuspenderlo después en 40 µl de agua y almacenarlo a 4°C.

III.6.2.- Aislamiento de ADN plasmídico

Se llevaron a cabo preparaciones a pequeña escala de ADN o minipreparaciones (*minipreps*), a partir de cultivos bacterianos de 3-10 ml de medio líquido, por el método de la lisis alcalina con precipitación por polietilenglicol (PEG 8000; Sigma P-2139), haciendo uso de las disoluciones descritas en el apartado III.5.2.3, en la página 77. Se emplearon algunas células de la estirpe bacteriana portadora del plásmido que se deseaba aislar en cada caso para inocular recipientes estériles cuya capacidad excedía al menos cinco veces el volumen del medio de cultivo utilizado suplementado con el antibiótico requerido. Tras su incubación, a 37°C para *Escherichia coli* o 28°C para *Agrobacterium tumefaciens*, a 225 rpm durante 14-24 h, se tomaron alícuotas de 1,5 ml en tubos *ependorf*, que se centrifugaron durante 30 s a 13.000 rpm. Finalizada la centrifugación, se decantó el sobrenadante, manteniendo los tubos en posición invertida durante 3 min. El precipitado se resuspendió en 100 µl de la disolución de resuspensión previamente enfriada a 4°C, agitando en un *vortex* durante 15 s, y se incubó 5 min a temperatura ambiente. A

continuación, se añadieron 200 μl de la disolución de lisis, mezclando por inversión e incubando en hielo durante 5 min. Tras agregar 150 μl de la disolución de neutralización previamente enfriada a 4°C, mezclar por inversión durante 10 s y enfriar 5 min en hielo, las muestras se centrifugaron a 13.000 rpm durante 10 min, transfiriendo el sobrenadante a tubos vacíos, a los que se añadió Ribonucleasa A a una concentración final de 20 $\mu\text{g/ml}$, incubando finalmente a 37°C durante 30 min. Se agregó a la disolución así obtenida un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y tras la centrifugación de la mezcla a 13.000 rpm durante 5 min, se transfirió la fase acuosa a un tubo *ependorf* vacío al que se añadieron 2,5 volúmenes de etanol absoluto, agitando en un *vortex* y manteniendo a continuación el tubo durante 10 min a temperatura ambiente. Finalmente, se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 min, se decantó el sobrenadante y se lavó el precipitado con etanol del 70%, que se dejó secar al aire.

Para separar el ADN plasmídico del genómico, el precipitado obtenido según se indica en el párrafo anterior se resuspendió en 16 μl de H₂O y se añadieron 3,2 μl de NaCl 5 M y 20 μl de PEG 8.000 al 13%. Esta mezcla se mantuvo en hielo durante 30 min, centrifugando después a 13.000 rpm, durante 10 min a 4°C. Finalmente, el precipitado se lavó con etanol del 70%, se secó y resuspendió en 15-20 μl de H₂O, determinándose espectrofotométricamente la concentración en ácidos nucleicos y conservando las muestras a -20°C.

III.6.3.- Aislamiento de ARN de *Arabidopsis thaliana*

En esta Tesis se ha obtenido ARN a partir de plantas completas, recolectadas 21 días después de la siembra, o de flores maduras, capullos u hojas caulinares, dos semanas más tarde. Todos estos especímenes fueron recolectados, inmediatamente sumergidos en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C en tubos *ependorf* debidamente rotulados. La extracción del ARN de estas muestras de material vegetal, cada una de ellas de unos 30 mg, se inició macerándolas en nitrógeno líquido y, tras la evaporación de éste, en 500 μl de Trizol (una disolución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidinio; Gibco/BRL), durante 5 min, manteniendo el recipiente en hielo. Se añadieron a continuación 100 μl de cloroformo, agitando en un *vortex* durante 15 s e incubando 3 min a temperatura ambiente, para centrifugar después a 13.000 rpm y 4°C durante 15 min en una microfuga. Se transfirió a otro tubo la fase acuosa y se llevó a cabo una precipitación con isopropanol durante 10 min a temperatura ambiente. Tras otra centrifugación idéntica a la anterior, el precipitado fue lavado con etanol del 70%, se resuspendió en 40 μl de agua previamente calentada a 60°C y se congeló a -80°C.

Alternativamente, se procedió a eliminar el ADN genómico que pudiera contener la disolución, de la que se tomaron 10 μ l, añadiéndoles 30 μ l de agua, 5 unidades de DNasa I (1 U/ μ l; Gibco/BRL) y 5 μ l del tampón 10 \times de la enzima, incubando a 37°C durante 30 min. La enzima se inactivó a continuación por calentamiento a 70°C durante 10 min. Se efectuó una nueva precipitación del ARN, añadiendo 5 μ l de NaOAc 3 M a la disolución (1/10 de su volumen) y 137,5 μ l de etanol absoluto (2,5 volúmenes), manteniéndola a -20°C durante 1 h y centrifugando después a 13.000 rpm durante 10 min. El precipitado se lavó con etanol del 70%, se dejó secar al aire y se resuspendió en 20 μ l de agua. La eficacia del proceso fue evaluada determinando espectrofotométricamente la concentración en ácidos nucleicos y sometiendo 1 μ l de la disolución a electroforesis en un gel de agarosa al 1,5%, a fin de estimar la calidad del ARN y confirmar la ausencia de ADN.

III.6.4.- Restricción y ligación de ADN

Para las restricciones que se han realizado en este trabajo, se emplearon habitualmente 2 U de la enzima correspondiente por μ g de ADN. Las digestiones se realizaron en todos los casos en tubos *ependorf* de 1,5 ml, y en un volumen final de 10-25 μ l. Para las digestiones dobles se eligieron tampones de reacción compatibles con ambas enzimas, de entre los incluidos en el *Five Buffer Plus System* de MBI Fermentas. Las mezclas de reacción se incubaron durante un mínimo de 2 h a 37°C en una estufa. La inactivación final de la enzima se realizó por calentamiento a 65°C u 80°C, según las instrucciones del fabricante. Se visualizaron los resultados de las digestiones sometiendo una porción de cada mezcla de reacción a electroforesis en un gel de agarosa al 1%. El resto se conservó a 4°C hasta su uso.

Para las ligaciones hemos utilizado 1 U de la ligasa del bacteriófago T4 en un volumen final de 10-15 μ l. Al igual que sucede con las endonucleasas de restricción, los fabricantes suministran un tampón para la ligasa (a una concentración 10 \times), que incluye los componentes que se requieren para la actividad de esta enzima. Las mezclas de las reacciones de ligación se incubaron a 16°C durante al menos 12 h, tras lo cual fueron congeladas a -20°C.

III.7.- Síntesis de ADN

III.7.1.- Síntesis de oligonucleótidos

Todos los oligonucleótidos empleados en este trabajo fueron sintetizados por Applied Biosystems. El proceso de síntesis de algunos de ellos incluyó su marcaje con

los fluoróforos 6-FAM (6-carboxifluoresceína), HEX (4,7,2',4',5',7'-hexacloro-6-fluoresceína) o TET (4,7,2',7'-tetracloro-6-carboxifluoresceína). Las secuencias de las parejas de oligonucleótidos empleados se detallan en las Tablas 10, 20, 24, 26, 30 y 34, en las páginas 91, 130, 135, 138, 152 y 157, respectivamente.

III.7.2.- Amplificaciones mediante PCR

En esta Tesis se han realizado amplificaciones mediante PCR con varios propósitos, incluido el de la secuenciación de ADN, que se describe en el apartado III.9.1, en la página 84. Las condiciones de reacción han variado en función de la naturaleza del ADN empleado como molde. La cantidad de ADN genómico se indica en cada caso. Cuando el molde fue ADN complementario (ADNc) se tomaron 0,5 μ l de la mezcla de retrotranscripción (véase el apartado III.7.3, en la página 82) y cuando el molde fue ADN plasmídico se utilizaron desde algunos picogramos hasta 100 ng. En los casos en que la amplificación se llevó a cabo incorporando masa bacteriana directamente a la mezcla de reacción, no se pudo estimar la cantidad de molde empleada. Los cebadores se añadieron a una concentración final de 0,4 μ M, o entre 15 y 60 nM cuando alguno de ellos había sido marcado con un fluorocromo. La concentración final de cada uno de los cuatro desoxirribonucleótidos fue 0,2 mM.

Las reacciones se llevaron a cabo en tubos *ependorf* de pared fina de 0,2 ml, en termocicladores Applied Biosystems 2400, 2700 o 9700, en los que se programó un número de ciclos comprendido entre 25 y 40. La duración de la etapa de polimerización dependió del tamaño de la molécula que se pretendía amplificar, asumiéndose que la polimerasa termoestable utilizada sintetiza ADN a razón de una kilobase por minuto. La temperatura de apareamiento (*annealing temperature*; T_m) se ha calculado con la fórmula $T_m = 4(C+G) + 2(A+T)$, siendo C, G, A y T el número de las respectivas bases en el oligonucleótido (Suggs *et al.*, 1981). Hemos utilizado habitualmente una temperatura de apareamiento entre 5 y 10°C inferior a la calculada. Los oligonucleótidos se han diseñado procurando obtener temperaturas de apareamiento similares para los dos miembros de cada pareja de cebadores. Se ha programado siempre una etapa final, no cíclica, de 10 min a 72°C, para permitir el rellenado de las moléculas bicatenarias con colas protuberantes en 5'. Los volúmenes de reacción oscilaron entre 5 y 50 μ l.

Se han realizado también en este trabajo amplificaciones de productos de PCR de gran tamaño, mayores de 6 kb, para lo que se requieren polimerasas de ADN altamente procesivas. Existen *kits* disponibles comercialmente que incluyen una mezcla de dos polimerasas termoestables, una de las cuales, la *Pfu* (procedente de la arqueobacteria

Pyrococcus furiosus), presenta actividad correctora de pruebas de la que carece la otra, la polimerasa *Taq*, que es muy procesiva. Hemos utilizado la mezcla de polimerasas denominada *Herculase* (Stratagene 600260), siguiendo las instrucciones del fabricante.

III.7.3.- Retrotranscripción seguida de PCR (RT-PCR)

En las reacciones de síntesis de ADNc se empleó como molde ARN total, extraído según se describe en el apartado III.6.3, en la página 79 y, como cebadores, hexanucleótidos de secuencias aleatorias. Esto evita el enriquecimiento en los segmentos poliadenilados frente al resto entre las moléculas de ADNc sintetizadas, un problema común cuando se emplea oligo(dT) como cebador.

Para sintetizar ADNc monocatenario, hemos utilizado la retrotranscriptasa del virus de la leucemia del ratón (Superscript II; Gibco/BRL), que ha sido modificada para reducir su actividad RNasa-H, lo que evita la degradación de los híbridos ADN-ARN. Se tomó 1 µg de ARN total, que fue desnaturizado a 65°C durante 5 min, con el objetivo de eliminar eventuales estructuras secundarias, introduciendo a continuación el tubo en hielo. Tras la adición de 400 ng de hexanucleótidos aleatorios [p(dN)₆; Roche], la mezcla de reacción fue incubada a 25°C durante 10 min, para permitir el apareamiento entre estos cebadores y el ARN. La retrotranscripción tuvo lugar en una mezcla de reacción de 20 µl, con 200 unidades de SuperScript II, 0,5 mM de cada dNTP, DTT (1,4-ditiotreitol) 10 mM y 40 unidades de RNaseOUT (un inhibidor de ribonucleasas), que fue incubada a 42°C durante 1 h. La retrotranscriptasa fue finalmente inactivada por calentamiento a 70°C durante 15 min. No se sintetizó la segunda cadena del ADNc.

Las amplificaciones se llevaron a cabo en mezclas de reacción de 5 o 10 µl, con 0,2 mM de cada desoxirribonucleótido y 0,5 µl de la disolución de ADNc obtenida según se detalla en el párrafo anterior. La concentración final de los oligonucleótidos marcados con un fluoróforo fue 60 nM, que se alcanzó tomando 1,2 µl de una disolución que los contenía a una concentración 250 nM. El programa de termociclaje se inició con una desnaturalización de 1,5 min a 94°C, seguida de 35 ciclos (30 s a 94°C, 15 s a 55°C y 1,5 min a 70°C), y una incubación final de 7 min a 70°C. Una vez finalizada la amplificación, se tomaron 0,6 µl de cada mezcla de reacción para su análisis de fragmentos, tal como se indica en el apartado III.13.1.2, en la página 96. Los oligonucleótidos no marcados se utilizaron a una concentración final de 0,4 µM. En este último caso, se tomaron 2,5 µl de cada mezcla de PCR, que se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

III.8.- Electroforesis de ácidos nucleicos

En este trabajo se han llevado a cabo separaciones de ácidos nucleicos en los dos tipos más comunes de matrices sólidas: la poliacrilamida y la agarosa.

III.8.1.- Electroforesis en geles de poliacrilamida

La resolución de los productos de amplificación obtenidos mediante PCR múltiple (véase el apartado III.13.1.1, en la página 96), se llevó a cabo en condiciones desnaturalizantes, en geles del 4,25% en acrilamida:bisacrilamida (29:1) y 6 M en urea, preparados a partir de una disolución madre del 40% en acrilamida y bisacrilamida (29:1). Esta disolución debe ser desionizada por adición de un 1% m/v de resina de amberlita (Amberlite M-150; Sigma), agitando durante 5 min, filtrándola a través de un filtro Millipore de 0,22 μm y desgasificándola durante 5 min. Se añade 10 \times TBE (véase el apartado III.5.2.1; en la página 76), de manera que la concentración final sea 1 \times TBE, y se conserva hasta su utilización a 4°C, condición en la que puede permanecer hasta un mes. El gel se prepara añadiendo, a 50 ml de la mezcla anterior, 35 μl de TEMED (N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina) y 250 μl de una disolución recién preparada de persulfato de amonio al 10% m/v. Se vierte inmediatamente mediante una jeringa de 50 ml y se deja polimerizar durante al menos 2 h. Las electroforesis se llevaron a cabo en un secuenciador ABI Prism 377 (Applied Biosystems), según se detalla en el apartado III.13.1.2, en la página 96.

III.8.2.- Electroforesis en geles de agarosa

Hemos utilizado geles del 0,5% al 3% m/v en agarosa, dependiendo del tamaño de las moléculas de ADN que se deseaba separar. Las electroforesis se realizaron en cubetas horizontales, empleando como electrolito 1 \times TAE, y 1 \times TBE para las más prolongadas. La disolución de la agarosa en el tampón se llevó a cabo mediante calentamiento en un microondas. Una vez enfriada la disolución a 55°C se añadió bromuro de etidio hasta una concentración de 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Las electroforesis en geles de agarosa se han llevado a cabo a voltaje constante (30-120 V), cuyo valor ha dependido del tamaño de las moléculas de ADN y de las dimensiones de la cubeta. La visualización de las moléculas se consiguió iluminando los geles con luz UV de 312 nm, obteniéndose las correspondientes fotografías en un documentador de geles Vilber Lourmat, que permite grabar las imágenes de los geles en formato electrónico para posteriormente estimar el tamaño y la intensidad de las bandas obtenidas mediante el programa PhotoCapt (versión 99.0).

III.8.3.- Electroforesis capilar

Este tipo de electroforesis se basa en el empleo de capilares de pequeño diámetro, rellenos de un polímero que permite la migración diferencial de las sustancias de una mezcla, tras la aplicación de un campo eléctrico. Hemos empleado el polímero 3100 POP6 (Applied Biosystems) para las electroforesis capilares realizadas en esta Tesis (véase el apartado III.9.2, en la página 85).

El analizador genético ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems) utiliza un conjunto de 16 capilares que permite resolver y analizar simultáneamente 16 muestras en cada electroforesis. La incorporación de las muestras al capilar se lleva a cabo mediante un brazo articulado y por inyección electrocinética, tras la aplicación de un campo eléctrico que hace migrar las moléculas cargadas.

III.9.- Secuenciación y análisis de secuencias de ADN

III.9.1.- Reacciones de secuenciación

Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo por el procedimiento de la secuenciación cíclica (*cycle sequencing*), en un termociclador, empleando una polimerasa termoestable. Hemos utilizado en todos los casos la variante de los didesoxinucleótidos terminadores (Sanger *et al.*, 1977) marcados con fluorocromos (*dye terminator sequencing*), que permite realizar las cuatro reacciones de secuenciación en un solo tubo, empleando cebadores sin marcar. Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en tubos *ependorf* de pared fina de 0,2 ml, en mezclas de reacción de 5 μ l que incluían 2,5 μ l del cebador y 2 μ l de la disolución incluida en el *kit* de secuenciación ABI PRISM *BigDye Terminator Cycle v2.0 Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems), que contiene los desoxinucleótidos, los didesoxinucleótidos terminadores marcados con fluorocromos, la ADN polimerasa AmpliTaq FS y su tampón de reacción. Habitualmente se emplearon como molde de secuenciación 1-3 μ l de un producto de PCR que había sido previamente precipitado con NH_4OAc 0,6 M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto, y resuspendido en agua destilada después de realizar un lavado con etanol del 70%. Se empleó un programa de PCR con una etapa inicial de desnaturalización de 2 min a 96°C, seguida de 30 ciclos (10 s a 96°C, 5 s a 55°C y 4 min a 60°C, debiendo ser rápida la transición entre estas dos últimas etapas). Una vez finalizadas las reacciones de secuenciación cíclica se procede a eliminar los didesoxinucleótidos terminadores no incorporados. Para ello, los productos de las reacciones de secuenciación cíclica son precipitados, añadiendo a cada muestra 31 μ l de agua y 64 μ l de una disolución de etanol del 95%, e incubando a temperatura ambiente

durante 15 min. Los tubos son centrifugados a continuación en una microfuga, durante 15 min a 13.000 rpm. El precipitado es finalmente lavado con etanol del 70% y secado al aire, conservándose a -20°C.

III.9.2.- Electroforesis y lectura automatizada de secuencias

La electroforesis capilar para la obtención de la secuencia nucleotídica se llevó a cabo en un analizador genético ABI PRISM 3100. Los productos de las reacciones de secuenciación fueron resuspendidos en 20 µl de formamida desionizada, desnaturalizados a 96°C durante 3 min e introducidos seguidamente en hielo, todo ello antes de su carga en la gradilla del secuenciador. Para los capilares de 36 cm de longitud, se empleó una temperatura de electroforesis de 55°C. Tras un precalentamiento (*prerun*) del gel de 3 min a 15.000 V, se inyectaron las muestras, sometiéndolas durante 20 s a un pulso de 1.500 V. A continuación se inició la electroforesis, que transcurrió durante 40 min a 15.000 V. Cuando se utilizaron los capilares de 50 cm, la temperatura de la electroforesis fue de 50°C y el precalentamiento del gel se realizó a 12.200 V durante 3 min. Tras la inyección de las muestras, la electroforesis transcurrió durante unas 2 horas a 12.200 V.

La emisión de fluorescencia por los terminadores marcados con distintos fluorocromos, tras la excitación por el láser, es recogida por un detector, y su interpretación y análisis son llevadas a cabo de forma automatizada por el programa que controla el equipo. Un programa informático (*DNA Sequencing Analysis Software*; Applied Biosystems) permite la visualización de los resultados. Algunas posiciones ambiguas en las secuencias obtenidas pudieron esclarecerse mediante la magnificación de la imagen de éstas, usando el programa CHROMAS v2.21 (<http://www.technelysium.com.au>).

III.9.3.- Análisis de secuencias de ADN y proteínas

III.9.3.1.- Ensamblaje y análisis de secuencias nucleotídicas

Las secuencias obtenidas fueron analizadas empleando los programas de análisis del Wisconsin Package 10.2 (Genetics Computer Group, GCG), utilizando el interfaz de usuario W2H 4.0 (Senger *et al.*, 1998), mediante conexión interactiva con el nudo español de la Red Europea de Biología Molecular (EMBnet; *European Molecular Biology network*), al que se accede a través de <http://www.es.embnet.org/Doc/w2h/index.html>, utilizando el programa Internet Explorer 6.0 (Microsoft) en un ordenador de tipo PC. Mediante este paquete de programas se buscaron pautas de lectura abiertas y se dedujeron las secuencias aminoacídicas a partir de las nucleotídicas. Para el ensamblaje de las

secuencias se utilizó el programa MACAW (Multiple Alignment Construction & Analysis Workbench, version 2.0.5; Schuler *et al.*, 1991). La identificación de señales de inicio de la traducción, proteólisis, glicosilación y poliadenilación se realizó mediante las herramientas disponibles en la base de datos PROSITE (Falquet *et al.*, 2002; <http://www.expasy.org/prosite/>).

III.9.3.2.- Análisis de semejanzas y alineamiento múltiple de secuencias

Las secuencias de los genes previamente descritos se obtuvieron de los bancos de datos de ácidos nucleicos EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/embl/index.html>), en el *European Bioinformatics Institute* (EBI; Rodríguez-Tome, 2001), y GenBank (Benson *et al.*, 2002; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), en el *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), mediante conexión interactiva a través de Internet.

La búsqueda de secuencias similares se llevó a cabo en los servidores del EBI y el NCBI, mediante los programas de la serie BLAST (Altschul *et al.*, 1997; Tatusova y Madden, 1999; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) y el programa FASTA (Pearson *et al.*, 1997). Los alineamientos múltiples de las secuencias proteicas se obtuvieron con el programa CLUSTAL X 1.5b (Thompson *et al.*, 1997), empleando la opción *Multiple Alignment Mode*, que utiliza las matrices de comparación de la serie BLOSUM (Henikoff y Henikoff, 1992). La presentación de los alineamientos múltiples fue modificada mediante el programa BOXSHADE 3.21 (Hofmann y Baron, sin publicar; http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html). Para la construcción de los árboles filogenéticos se utilizó la opción *Bootstrap Tree* del programa CLUSTAL X 1.5b (Thompson *et al.*, 1997; Jeanmougin *et al.*, 1998), que permite seleccionar el número de réplicas a partir del cual se obtiene la probabilidad acumulada de cada rama (Felsenstein, 1988). La representación gráfica del árbol filogenético así obtenido se realizó con el programa TreeView 1.40 (Page, 1996).

III.10.- Análisis de Southern

El procedimiento de hibridación de ácidos nucleicos descrito por Southern (1975), permite determinar la presencia o ausencia de una secuencia en un genoma, así como el número de sus copias.

III.10.1.- Transferencia de ADN a membranas

Para llevar a cabo su análisis de Southern, se tomaron muestras de 5 μ g del ADN genómico de los homocigotos *ucu2-1*, *ucu2-2* y *ucu2-3*, así como del silvestre *Ler*, cada

una de las cuales había sido digerida separadamente con las enzimas *SacI*, *AccI* o *EcoRI* (véase el apartado III.6.4, en la página 80). Los fragmentos de restricción fueron sometidos a electroforesis en un gel de agarosa al 0,8%, a 30 V durante 20 h, empleando 0,5×TBE como electrolito. Finalizada la electroforesis, se fotografió el gel disponiendo sobre él una regla fluorescente e iluminándolo con luz UV de 312 nm. El gel fue introducido a continuación en una disolución de despurinación (HCl 0,25 N), hasta que las bandas del azul de bromofenol y el xilencianol cambiaron de color (unos 15 min), enjuagado después con agua y sumergido en una disolución de desnaturalización (NaCl 1,5 M; NaOH 0,5 M), en la que permaneció durante 30 min, todo ello con agitación constante. A continuación, se enjuagó de nuevo con agua y se introdujo en una disolución de neutralización (Tris-HCl 0,5 M pH 7,0; NaCl 1,5 M) durante 20 min. Esta última etapa se repitió otra vez más, tras renovar la disolución de neutralización.

Se siguió el procedimiento de transferencia de ADN a una membrana de nailon Hybond N (Amersham), utilizando durante 10 h un sistema *turboblotter* (Schleider y Schuell), con 20×SSC como tampón de transferencia. A continuación, se comprobó que la transferencia se había completado, iluminando el gel con luz UV. La membrana se enjuagó con 2×SSC para eliminar los restos de agarosa y se dejó secar durante 15 min, a temperatura ambiente, sobre un papel Whatman 3MM. Se llevó a cabo un secado adicional durante 10 min en un horno a 80°C y se fijó irreversiblemente el ADN a la membrana mediante un *crosslinker* Amersham (15 s a 70.000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$), siguiendo las instrucciones del fabricante. La membrana fue mantenida a temperatura ambiente hasta su posterior utilización.

III.10.2.- Síntesis de sondas

Las mezclas de reacción para la síntesis de sondas incorporaron DIG 11-dUTP, un dUTP modificado que incluye una molécula de digoxigenina, un hapteno esteroide de origen vegetal para el que existen diferentes tipos de anticuerpos. Los oligonucleótidos que se emplearon como cebadores fueron los siguientes: SeqMIL23.13F y SeqMIL23.10R para obtener la sonda 13F10R; SeqMIL23.11F y SeqMIL23.11R para la sonda 11F11R; y la pareja SeqMIL23.5F y SeqMIL23.2R para obtener la sonda 5F2R (las secuencias de estos cebadores se detallan en la Tabla 33, en la página 156). Las reacciones de síntesis de las sondas se efectuaron utilizando ADN genómico como molde y añadiendo 3 μl de dATP, 3 μl de dGTP, 3 μl de dCTP y 2,4 μl de dTTP, todos ellos a una concentración 1 mM, 1 μl de una disolución 10 μM de cada cebador, 0,6 U de la polimerasa termoestable, 0,6 μl de DIG 11-dUTP 1 mM (Roche) y agua hasta 25 μl . La

cantidad de sonda obtenida se estimó sometiendo a electroforesis, en un gel de agarosa al 1,5%, una porción de la mezcla de reacción. Alternativamente, se depositaron en una membrana Hybond N muestras de diferentes diluciones de la mezcla de reacción junto a las de una molécula de referencia suministrada por el fabricante. Para fijar el ADN, la membrana fue expuesta a luz UV (15 s a $70.000 \mu\text{J}/\text{cm}^2$), y se aplicó el protocolo de detección que se detalla en el apartado III.10.4.

III.10.3.- Hibridación

Tanto la prehibridación como la hibridación se llevaron a cabo en un horno de hibridación Amersham, a 68°C y con rotación constante de los tubos. Las disoluciones de prehibridación e hibridación que se emplearon contenían Na_2HPO_4 0,25 M pH 7,2, Na_2EDTA 1 mM, 7% en SDS y un 0,5% del agente bloqueante provisto por Roche (extracto de caseína). La prehibridación se realizó en un volumen de 20 ml y tuvo una duración de 2 h. La hibridación se llevó a cabo tras desechar la mezcla de prehibridación y añadir 5 ml de la disolución de hibridación. La sonda fue desnaturalizada durante 10 min a 100°C e incorporada a la mezcla de hibridación a una concentración final de 20 ng/ml. Finalizada la hibridación, que tuvo una duración de 14 h, se efectuaron tres lavados de la membrana, cada uno de ellos de 20 min y a 65°C , en una disolución de Na_2HPO_4 20 mM, Na_2EDTA 1 mM y 1% en SDS, para eliminar la sonda incorporada inespecíficamente.

III.10.4.- Detección quimioluminiscente de ADN

En el proceso de detección se utilizó anti-DIG-AP Fab (Roche), un anticuerpo contra la digoxigenina, conjugado a una fosfatasa alcalina. Como sustrato de esta última se usó CDP-*Star* (Roche), que es 2-cloro-5-(4-metoxiespiro{1, 2-dioxetano-3, 2'-(5'-cloro)tricyclo[3.3.1.1^{3,7}] decan}-4-il)fenil fosfato disódico, un dioxetano clorado altamente sensible, cuya desfosforilación conduce a la formación de un anión metaestable que se descompone emitiendo luz a 466 nm de longitud de onda. La ruptura del enlace es llevada a cabo por la fosfatasa alcalina incorporada a la molécula del anticuerpo. La descomposición del CDP-*Star* por la fosfatasa alcalina es en consecuencia una reacción quimioluminiscente.

Después de los lavados descritos en el apartado anterior, realizados con el fin de eliminar la sonda adherida inespecíficamente, la membrana fue introducida en la disolución 1 (Tabla 9) durante 5 min. A continuación se incubó en la disolución 2 durante 1 h, a temperatura ambiente y con agitación constante. Se desechó la disolución 2,

reponiendo 15 ml de la misma, a los que se había añadido 1 μ l de anti-DIG-AP, y se agitó durante 45 min. Finalmente, se efectuaron cuatro lavados, de 15 min cada uno, en 50 ml de la disolución 1.

Tabla 9.- Disoluciones empleadas en la detección quimioluminiscente de ADN

| Disolución 1 (pH 8,0) | Disolución 2 | Disolución 3 (pH 9,5) |
|-----------------------|----------------------------|-------------------------|
| Acido maleico 0,1 M | Disolución 1 | Tris-HCl 0,1 M |
| NaCl 0,15 M | 0,5% del agente bloqueante | NaCl 0,1 M |
| 0,3% v/v de Tween 20 | | MgCl ₂ 50 mM |

A continuación, se sumergió la membrana durante 5 min en un recipiente lleno de disolución 3. Después se mezclaron 800 μ l de la disolución 3 con una dilución 1:500 v/v del sustrato luminiscente CDP-*Star*. Esta disolución se distribuyó homogéneamente sobre la membrana, que había sido colocada sobre una transparencia, manteniéndola en la oscuridad durante 5 min. Finalmente, se colocó otra transparencia sobre la membrana y sobre ella una película Hyperfilm ECL (Amersham Pharmacia Biotech) sensible a la emisión luminosa, todo lo cual se envolvió en papel de aluminio para que la reacción transcurriera en completa oscuridad, durante al menos 1 h.

Para poder reutilizar las membranas con las distintas sondas, éstas se lavaron con agua destilada para eliminar el sustrato y se incubaron en 0,3 M NaOH y 0,1% (m/v) SDS durante 20 min a 37°C. Posteriormente se lavaron con 2 \times SSC para eliminar completamente la sonda.

III.11.- Construcción y transferencia de transgenes

Hemos construido transgenes para su transferencia a plantas de *Arabidopsis thaliana*, que se llevó a cabo mediante infección, por infiltración, con una estirpe virulenta de *Agrobacterium tumefaciens*. El vector empleado para la construcción de los transgenes diseñados con el propósito de rescatar fenotípicamente a los mutantes *ucu1* (véase el apartado IV.3.2.3.5 de Resultados, en la página 147) fue pCLD04541 (también denominado AF184978; Figura 17A), que deriva de la fusión del plásmido pRK290 con un ADN-T modificado. Este último incluye los segmentos que hacen posible su inserción en el genoma de una planta (LB y RB; véase la Figura 17A), así como el gen *nptII*, que confiere resistencia a kanamicina, que está flanqueado por el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor y el terminador del gen de la octopina sintetasa (*ocs 3'*). El vector pCLD04541 contiene además el fragmento *lacZ'* del gen *lacZ*, que está interrumpido por

un sitio de clonación múltiple, lo que permite la selección de colonias azules/blancas en presencia de X-Gal e IPTG (véase el apartado III.12.1.4, en la página 93). El plásmido pRK290 contiene un gen bacteriano de resistencia a la tetraciclina.

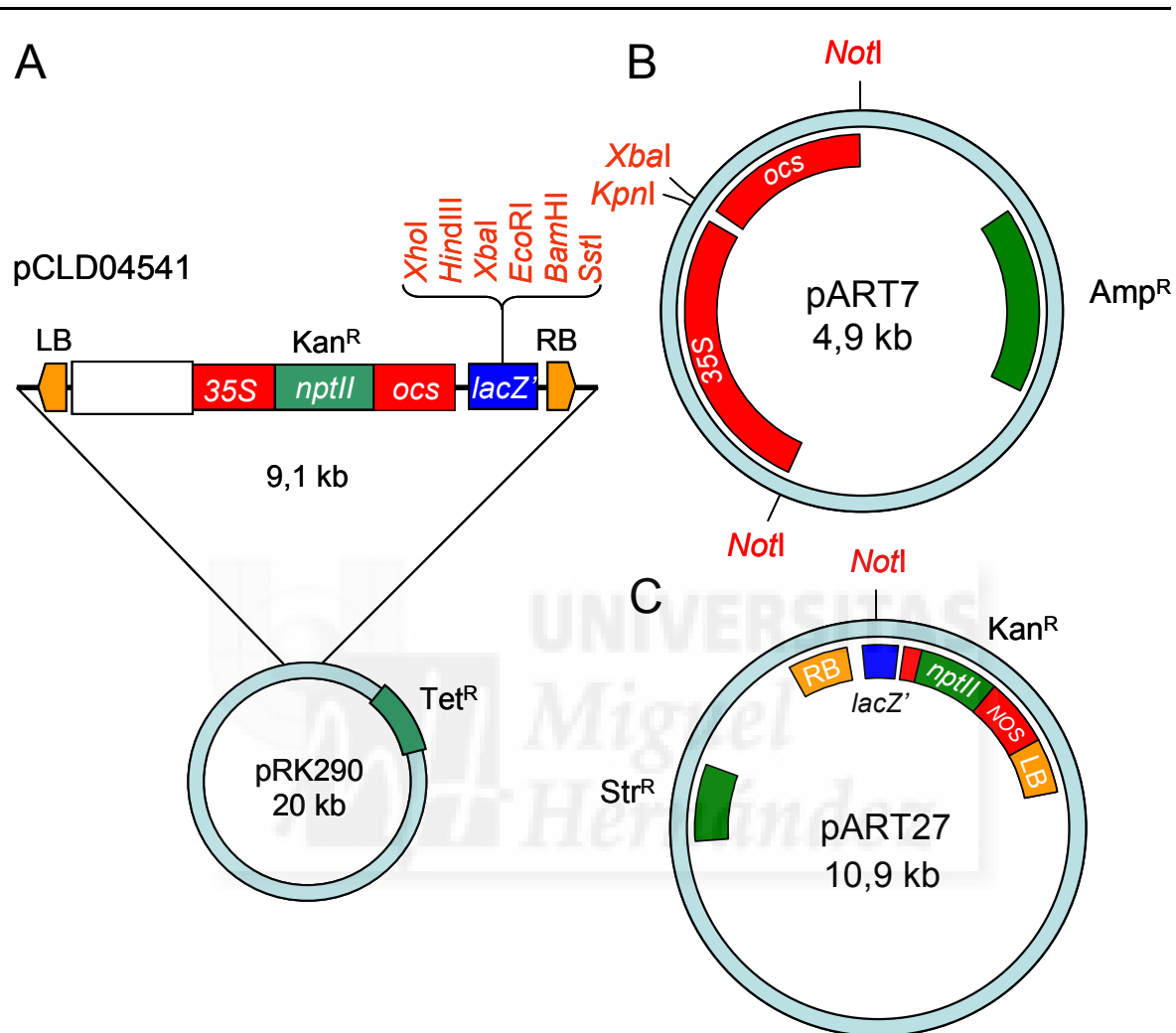


Figura 17.- Vectores utilizados en esta Tesis para el rescate fenotípico de los mutantes *ucu*. (A) Mapa de pCLD04541. Se destaca el ADN-T modificado, de 9,1 kb, que incluye sus bordes izquierdo (LB) y derecho (RB), y que incorpora un gen de resistencia a kanamicina (*nptII*). Se indican también las dianas de restricción del sitio de clonación múltiple. (B) Mapa de pART7. Se destacan en rojo el promotor *35S* y el terminador *ocs*, que flanquean al sitio de clonación múltiple que contiene las dianas para *KpnI* y *XbaI*. Se destacan en verde el gen de resistencia a ampicilina (*Amp^R*) y en rojo las dianas para la enzima *NotI*. (C) Mapa de pART27. Se destacan en naranja los bordes izquierdo (LB) y derecho (RB) del ADN-T. Se indica también la posición del gen *lacZ'* y los genes de resistencia a kanamicina (*nptII*) y estreptomicina (*Str^R*).

Para el rescate fenotípico de los mutantes *ucu2* (véase el apartado IV.4.2.3.1 de Resultados, en la página 167) hemos utilizado los vectores pART7 y pART27 (Gleave, 1992). El vector pART7 (Figura 17B), derivado de pGEM9Zf(-), presenta un casete de

expresión que incluye el promotor *35S* y el terminador *ocs*, que flanquean un sitio de clonación múltiple en el que se encuentran, entre otras, las dianas para las enzimas *KpnI* y *XbaI*, que se utilizaron para insertar un producto de amplificación correspondiente al gen *UCU2*. Dicho casete de expresión se libera mediante digestión con *NotI*, para su ligación posterior al vector pART27.

El vector pART27 (Figura 17C), de 10,9 kb, incluye los bordes izquierdo (LB) y derecho (RB) del ADN-T, y el segmento *lacZ'* del gen *lacZ*. Dado que contiene una diana para la enzima *NotI*, permite la ligación de pART27 y el casete de expresión de pART7 descrito en el párrafo anterior y la ulterior selección de colonias azules/blancas.

En la Tabla 10 se indican los oligonucleótidos que se utilizaron para la amplificación de los segmentos que contenían la secuencia silvestre de los genes *UCU1* y *UCU2*, que fueron digeridos con las enzimas correspondientes en cada caso, cuya diana se muestra en negrita, tal como se indica en los apartados IV.3.2.3.5 y IV.4.2.3.1 de los Resultados, en las páginas 147 y 167, respectivamente.

Tabla 10.- Oligonucleótidos empleados para la construcción de transgenes

| Oligonucleótido | Clon BAC | Posición en el clon (pb) | Secuencias nucleotídicas (5'→3') ^a |
|-----------------|----------|--------------------------|---|
| XbaI-SH8F | F28A21 | 52.681-52.702 | gcctctaga GGTTCAAATTGTAGGGATTGTC |
| SecF28A21.6R | F28A21 | 57.751-57.774 | TTGAATCAATCTGGAACCTAAAAG |
| ClonMIL23.10F | MIL23 | 59.091-59.111 | gcc ggtacc TCTTCGTGAGTGACTTCGACG |
| ClonMIL23.4R | MIL23 | 56.671-56.691 | gcctctaga GGTAGATCTTTCACGTTGGTC |
| ClonPP2A.1F | MIL23 | 61.107-61.127 | gcc ggtacc TGCCAATAGTTAGAAATGATC |

^aSe indican en mayúsculas las secuencias idénticas al ADN genómico contenido en los clones BAC correspondientes, y en minúsculas la del extremo 5' del oligonucleótido que contiene la diana de restricción que se utilizó para la clonación de productos de amplificación por PCR.

III.12.- Transformaciones

III.12.1.- Transformación de células bacterianas

III.12.1.1.- Obtención de bacterias competentes

La preparación de células competentes se llevó a cabo según el protocolo descrito en Sambrook y Russell (2001) con las modificaciones que se indican a continuación. Este protocolo utiliza cationes divalentes que producen poros en la pared bacteriana.

Para obtener las células competentes se inocularon cultivos de 100 ml de medio líquido LB con la correspondiente estirpe bacteriana, y se incubaron a 37°C en el caso de *Escherichia coli* y a 28°C en el de *Agrobacterium tumefaciens*, y 225 rpm. Una vez que los cultivos alcanzaron una absorbancia (A_{600}) de 0,6-0,8, se enfriaron 5 min en hielo y se

centrifugaron a 4°C y 5.500 rpm (5.445 g) durante 5 min. Tras la eliminación del sobrenadante, se resuspendió el precipitado en 10 ml de tampón TFBI (véase el apartado III.5.2.4, en la página 77). A continuación se centrifugó a 4°C y 4.500 rpm (3.645 g) durante 5 min, desechándose el sobrenadante y resuspendiendo el precipitado en 4 ml de TFBII. Las células preparadas de este modo se distribuyeron en alícuotas de 200 µl, que se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C.

También se han utilizado en esta Tesis células competentes (véase el apartado III.12.1.3, en la página 92) suministradas por un proveedor comercial, tanto de *Escherichia coli* DH10B como de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (véase la Tabla 8, en la página 68).

III.12.1.2.- Transformación por choque térmico

A 200 µl de células competentes preparadas como se describe en el apartado anterior, se les añade la mezcla de ligación (véase el apartado III.6.4, en la página 80) en un tubo *ependorf*, que se mantiene en hielo durante 5 min. A continuación se somete el tubo a un choque térmico durante 90 s en un baño termostatzado a 42°C en el caso de *Escherichia coli* o 37°C en el de *Agrobacterium tumefaciens*, pasándolo inmediatamente a hielo, en donde se mantiene durante 30 min. Se añade a continuación 1 ml de medio líquido LB, incubando a 37 o 28°C y 225 rpm durante 2-4 h. Finalmente, se toman 100 µl de la mezcla de transformación para incorporarlos a un tubo con 3 ml de agar de cobertera suplementado con el correspondiente antibiótico, que ha sido mantenido a 55°C en un termobloque. El contenido del tubo se vierte con rapidez sobre el medio de cultivo sólido de una caja de Petri de 90 mm que ha permanecido a 37°C durante al menos una hora. Las cajas de Petri se mantienen sobre la mesa durante 10 min y se depositan en una estufa a 37 o 28°C, en donde se disponen en posición invertida, incubándolas durante 14-48 horas.

III.12.1.3.- Transformación por electroporación

La transformación por electroporación se basa en la utilización de descargas eléctricas que alteran la estructura de las envueltas celulares bacterianas y permiten la incorporación de ADN exógeno. Hemos empleado un electroporador *Multiporator* (Eppendorf) que permite controlar el voltaje del pulso (en un rango de 200 a 2.500 V), que ha durado habitualmente 5 ms. Hemos utilizado células electrocompetentes de *Escherichia coli* ElectroMAX DH10B (GibcoBRL) y de *Agrobacterium tumefaciens* ElectroMAX LBA4404 (GibcoBRL), siguiendo las instrucciones del fabricante, añadiendo

20 μl de células y 1 μl de la reacción de ligación (véase el apartado III.6.4, en la página 80) a las cubetas de electroporación previamente enfriadas en hielo. Se programaron pulsos de 2.400 V y 5 ms y, tras la electroporación, se transfirieron las células a medio líquido SOC (véase el apartado III.5.1.2.1, en la página 75), en el caso de *Escherichia coli*, o YM (véase el apartado III.5.1.2.1, en la página 75), para *Agrobacterium tumefaciens*, y se procedió a su incubación.

III.12.1.4.- Selección de transformantes

Las bacterias que incorporan el ADN exógeno, denominadas transformantes, deben presentar rasgos fenotípicos que nos permitan distinguirlas del resto de la población que no lo han incorporado. La mayoría de las estirpes bacterianas y vectores utilizados para clonación presentan características que facilitan la selección de los transformantes. El criterio más sencillo es la constatación de la presencia de un marcador de selección, como la resistencia a un antibiótico, codificada por un gen contenido en el vector y ausente del cromosoma bacteriano. En esta Tesis se ha hecho uso de esta estrategia, seleccionando transformantes en medios de cultivo suplementados con ampicilina, kanamicina o estreptomycin.

Un experimento de clonación debe incluir un procedimiento que permita distinguir los plásmidos que han incorporado el inserto que se desea clonar de los que no lo han hecho. El método empleado en la mayoría de las transformaciones realizadas en este trabajo ha sido la selección de colonias azules/blancas (*blue-white selection*). Consiste en la utilización de vectores que incluyen un segmento del gen *lacZ*, cuyo producto, la β -galactosidasa, es capaz de catalizar una reacción colorimétrica con el sustrato X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido). El segmento del gen *lacZ* contenido en el vector sólo incluye una parte de su secuencia codificante. Estos vectores se emplean para transformar estirpes bacterianas que incorporan un gen *lacZ* que también es incompleto, con el que complementan (complementación α). El segmento del gen *lacZ* presente en el vector está fragmentado en dos partes, situadas en fase a ambos lados del sitio de clonación múltiple. La integración de un inserto en el sitio de clonación múltiple supone casi invariablemente un impedimento a la síntesis de un polipéptido capaz de protagonizar una complementación α . Los vectores y estirpes hospedadoras mencionados se utilizan para llevar a cabo la selección de colonias azules o blancas: mediante la adición de X-gal e IPTG (tioisopropil- β -D-galactósido, un inductor gratuito de la expresión del gen *lacZ*) al agar de cobertera utilizado para sembrar las cajas de Petri, se obtiene una coloración azul de las colonias cuyo plásmido no ha incorporado un

inserto (complementación α) y blanca para las que sí lo han hecho (no complementación α).

El X-gal se preparó en disoluciones del 5% m/v en dimetilformamida, y el IPTG en disolución acuosa al 5% m/v, conservándolos a -20°C . Se tomaron 17,5 μl de X-gal y 1,5 μl de IPTG para cada 3 ml de agar de cobertera.

III.12.2.- Transformación de *Arabidopsis thaliana*

Para la obtención de plantas transgénicas en las que se expresan constitutivamente los genes *UCU1* y *UCU2* (véanse los apartados IV.3.2.3.5 y IV.4.2.3.1, en las páginas 147 y 167, respectivamente), hemos llevado a cabo experimentos de transformación de *Arabidopsis thaliana* por infección con una estirpe virulenta de *Agrobacterium tumefaciens* (véase el apartado III.3.2, en la página 67). El protocolo empleado es una modificación del que se recoge en <http://www.bch.msu.edu/pamgreen/vac.txt>, que a su vez deriva de otro original de Bechtold *et al.* (1993; 1998).

III.12.2.1.- Infiltración con *Agrobacterium tumefaciens*

Se sembraron 40-50 semillas de *Arabidopsis thaliana* en macetas cuadradas de polietileno rígido de 10 \times 10 \times 10 cm (largo \times ancho \times alto), en las que permanecieron las plantas hasta que sus inflorescencias alcanzaron una altura de al menos 8 cm, estado en el que presentan muchos capullos florales sin abrir y muy pocos frutos. Las plantas fueron regadas un día antes de la infiltración para propiciar la apertura de sus estomas.

Se llevó a cabo un precultivo de *Agrobacterium tumefaciens* en 2 ml de medio líquido LB (véase el apartado III.5.1.2.1, en la página 75), inoculado con bacterias previamente obtenidas en cajas de Petri conservadas a 4°C . Tras una incubación de 14-48 h a 28°C , se tomaron 400 μl de este precultivo para inocular 400 ml de medio LB, en un matraz de 2 l, que se incubaron a 28°C y 225 rpm hasta que su A_{600} alcanzó un valor de 2, momento en el que se centrifugó a 3.000 rpm (1.620 g) durante 10 min a temperatura ambiente. Se añadió tampón de infiltración (véase el apartado III.5.2.5, en la página 77) al precipitado así obtenido hasta que se obtuvo una suspensión bacteriana con una A_{600} de 0,8, con la que se llenó un recipiente de plástico que fue introducido en un desecador.

La infiltración de las plantas se realizó sumergiéndolas en el recipiente mencionado en el párrafo anterior, que fue cerrado y sometido a un vacío parcial (-1.200 mb) durante 5 min. A continuación, el vacío se interrumpió bruscamente y se procedió a enjuagar las plantas con agua destilada y depositarlas sobre un papel de filtro, en donde

permanecieron durante 5 min. Las macetas así manipuladas fueron introducidas en bolsas de plástico transparente y transferidas a una cámara de cultivo Conviron TC30, en la que permanecieron durante 2 días. Las bolsas fueron retiradas un día después y las macetas transferidas a una cámara climática, en la que no fueron regadas durante los 3 días siguientes. Las semillas fueron recolectadas posteriormente, y almacenadas a 4°C. Todo el material empleado en este tipo de experimentos fue finalmente desinfectado por inmersión en lejía, y las macetas fueron esterilizadas en autoclave.

III.12.2.2.- Selección de transformantes

La selección de las plantas T₂ portadoras de un transgén se efectuó en cajas de Petri que contenían medio GM (véase el apartado III.4.1.1, en la página 69) suplementado con 50 µg/ml de kanamicina. Para ello, se tomaron 0,80 g de semillas (unas 4.000-5.000) en tubos estériles de 11 ml, a los que se añadieron 5 ml de una disolución de lejía al 40% y Triton X-100 al 0,01%. Tras agitar los tubos por inversión durante 10 min, se efectuaron 3 lavados con agua estéril y se añadieron 8 ml de agar de cobertera (véase el apartado III.5.1.2.2, en la página 75) previamente fundido y mantenido a 55°C en un termobloque durante al menos media hora. Tras mezclar por inversión las semillas y el agar de cobertera, la suspensión fue esparcida por la superficie del medio de cultivo.

III.13.- Cartografía génica

La cartografía génica se realizó a partir de muestras de ADN genómico correspondientes a individuos de la progenie F₂ de cruzamientos entre un mutante y un ecotipo distinto de su ancestro silvestre, que deben mostrar el máximo grado posible de polimorfismo para los marcadores a estudio. La población cartográfica está integrada por varios centenares de plantas F₂ que manifiesten el fenotipo recesivo de interés, que se recolectan 21 días después de la siembra, cada una de las cuales es introducida en un tubo *ependorf* de 1,5 ml y mantenida a -80°C hasta su utilización.

III.13.1.- Análisis del ligamiento a SSLP

Para determinar las posiciones de mapa, hemos optado por el método de los SSLP (véase el apartado I.3.4.3.2.1, en la página 13), por su sencillez. Además, la visualización de los productos de PCR se llevó a cabo por un procedimiento optimizado, sustituyendo la tinción convencional con bromuro de etidio por la detección fluorescente en un secuenciador automatizado, merced al marcaje de uno de los oligonucleótidos de

cada pareja de cebadores con un fluorocromo (Ponce *et al.*, 1999; Robles, 1999). Según este método, se ensayan a la vez 21 microsátélites, que son amplificados simultáneamente en un solo tubo de PCR múltiple, que incorpora 21 parejas de cebadores (Ponce *et al.*, 1999).

III.13.1.1.- Amplificaciones mediante PCR múltiple

Las amplificaciones de PCR múltiple se llevaron a cabo en mezclas de reacción de 5 μ l, que incluían 0,2 U de la polimerasa termoestable, 0,5 μ l del tampón 10 \times provisto por el fabricante, los cuatro desoxirribonucleótidos en una concentración 200 μ M, MgCl₂ 2 mM y 1 μ l de la disolución de ADN que se había obtenido a partir de cada planta a estudio (véase el apartado III.6.1, en la página 78). Estas mezclas de reacción incluyeron también 42 oligonucleótidos, cuyas concentraciones fueron 15, 30 o 45 nM, según se indica en Ponce *et al.* (1999). Los termocicladores fueron programados con una desnaturalización inicial de 1,5 min a 94°C, seguida de 40 ciclos (30 s a 94°C, 15 s a 50°C y 2 min a 70°C) y de una incubación final de 7 min a 70°C.

III.13.1.2.- Análisis de fragmentos

Se combinaron 0,8 μ l de la mezcla de PCR múltiple descrita en el apartado anterior con 1,2 μ l de tampón de carga (véase el apartado III.5.2.1, en la página 76). La electroforesis para análisis de fragmentos se llevó a cabo en un secuenciador ABI PRISM 377 (Applied Biosystems), con cristales de 36 cm entre los pocillos y el punto de lectura (*well-to-read*). Las muestras fueron desnaturalizadas a 94°C durante 3 min e inmediatamente introducidas en hielo antes de su carga en el gel, que fue realizada tras un precalentamiento (*prerun*) de 30-60 min a 1.000 V. Se comprobó que el gel hubiera alcanzado una temperatura de 51°C antes de proceder a cargar las muestras. La electroforesis fue llevada a cabo seleccionando el módulo GS 36C-2400 y transcurrió durante 3 h, a 51°C. La determinación de la concentración y el tamaño de los productos de las amplificaciones, lo que se ha dado en llamar análisis de fragmentos, se realizó con el programa GeneScan 2.1 (Applied Biosystems), eligiendo la opción de *Local Southern Method* para el cálculo de la altura de los picos correspondientes a las moléculas identificadas en la electroforesis.

III.13.2.- Análisis del ligamiento a CAPS

También se han utilizado en esta Tesis marcadores CAPS (véase el apartado I.3.4.3.2.2, en la página 14). Para estudiar los correspondientes polimorfismos llevamos a

cabo amplificaciones mediante PCR, en un volumen de reacción de 20 μl (véase el apartado III.7.2, en la página 81), seguidas por la restricción de sus productos con una endonucleasa capaz de reconocer la diana presente en uno de los alelos. Para ello, se tomaron 10 μl de la mezcla de PCR, a los que se añadieron 1 unidad de la enzima de restricción, 1,5 μl de su tampón 10 \times , y H₂O hasta un volumen de 15 μl . Esta mezcla de reacción se incubó en una estufa a 37°C, durante 2 h, para a continuación visualizar los fragmentos de restricción mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%.

III.13.3.- Análisis del ligamiento a SNP

Para determinar los polimorfismos para los marcadores SNP utilizados en la cartografía (véase el apartado I.3.4.3.2.3, en la página 15), se han llevado a cabo amplificaciones mediante PCR (véase el apartado III.7.2, en la página 81), seguidas de la determinación de la secuencia de sus productos mediante reacciones de secuenciación (véase el apartado III.9.1, en la página 84) y su resolución mediante electroforesis capilar en un analizador genético ABI PRISM 3100 (véase el apartado III.9.2, en la página 85).

III.13.4.- Estimación de distancias de mapa

Para los análisis del ligamiento a marcadores moleculares, las frecuencias de recombinación (r) y sus errores estándar (S_r) se estimaron según Koornneef y Stam (1992), siendo:

$$r = \frac{\text{número de cromosomas recombinantes}}{\text{número total de cromosomas}} \cdot 100; S_r = \sqrt{\frac{r(100-r)}{n}}$$

Las frecuencias de recombinación, r , fueron convertidas en distancias de mapa, D , aplicando la función de mapa de Kosambi (1944), que se define como:

$$D = 25 \ln \left[\frac{100 + 2r}{100 - 2r} \right]$$

El error estándar de la distancia de mapa, S_D , se calculó aplicando la fórmula:

$$S_D = \frac{2500S_r}{2500-r^2}$$

En aquellos casos en los que el ligamiento a un marcador resultó ser absoluto, el error de la distancia de mapa fue calculado mediante la fórmula,

$$S_D = \frac{1}{\sqrt{n}}$$

en la que n es el número de cromosomas estudiados (Koornneef y Stam, 1992).

Las distancias entre una mutación y sus marcadores vecinos, así como su ordenación relativa, fueron establecidas con el programa MAPMAKER/EXP 3.0b (Lander *et al.*, 1987; Lincoln *et al.*, 1992), que permite la construcción de mapas de ligamiento a partir de datos de la F₂ de un cruzamiento entre homocigotos (Lander *et al.*, 1987). Este programa (<http://www.hgmp.mrc.ac.uk/Registered/Option/mapmaker.html>) convierte en distancias de mapa las frecuencias de recombinación obtenidas entre dos (análisis del ligamiento entre dos puntos; *two-point analysis*) o más loci (análisis de varios puntos; *multipoint analysis*), aplicando el método de la máxima verosimilitud (*maximum likelihood*; Haldane y Smith, 1947; Morton, 1955) para asignar un valor de LOD (*logarithm of the odds*; Morton, 1955) a cada una de las posibles ordenaciones de los genes a estudio.

III.14.- Análisis morfológico e histológico

III.14.1.- Observación microscópica y microfotografía a bajo aumento

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 con una lupa trinocular Leica MZ6, dotada de un dispositivo microfotográfico Leica WILD MPS48 o Nikon DXM 1200, con iluminación anular de fibra óptica, provista por una fuente de luz fría Olympus Highlight 2000 y otra Volpi Intralux 6000-1.

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 o mediante una cámara digital Sony Cybershot FV-505 a una resolución de 1024×768 pixels. La cámara fue inmovilizada en un soporte Polaroid MP-4 dotado de un equipo de iluminación de cuatro lámparas de tungsteno de 150 W. Las imágenes se procesaron digitalmente con el programa Adobe Photoshop 6.0 program (Adobe Systems Incorporated).

Inmediatamente después de su recolección, las hojas fueron sumergidas en una disolución aclarante en la que se mantuvieron durante toda la noche (80 g de hidrato de cloral en 30 ml de H₂O) con lo que se tornaron transparentes. Las hojas fueron montadas en portaobjetos, en una disolución preparada a partir de 80 g de hidrato de cloral, 20 ml de glicerol y 10 ml de H₂O. Sus patrones de venación fueron dibujados a mano con ayuda de un microscopio Leica DMRB equipado con una cámara clara, empleando ópticas de campo oscuro y contraste interferencial. El análisis morfométrico de las imágenes se realizó con el programa *NIH Image* (disponible en <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>).

Para el estudio de la morfología radicular, las plántulas fueron sumergidas durante 20-60 s en una disolución de yoduro de propidio (10 µg/ml), antes de ser enjuagadas con

agua. A continuación, fueron montadas en portaobjetos y observadas mediante un microscopio confocal Leica TCS-NT, dotado de un láser de Ar/Kr de 75 mW, con líneas de excitación de 488, 568 y 647 nm.

III.14.2.- Preparación de muestras para microscopía óptica

Para la microscopía óptica, el material vegetal fue introducido en viales de centelleo a los que se añadieron 20 ml de la disolución fijadora FAA/Triton (1,85% de formaldehído, 45% de etanol, 5% de ácido acético y 1% de Triton X-100). Los viales se mantuvieron abiertos durante 30 min en una campana de vacío, a una presión de 400 a 600 mb, para sustituir el aire de las muestras por fijador, lo que facilita su hundimiento en la disolución fijadora. Tras mantener las muestras durante al menos 24 h en fijador, se retira éste con una pipeta Pasteur, y se añade etanol del 70% hasta la mitad del volumen del vial. La deshidratación de la muestra se completa a temperatura ambiente, mediante su inmersión sucesiva en etanol del 80, 90 y 95% (1 h en cada disolución). Se activa a continuación la resina para la infiltración de la muestra, disolviendo 0,9 g del catalizador (Peróxido de benzoilo; Polysciences) en 100 ml de resina JB-4 (Polysciences), mediante agitación y en una vitrina de gases, disolución que puede conservarse durante varias semanas a 4°C en la oscuridad. Tras eliminar la mitad del etanol del 95% en que se encontraba sumergida la muestra, se le añade un volumen similar de resina activada, manteniendo el vial a 4°C durante unas 12 h. Finalmente, se decanta la mezcla de resina y etanol y se sustituye por un volumen similar de resina activada, manteniendo el vial a 4°C durante unas 2 h, etapa que ha de repetirse al menos dos veces, asegurándose de que la muestra permanezca totalmente sumergida. Los residuos de resina se recogen en tubos de plástico de 50 ml, a los que debe añadirse el acelerador de la polimerización JB-4B antes de ser desechados.

Para la inclusión de las muestras, se utilizaron bandejas de 20 alveolos de 12 × 16 × 5 mm o de 5 × 12 × 5 mm (Polysciences). Se mezclan, agitando enérgicamente, 25 ml de resina activada y 1 ml del acelerador de la polimerización JB-4B en un tubo de 50 ml, que es a continuación introducido en hielo para evitar una polimerización prematura. Los alveolos se rellenan con esta disolución y se deposita una muestra en cada uno de ellos, cubriéndolos con una pieza cilíndrica de aluminio, que acelera la polimerización al evitar el contacto de la resina con el aire y facilita la manipulación posterior en el microtomo. Tras disponer la pieza metálica sobre la muestra, su adhesión se asegura añadiendo resina hasta rebosar el alveolo. Las muestras pueden ser cortadas

algunas horas más tarde, aunque la polimerización se acelera mediante calentamiento a 50°C en un horno.

Se obtuvieron cortes transversales de 4 a 10 μm de grosor, con un microtomo de rotación MICROM HM 350S (MICROM Internacional GmbH) dotado de cuchillas de acero. Los cortes fueron montados en portaobjetos de 76 \times 26 \times 1 mm, teñidos por inmersión durante 10 s en azul de toluidina al 0,1% m/v, lavados con agua y deshidratados por inmersión sucesiva en disoluciones del 50, 70, 80, 90 y 100% en etanol (10 min en cada una). Los cortes fueron finalmente sumergidos durante 10 min en xilol, en una vitrina de gases, y cubiertos con un cubreobjetos de 22 \times 22 o 22 \times 60 mm, sobre el que previamente se deposita una gota de Eukitt (O. Kindler GmbH & Co.), en la cara que entrará en contacto con la muestra. La observación de estas preparaciones se realizó con un microscopio Leica DMRB, bajo iluminación en campo claro, y su fotografía con un dispositivo microfotográfico Leica WILD MPS48 o Nikon DXM 1200.

III.15.- Ensayos fisiológicos

III.15.1.- Ensayos de respuesta a la gravedad y la luz

III.15.1.1.- Respuesta gravitrópica de la raíz

Para estudiar la respuesta gravitrópica de la raíz, se rotuló la base de las cajas de Petri de modo que quedasen divididas en secciones paralelas, sobre cada una de las cuales se sembraron semillas de un genotipo dado. Las cajas inoculadas fueron orientadas verticalmente, fijándolas con cinta adhesiva a una de las paredes de una cámara de crecimiento Conviron TC30, en donde permanecieron durante 7 días antes de ser rotadas unos 135°, situación en la que fueron mantenidas hasta su observación, 6 días más tarde.

III.15.1.2.- Respuesta fotomorfogénica

Se llevaron a cabo cultivos en la oscuridad de semillas en cajas de Petri, recubriéndolas totalmente con cinco capas de papel de aluminio, inmediatamente después de la siembra. El fenotipo de las plantas fue estudiado tras la incubación de estas cajas durante 11 o 21 días en una cámara de crecimiento Conviron TC30 en las condiciones habituales (véase el apartado III.4.1.1, en la página 69).

III.15.2.- Otros ensayos fisiológicos

Para el análisis de la respuesta de los mutantes *ucu* al tratamiento con fitohormonas, se sembraron las semillas en medio sólido GM en las condiciones

habituales. Las plántulas así obtenidas fueron transferidas, 7 días después de la siembra, a un medio suplementado con distintas concentraciones de hormonas (véase el apartado III.5.1.1.3, en la página 74): 0,05 o 0,1 μM de 24-epibrasinólido, una mezcla sintética de brasinosteroides de distinta procedencia; 1, 10 o 100 μM de GA_3 ; 0,01, 0,1 o 1 μM de IAA; y 0,01 o 0,1 μM de BA. Las plantas tratadas con GA_3 o 24-epibrasinólido se trasplantaron a maceta 24 días después y fueron rociadas con una disolución acuosa con la concentración adecuada de cada hormona, cada tres días a lo largo de las tres semanas siguientes.

Para estudiar los efectos de los brasinosteroides las semillas fueron inoculadas en cajas de Petri que contenían medio GM suplementado con 0,01, 0,1 o 1 μM de 24-epibrasinólido y 0,01 o 0,1 μM de 22(S),23(S)-homobrasinólido, que fueron adheridas a la pared de una cámara de cultivo y mantenidas en la oscuridad durante 11 días. El efecto del ABA sobre la germinación se determinó a los 15 días de la siembra en cajas suplementadas con 3 o 5 μM de ABA.

Para el estudio de la inhibición del crecimiento radicular se sembraron al menos 30 semillas de cada genotipo en cajas de Petri dispuestas en vertical en un medio GM suplementado con 25, 50, 100, 300 o 500 nM de 24-epibrasinólido; 10, 20 o 50 nM de 2,4-D, un análogo sintético de la auxina; 1, 5 o 10 μM de TIBA o NPA, dos inhibidores del eflujo de la auxina (*auxin efflux*); y 1, 5 o 10 μM de 1-NOA, un inhibidor del influjo de la auxina (*auxin influx*). La determinación de la longitud de las raíces, se llevó a cabo estirándolas sobre una placa de Petri con medio GM, en 20 plántulas de cada genotipo, 13 días después de la siembra.

III.16.- Pruebas estadísticas

Hemos realizado ensayos de significación basados en el estadístico χ^2 . Para determinar el modo de herencia de los fenotipos causados por las mutaciones a estudio, hemos aplicado ensayos de bondad de ajuste, expresando en las Tablas correspondientes el valor de χ^2 obtenido al contrastar la hipótesis de que los datos observados se ajustan a la segregación propuesta, destacándolo en cursiva cuando indicó su rechazo. 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), 5,99 (GL = 2), y 7,82 (GL = 3), en donde GL indica el número de grados de libertad. Se empleó la corrección de Yates cuando existieron sólo dos clases fenotípicas.



IV.- RESULTADOS

IV.- RESULTADOS

IV.1.- Aislamiento y caracterización preliminar de los mutantes *ucu*

Con el objetivo de identificar genes implicados en la morfogénesis de la hoja en *Arabidopsis thaliana*, se han llevado a cabo en el laboratorio de J.L. Micol varias búsquedas de mutantes con la morfología foliar alterada. Algunos de ellos fueron inducidos mediante EMS (Berná, 1997; Berná *et al.*, 1999; Robles y Micol, 2001) o neutrones rápidos (Robles, 1999; Robles *et al.*, en preparación), y otros habían sido obtenidos por autores anteriores e incorporados a la colección del *Arabidopsis* Information Service (AIS Form Mutants; Serrano-Cartagena, 1998; Serrano-Cartagena *et al.*, 1999; 2000). Se definieron 23 clases fenotípicas para facilitar su análisis de complementación, que se llevó a cabo en las tres búsquedas antes mencionadas con 153, 28 y 78 mutantes, siendo 94, 8 y 48, respectivamente, los genes a los que correspondieron.

Uno de los fenotipos foliares más extremos encontrados en las búsquedas mencionadas en el párrafo anterior fue el de los mutantes *ultracurvata* (*ucu*), cuyo rasgo más sobresaliente es el de presentar hojas vegetativas circinadas, es decir, con el limbo enrollado en espiral hacia el envés, a lo largo de la vena primaria (Figura 18B-H), a diferencia de las silvestres (Figura 18A), que son aplanadas. En esta Tesis se han estudiado las mutaciones *ucu* que se detallan en la Tabla 11, cuyo origen y caracterización preliminar se describen en los apartados siguientes.

Tabla 11.- Algunas características de los mutantes *ultracurvata* estudiados en este trabajo

| Estirpe* | Alelo | Modo de herencia | Acestro silvestre | Mutágeno |
|----------|----------------|------------------|-------------------|-------------------|
| P1 4.5 | <i>ucu1-1</i> | Semidominante | <i>Ler</i> | EMS |
| P9 36.1 | <i>ucu1-2a</i> | Semidominante | <i>Ler</i> | EMS |
| P9 42.1 | <i>ucu1-2b</i> | Semidominante | <i>Ler</i> | EMS |
| P14 12.1 | <i>ucu1-3</i> | Recesivo | <i>Ler</i> | EMS |
| P2 46.8 | <i>ucu2-1</i> | Recesivo | <i>Ler</i> | Neutrones rápidos |
| CS3397' | <i>ucu2-2</i> | Recesivo | Col-1 | Rayos X |
| P18.3 | <i>ucu2-3</i> | Recesivo | Col-0 | ADN-T |
| N512836 | <i>ucu2-4</i> | Recesivo | Col-0 | ADN-T |

*Se indica el número de protocolo de las estirpes obtenidas en el laboratorio de J.L. Micol o el código de las que proceden de otras colecciones.

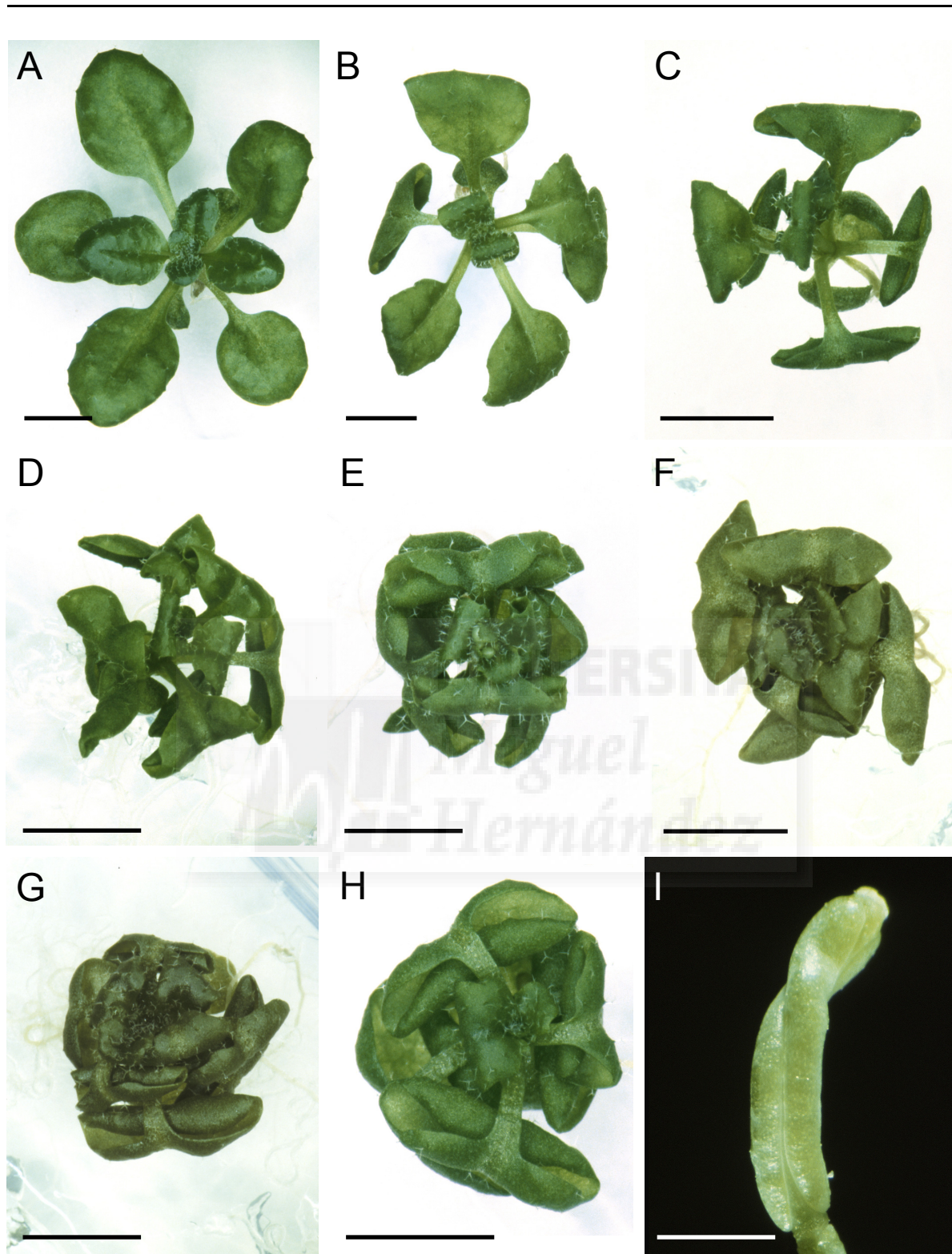


Figura 18.- Fenotipo de los mutantes *ucu*. Las imágenes corresponden a rosetas de los siguientes genotipos: (A) *Ler* (*UCUI/UCUI*), (B) *ucu1-3/ucu1-3*, (C) *ucu1-1/UCUI*, (D) *ucu1-1/ucu1-3*, (E) *ucu1-2/ucu1-2*, (F) *ucu2-1/ucu2-1*, (G) *ucu2-2/ucu2-2*, y (H) *ucu2-3/ucu2-3*. (I) Rotación helicoidal del pistilo en el mutante *ucu2-1/ucu2-1*. Las fotografías fueron tomadas 21 (A-H) y 45 (I) días después de la siembra. Las barras de escala indican 2 (I) y 3 mm (A-H).

IV.1.1.- Alelos obtenidos en Tesis anteriores

Los ensayos de alelismo realizados con los mutantes *ucu* (Berná, 1997; Berná *et al.*, 1999; Robles, 1999; Robles *et al.*, en preparación) han permitido asignarlos a dos grupos de complementación. Uno de ellos, *ULTRACURVATA1 (UCU1)*, está integrado por tres alelos mutantes, dos de los cuales son semidominantes, *ucu1-1* (cuyo número de protocolo fue P1 4.5) y *ucu1-2* [*ucu1-2a* (P9 36.1; Figura 18E) y *ucu1-2b* (P9 42.1), presuntamente iguales], y el tercero recesivo, *ucu1-3* (P14 12.1), cuyo fenotipo es el más débil (Figura 18B). Al segundo grupo de complementación, *UCU2*, pertenecía sólo un alelo recesivo identificado con anterioridad al comienzo de esta Tesis. Los individuos *ucu2-1/ucu2-1* (Figura 18F) son muy similares a los *ucu1-1/ucu1-1* y *ucu1-2/ucu1-2*, y presentan además rotación helicoidal de algunos de sus órganos, como las raíces y las silicuas (Figura 18I).

IV.1.2.- Obtención de nuevos alelos *ucu2*

La estirpe CS3397, inicialmente denominada *invalida (inl)* por Rédei, presenta el fenotipo Ucu y una floración mucho más tardía que la silvestre, rasgo este último causado por la homocigosis para la mutación recesiva *gigantea-2 (gi-2)*. En un trabajo anterior a esta Tesis se determinó el modo de herencia recesivo de la mutación responsable del fenotipo Ucu de esta estirpe y se excluyó su alelismo con respecto a las mutaciones *ucu1* (Figura 18G; Serrano-Cartagena, 1998; Serrano-Cartagena *et al.*, 1999).

Con el propósito de segregar la mutación *gi-2* de la línea CS3397, se efectuó un cruzamiento CS3397 × Col-0 y se eligieron aquellos individuos de su F₂ que presentaron el fenotipo Ucu y floración normal (Tabla 12). Una de estas plantas, a la que se llamó en lo sucesivo CS3397', fue cruzada por un individuo *ucu2-1/ucu2-1*, lo que permitió establecer que era portadora de un nuevo alelo del gen *UCU2*, al que hemos denominado *ucu2-2* (Tabla 12). Las plantas *ucu2-2/ucu2-2* también presentan rotación helicoidal de las raíces y las silicuas.

En una búsqueda de mutantes inducidos mediante ADN-T realizada en el laboratorio de J.L. Micol se aisló un mutante enano, al que se denominó P18.3 (Figura 18H), cuyo fenotipo es muy similar al causado por las mutaciones *ucu2-1* y *ucu2-2*. En la Tabla 12 se indican los resultados obtenidos en la caracterización del modo de herencia recesivo del fenotipo mutante de esta estirpe. Tras comprobarse su alelismo con *ucu2-1*, la estirpe mutante P18.3 pasó a denominarse *ucu2-3/ucu2-3*.

Tabla 12.- Estudio del modo de herencia del fenotipo Ultracurvata

| Cruzamiento (♀ × ♂) | F ₁ | F ₂ | | | F ₃ |
|--------------------------------|----------------|----------------|-----|----------|----------------|
| | | Silvestre | Ucu | χ^2 | |
| Col-0 × CS3397 | Silvestre | 64 | 17 | 0,498 | Homogénea |
| | Silvestre | 66 | 18 | 0,397 | Homogénea |
| | Silvestre | 60 | 16 | 0,439 | Homogénea |
| Ler × CS3397' | Silvestre | 123 | 39 | 0,033 | Homogénea |
| CS3397' × <i>ucu2-1/ucu2-1</i> | Ucu | Homogénea | | | |
| Col-0 × P18.3 | Silvestre | 148 | 79 | 1,174 | Homogénea |
| | Silvestre | 154 | 51 | 0,002 | Homogénea |
| | Silvestre | 163 | 45 | 1,083 | Homogénea |
| Ler × P18.3 | Silvestre | 218 | 93 | 3,731 | Homogénea |
| P18.3 × <i>ucu2-1/ucu2-1</i> | Ucu | Homogénea | | | |
| | Ucu | Homogénea | | | |
| | Ucu | Homogénea | | | |

Se indica el número de individuos de cada clase fenotípica. En aquellos casos en los que sólo se encontró una clase fenotípica, se indican sus características (“Silvestre” o “Ucu”). Se usa la palabra “Homogénea” para referirse a la ausencia de variaciones apreciables en la expresividad de las mutaciones a estudio. Los valores de χ^2 indican el ajuste de los datos de la población F₂ estudiada a una segregación fenotípica esperada 3:1 (véase el apartado III.16 de Materiales y Métodos, en la página 101).

La progenie F₂ resultante de la autofecundación de 26 plantas de fenotipo silvestre de la F₁ del cruzamiento Col-0 × P18.3 incluyó plantas resistentes a kanamicina (Kan^R), algunas de ellas con morfología silvestre, y otras Ucu, así como individuos sensibles al antibiótico (Kan^S). Además, en sólo una de dichas 26 familias F₂ la segregación fenotípica obtenida se ajustó a la proporción 3:1 (Kan^R:Kan^S) esperada para la resistencia a la kanamicina derivada de la presencia de únicamente una inserción de ADN-T. De hecho, en 18 de las 26 familias F₂ estudiadas la segregación obtenida se ajustó a una proporción 15:1, lo que sugiere la existencia de dos inserciones de ADN-T en homocigosis en la estirpe original P18.3.

Con el fin de segregar las inserciones de ADN-T de la línea mutante P18.3, establecimos 30 familias F₃ a partir de otros tantos individuos Ucu de una de las familias F₂ que mejor se ajustaba a la segregación 15:1. En 19 de estas familias F₃ sólo encontramos plantas Kan^R, mientras que en otras 8 la segregación Kan^R:Kan^S se ajustó a la proporción 3:1 ($\chi^2 = 1,969$), y sólo en dos todas las plantas fueron Kan^S. La siembra de semillas F₃ de estas dos últimas familias en un medio sin antibiótico condujo a la aparición de plantas silvestres y Ucu en una proporción 3:1. Se dedujo de lo anterior que

el fenotipo Ucu no cosegregaba con ninguna de las inserciones de ADN-T inicialmente presentes en la estirpe P18.3.

Hemos verificado la validez de los resultados de los análisis de complementación que recoge la Tabla 12, con el propósito de excluir la posibilidad de que los individuos a estudio fueran el resultado de la autofecundación accidental del parental femenino. Para ello, se determinó el origen de los alelos de varios microsatélites en 6 plantas de la progenie F₁ de cada uno de los ensayos de alelismo realizados con las estirpes CS3397' y P18.3, según se detalla en el apartado III.13 de Materiales y Métodos, en la página 95. Se ratificó así en todos los casos su heterocigosis para Ler y Col-0, o para Ler y Col-1.

IV.1.3.- Relaciones alélicas entre las mutaciones *ucu1*

Hemos realizado todos los cruzamientos posibles entre homocigotos para los alelos del gen *UCU1*, estudiando el fenotipo de su progenie F₁ (Figura 18 y Tabla 13). Estos individuos pueden ordenarse, de menor a mayor intensidad de su fenotipo mutante, tal como sigue (se indican entre paréntesis las denominaciones que hemos asignado a los diferentes grados de severidad del fenotipo Ucu; véase el pie de la Tabla 13): *UCU1/UCU1* (Silvestre) \approx *ucu1-3/UCU1* < *ucu1-3/ucu1-3* (UcuD) < *ucu1-1/UCU1* \approx *ucu1-2/UCU1* (Ucul) < *ucu1-1/ucu1-3* \approx *ucu1-2/ucu1-3* (UcuF) < *ucu1-1/ucu1-1* \approx *ucu1-1/ucu1-2* \approx *ucu1-2/ucu1-2* (UcuE). De lo anterior se deduce que los alelos más extremos son *ucu1-1* y *ucu1-2*, que son semidominantes e indistinguibles en sus efectos fenotípicos. El alelo más débil es el recesivo *ucu1-3*. Los fenotipos de los tres alelos parecen aditivos, independientemente de su modo de herencia.

Tabla 13.- Segregación fenotípica en la progenie de los cruzamientos entre mutantes *ucu1*

| Cruzamiento (♀ × ♂) | F ₁ | F ₂ | | | | | χ^2 |
|---|----------------|----------------|------|------|------|-----------|--------------------|
| | | UcuE | UcuF | Ucul | UcuD | Silvestre | |
| <i>UCU1/UCU1</i> × <i>ucu1-1/ucu1-1</i> | 41 Ucul | 58 | | 85 | | 55 | 4,051 ^a |
| <i>UCU1/UCU1</i> × <i>ucu1-2/ucu1-2</i> | 24 Ucul | 83 | | 148 | | 87 | 1,623 ^a |
| <i>UCU1/UCU1</i> × <i>ucu1-3/ucu1-3</i> | 26 Silvestre | | | | 46 | 154 | 0,327 ^b |
| <i>ucu1-1/ucu1-1</i> × <i>ucu1-2/ucu1-2</i> | 37 UcuE | 193 | | | | | - |
| <i>ucu1-1/ucu1-1</i> × <i>ucu1-3/ucu1-3</i> | 26 UcuF | 44 | 79 | | 39 | | 0,407 ^a |
| <i>ucu1-2/ucu1-2</i> × <i>ucu1-3/ucu1-3</i> | 35 UcuF | 40 | 71 | | 41 | | 0,671 ^a |

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 12, en la página 106. Las abreviaturas corresponden a diferentes grados de severidad del fenotipo mutante Ultracurvata (Ucu): E, extremo; F, fuerte; I, intermedio; D, débil. El valor de χ^2 representa el ajuste de los datos de la población F₂ estudiada a una segregación fenotípica esperada ^a1:2:1 o ^b3:1.

IV.2.- Caracterización fenotípica de los mutantes *ucu*

IV.2.1.- Arquitectura foliar

Las hojas vegetativas de los mutantes *ucu* están recurvadas hacia el envés a lo largo de su eje proximodistal, que está definido por la vena primaria (Figura 19B-D). Su número de hojas vegetativas y su filotaxia son similares a las de su ancestro silvestre.

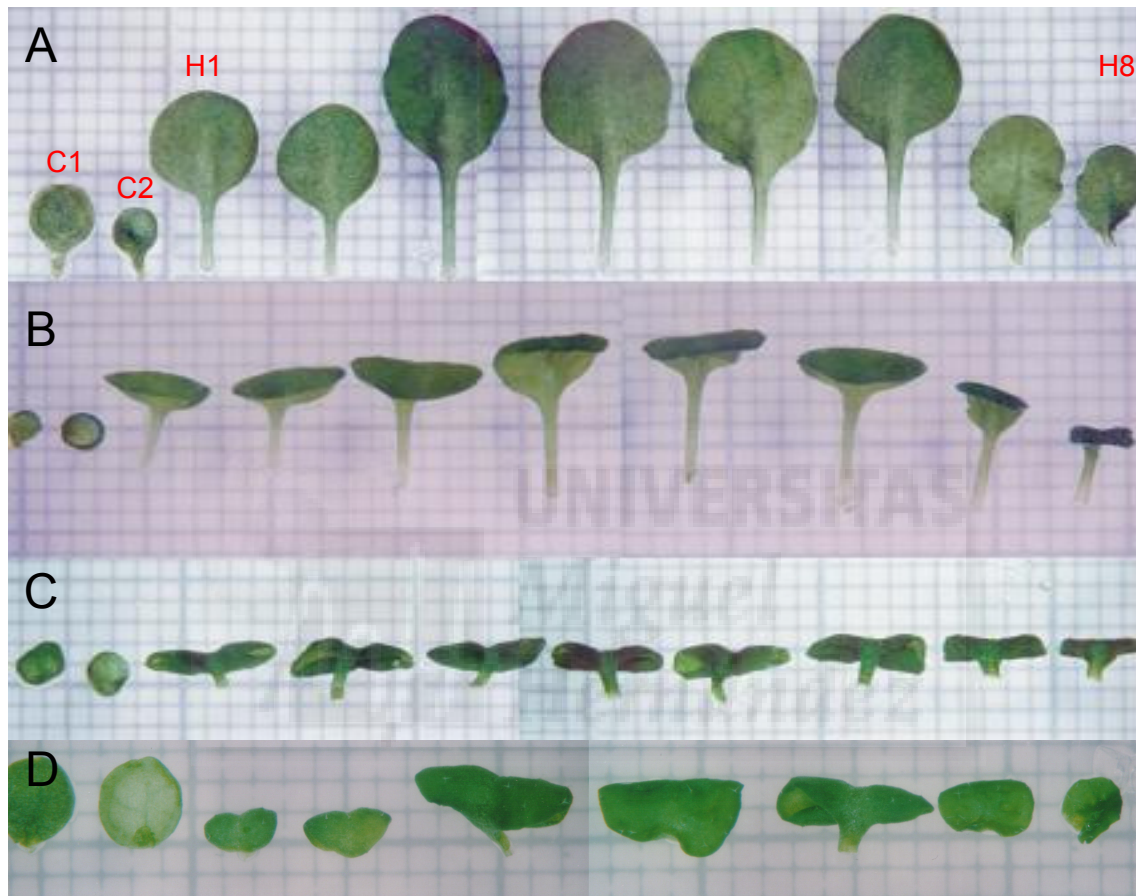


Figura 19.- Fenotipo foliar de los mutantes *ucu*. Se muestran los cotiledones (C1 y C2) y las hojas vegetativas, ordenadas de izquierda a derecha en función del momento de su aparición (H1 a H8), de (A) *Ler*, (B) *ucu1-3/ucu1-3*, (C) *ucu1-1/ucu1-1*, y (D) *ucu2-1/ucu2-1*. A diferencia de las restantes, las hojas del séptimo y octavo nudo (H7 y H8) no estaban completamente expandidas en el momento de su recolección, 23 días después de la siembra. Cada lado de la cuadrícula corresponde a 1 mm.

Hemos determinado la longitud del peciolo y el limbo, así como la anchura de este último, en las hojas vegetativas del primer (Tabla 14) y tercer nudo (Tabla 15), recolectadas 23 días después de la siembra. Estas hojas fueron tratadas con hidrato de cloral para reblandecerlas y poder extenderlas sobre un portaobjetos (véase el apartado III.14.2 de Materiales y Métodos, en la página 99).

Tabla 14.- Análisis morfométrico de las hojas vegetativas del primer nudo de los mutantes *ucu*

| Genotipo | Limbo | | | Longitud del peciolo |
|----------------------|-----------|-----------|-------------------------|----------------------|
| | Longitud | Anchura | Relación longitud/ancho | |
| <i>Ler</i> | 5,85±0,79 | 5,30±0,70 | 1,10±0,21 | 3,23±0,62 |
| <i>ucu1-3/ucu1-3</i> | 5,04±0,63 | 4,89±0,33 | 1,03±0,15 | 2,23±0,36 |
| <i>ucu1-1/UCU1</i> | 3,34±0,44 | 4,44±0,32 | 0,75±0,11 | 2,50±0,35 |
| <i>ucu1-1/ucu1-1</i> | 2,94±0,27 | 4,91±0,57 | 0,60±0,09 | 0,87±0,17 |
| <i>ucu1-2/ucu1-2</i> | 3,05±0,56 | 5,11±0,80 | 0,60±0,14 | 1,10±0,42 |
| <i>ucu2-1/ucu2-1</i> | 2,74±0,36 | 4,57±0,54 | 0,60±0,11 | 1,56±0,35 |

Cada valor (mm) corresponde a la media de 15 hojas, con indicación de su desviación estándar, recolectadas 23 días después de la siembra.

Tabla 15.- Análisis morfométrico de las hojas vegetativas del tercer nudo de los mutantes *ucu*

| Genotipo | Limbo | | | Longitud del peciolo |
|----------------------|-----------|-----------|-------------------------|----------------------|
| | Longitud | Anchura | Relación longitud/ancho | |
| <i>Ler</i> | 7,31±0,95 | 5,65±0,89 | 1,30±0,27 | 4,04±0,91 |
| <i>ucu1-3/ucu1-3</i> | 5,41±0,91 | 4,76±0,62 | 1,14±0,24 | 2,91±0,30 |
| <i>ucu1-1/UCU1</i> | 3,78±0,39 | 4,20±0,34 | 0,90±0,12 | 3,58±0,92 |
| <i>ucu1-1/ucu1-1</i> | 3,08±0,34 | 5,35±0,55 | 0,58±0,09 | 1,96±0,55 |
| <i>ucu1-2/ucu1-2</i> | 3,54±0,51 | 5,32±0,47 | 0,67±0,11 | 1,93±0,50 |
| <i>ucu2-1/ucu2-1</i> | 2,80±0,41 | 3,99±0,81 | 0,70±0,18 | 1,31±0,40 |

Se siguen las pautas definidas en la Tabla 14.

La anchura del limbo de las hojas vegetativas de los mutantes *ucu* es sólo ligeramente inferior a la de su ancestro silvestre. Por el contrario, su longitud es significativamente menor. En estos mutantes se aprecia una gran reducción de la longitud de las hojas a lo largo de su eje proximodistal, tanto en el limbo como en el peciolo (Figura 19C-D; Tabla 14 y 15). En las plantas *ucu1-3/ucu1-3*, sin embargo, sólo la región apical del limbo está deformada (Figura 19B; Tabla 14 y 15), mientras que los heterocigotos *ucu1-1/UCU1* y *ucu1-2/UCU1* presentan un fenotipo intermedio, estando acortado fundamentalmente el limbo y en menor medida el peciolo (Tabla 14 y 15). Se observa, por tanto, que la deformación de la hoja que caracteriza al fenotipo *Ucu* se manifiesta de diferente modo a lo largo del eje proximodistal de la hoja en los distintos mutantes *ucu1* estudiados (véase el apartado IV.1.3, en la página 107).

La relación longitud/anchura del limbo de las hojas de los homocigotos para los alelos *ucu1-1*, *ucu1-2* y *ucu2-1* es menor de 1 (Tabla 14 y 15). Las de sus ancestros silvestres, por el contrario, son mayores de 1, dado que sus hojas son lanceoladas. Las hojas de las plantas *ucu1-1/ucu1-1*, *ucu1-2/ucu1-2* y *ucu2-1/ucu2-1* presentan, además, un estrechamiento de la región central del limbo, junto a la vena primaria (Figura 19C-D).

IV.2.1.1.- Expansión de las hojas vegetativas

Hemos recolectado hojas del tercer nudo de *Ler* y los mutantes *ucu1-1/ucu1-1*, *ucu1-3/ucu1-3* y *ucu2-1/ucu2-1*, cada dos días, desde el decimotercero después de la siembra hasta el trigésimo primero, a fin de estudiar cómo progresa su expansión. Las muestras se trataron con hidrato de cloral y se extendieron sobre un portaobjetos, dibujándose su perfil con ayuda de un microscopio dotado de una cámara clara (Figura 20; véase el apartado III.14.2 de Materiales y Métodos, en la página 99).

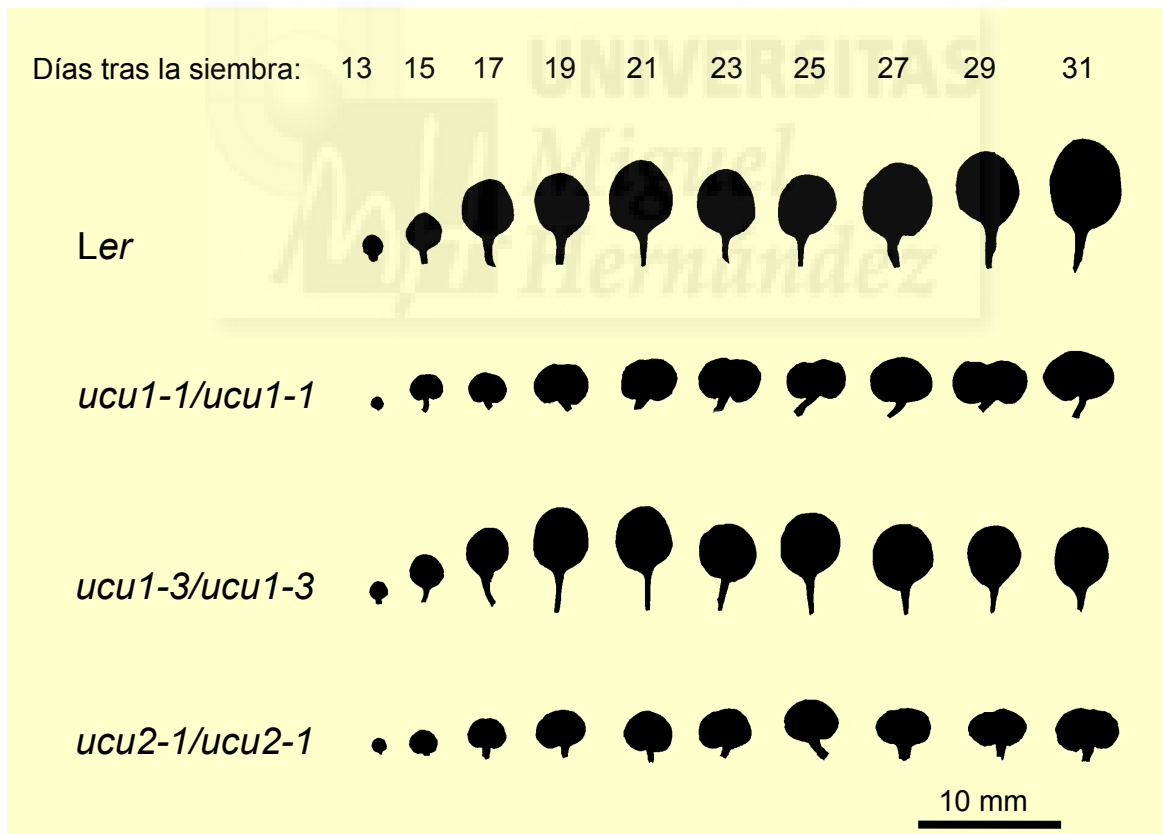


Figura 20.- Expansión de la tercera hoja de los mutantes *ucu*.

En la Figura 20 se observa que el limbo de los mutantes y el silvestre crece a un ritmo similar a lo largo del eje mediolateral. Por el contrario, su expansión longitudinal es notablemente menor en los primeros. El enrollamiento hacia el envés de las hojas de los

mutantes *ucu* se incrementa durante su expansión, siendo más acusado conforme éstas crecen, y manifestándose en la región apical del limbo antes que en la basal.

IV.2.1.2.- Morfología de las hojas caulinares

Las hojas caulinares de la estirpe *Ler* carecen de peciolo y son lanceoladas y aserradas (Figura 21A; véase también el apartado I.4.3 de la Introducción, en la página 23). Las de los mutantes *ucu1-1* y *ucu1-2* están circinadas (Figura 21B), de modo similar a las vegetativas. Las hojas caulinares de los mutantes *ucu2*, sin embargo, no están enrolladas hacia el envés, son ligeramente más anchas que las silvestres y están arrugadas (Figura 21C).



Figura 21.- Hojas caulinares de los mutantes *ucu*. Se muestran las hojas del noveno nudo de la estirpe *Ler* (A) y de los mutantes *ucu1-1/ucu1-1* (B) y *ucu2-1/ucu2-1* (C). Las imágenes se obtuvieron 30 días después de la siembra. Las barras de escala indican 2 mm.

IV.2.1.3.- Patrón de venación

Hemos visualizado el tejido vascular de las hojas del primer y tercer nudo en los mutantes *ucu*, mediante tratamiento con hidrato de cloral (véase el apartado III.14.2 de Materiales y Métodos, en la página 99). Tanto la densidad de los elementos vasculares como el número de bucles de la venación son similares en los mutantes (Figura 22B-C) y sus ancestros silvestres (Figura 22A). Sin embargo, la vena primaria es más corta en los mutantes *ucu*.

En el mutante *ucu2-1/ucu2-1* hemos encontrado alteraciones en la estructura de los haces vasculares de la raíz, que están rotados helicoidalmente, al igual que ocurre con otros órganos cilíndricos (véase el apartado IV.2.2.6, en la página 119). Los haces vasculares de la hoja de *ucu2-1/ucu2-1*, por el contrario, no muestran rotación helicoidal (Figura 22D).

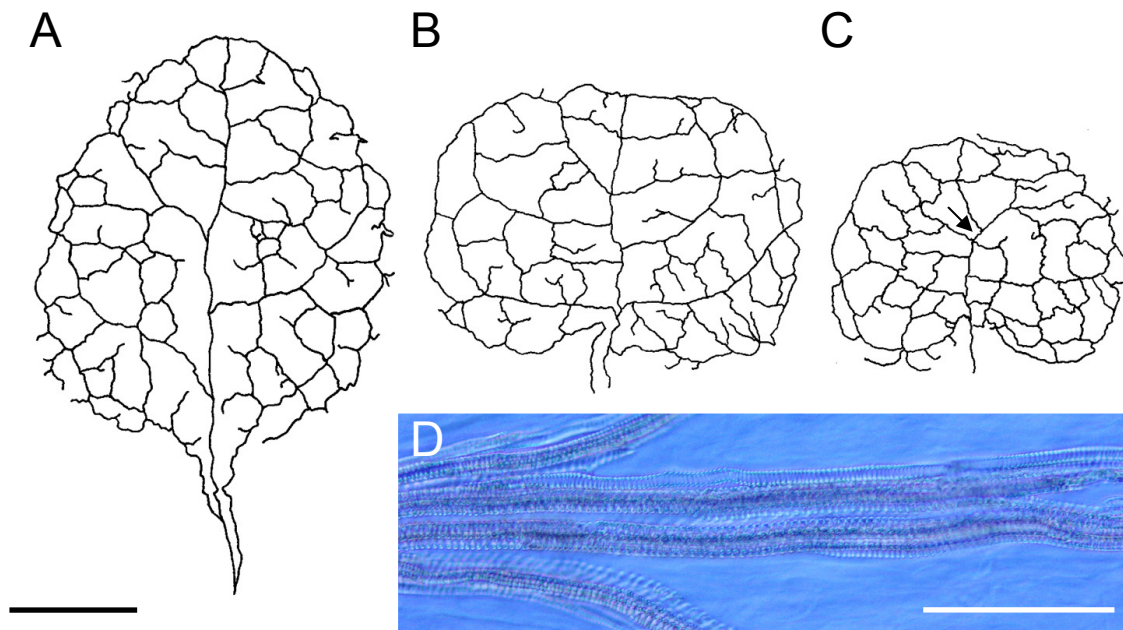


Figura 22.- Venación de los mutantes *ucu*. Los dibujos del patrón de venación corresponden a hojas del tercer nudo de (A) *Ler*, (B) *ucu1-2/ucu1-2* y (C) *ucu2-1/ucu2-1*. (D) Microfotografía de contraste interferencial de la vena primaria de *ucu2-1/ucu2-1* en la región indicada con una flecha en C. Las muestras se recolectaron 23 días después de la siembra. Las barras de escala indican 1 mm (A-C) y 100 μ m (D).

IV.2.1.4.- Epidermis

La epidermis adaxial de las hojas de los mutantes *ucu1-1/ucu1-1* y *ucu1-2/ucu1-2* se arruga al extenderla sobre un portaobjetos, por lo que no hemos podido comparar el tamaño de sus células epidérmicas con el del tipo silvestre. Sin embargo, hemos observado que las células pavimentosas de la epidermis del envés de estos mutantes, que no se arruga por este procedimiento, presentan un tamaño sensiblemente menor que las de *Ler* (Figura 23A-C). Se aprecia heterogeneidad de los tamaños de las células pavimentosas de la epidermis abaxial en los mutantes *ucu2-1/ucu2-1*, ya que algunas de ellas son similares a las silvestres y otras son menores (Figura 23C). El número de estomas por unidad de superficie en el envés de los mutantes *ucu1-1/ucu1-1* y *ucu1-2/ucu1-2* es mayor que en el tipo silvestre (Figura 23B-C). Dado que el tamaño de sus células epidérmicas abaxiales también es menor, su número total de estomas no difiere, probablemente, del silvestre. En los mutantes *ucu2-1/ucu2-1* se observan grupos de dos estomas adyacentes con mayor frecuencia que en el tipo silvestre (Figura 23C). Por último, la morfología y la distribución espacial de los tricomas en el haz de las hojas juveniles de los mutantes *ucu* es similar al silvestre.

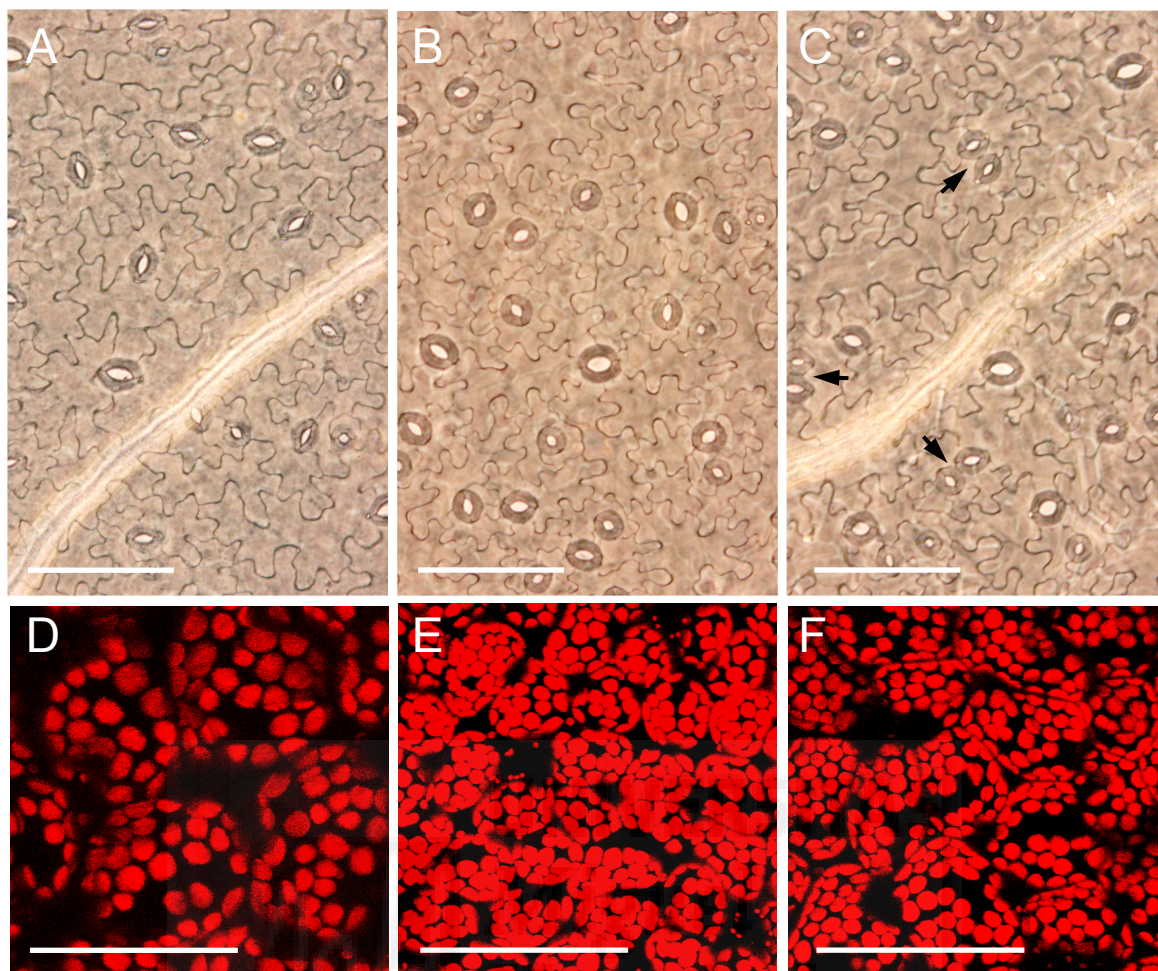


Figura 23.- Morfología de las células epidérmicas y del mesófilo en empalizada en los mutantes *ucu*. Las imágenes corresponden a células de la epidermis abaxial (A-C) y cloroplastos del mesófilo en empalizada (D-F) de hojas del tercer nudo de la estirpe *Ler* (A, D) y los mutantes *ucu1-1/ucu1-1* (B, E) y *ucu2-1/ucu2-1* (C, F). Las fotografías se obtuvieron mediante microscopía óptica de contraste interferencial (A-C) y confocal (D-F). Las flechas (C) indican la presencia de estomas adyacentes en la epidermis abaxial de las hojas *ucu2-1/ucu2-1*. Las muestras se recolectaron 23 días después de la siembra. Las barras de escala indican 100 μm .

IV.2.1.5.- Ultraestructura

Hemos obtenido cortes histológicos de las hojas del tercer nudo de los mutantes *ucu* (véase el apartado III.14.2, en la página 99). El número y tamaño de sus células epidérmicas adaxiales, determinado a lo largo de su eje proximodistal, es similar en los mutantes *ucu* y en sus ancestros silvestres (Figura 24). Sin embargo, el tamaño de las células pavimentosas abaxiales es mucho menor en los mutantes *ucu1* que en *Ler* (Figura 24). Además, las hojas de los mutantes *ucu1-1* y *ucu1-2* son más gruesas que las silvestres y presentan un mayor número de capas de células del mesófilo. Estas últimas son ligeramente más pequeñas que las silvestres y están densamente empaquetadas,

observándose menos espacios intercelulares que en *Ler* (Figura 24C). Estos resultados indican que la curvatura de las hojas de los mutantes *ucu1* se debe a una reducción de la expansión celular a lo largo del eje proximodistal, que se manifiesta en los tejidos abaxiales, principalmente en sus células epidérmicas (véase el apartado IV.2.1.3, en la página 111).

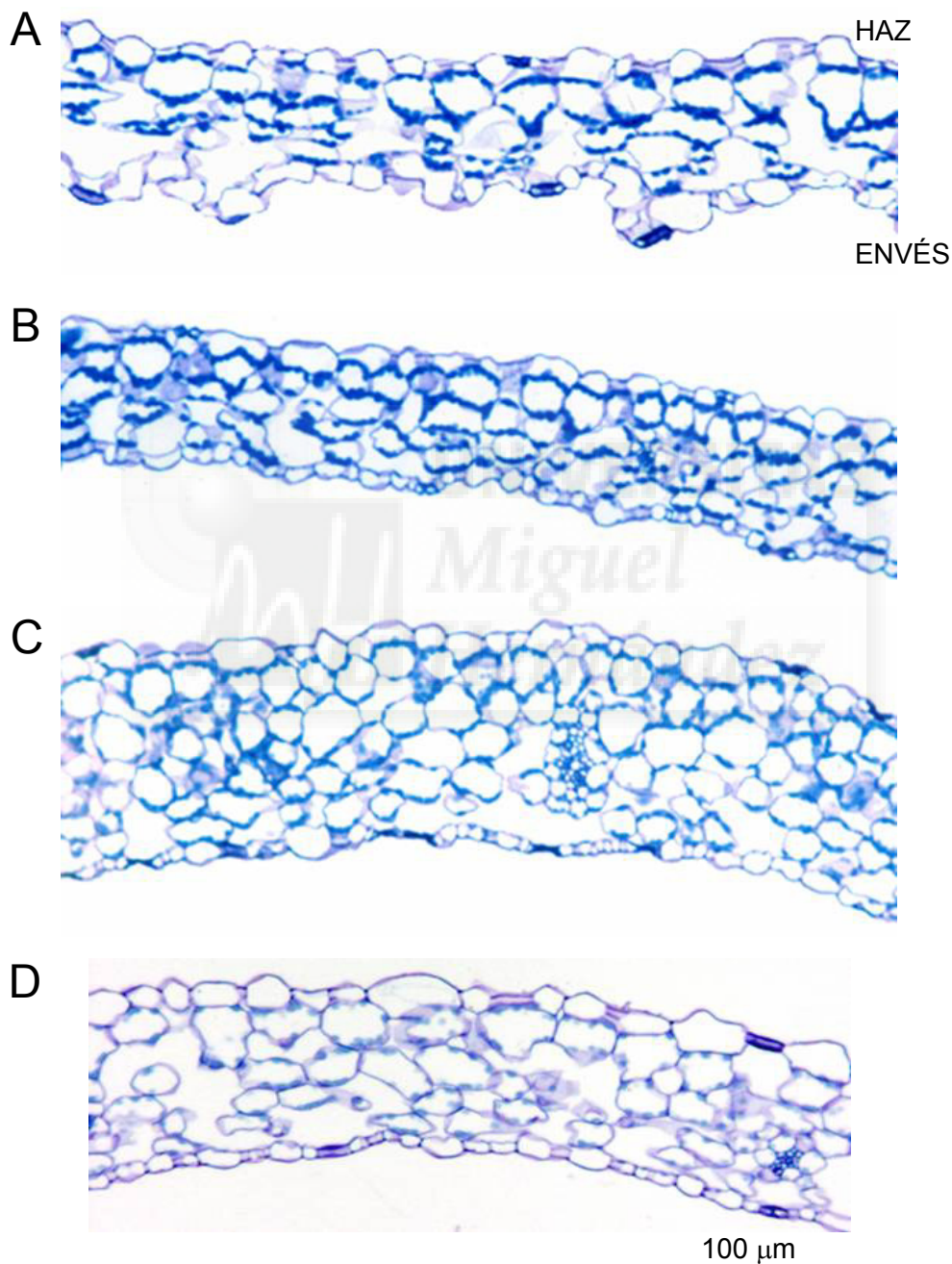


Figura 24.- Cortes transversales de hojas vegetativas del tercer nudo, realizados aproximadamente en el centro del limbo, de los mutantes *ucu* y su ancestro silvestre. (A) *Ler*, (B) *ucu1-3/ucu1-3*, (C) *ucu1-2/ucu1-2*, y (D) *ucu2-1/ucu2-1*. Las muestras se obtuvieron 23 días después la siembra.

Las hojas de los mutantes *ucu1* y *ucu2* presentan un color verde intenso, más oscuro que el de sus ancestros silvestres. Este rasgo probablemente se debe al menor tamaño de las células de su mesófilo, en cuyo interior se observa una densidad de cloroplastos mayor que la silvestre (véase la Figura 23D-F, en la página 113).

Las células de la epidermis abaxial de los mutantes *ucu2-1/ucu2-1* (Figura 24D) no son manifiestamente menores que las de la estirpe *Ler*. Tampoco hemos observado diferencias notables con el tipo silvestre en la organización interna de las hojas *ucu2/ucu2*, que manifiestan, sin embargo, heterogeneidad en el tamaño de sus células epidérmicas abaxiales y abundancia de grupos de dos estomas adyacentes (véase la Figura 23C, en la página 113, y el apartado IV.2.1.4, en la página 112).

IV.2.2.- Otros rasgos del fenotipo mutante

IV.2.2.1.- Estructura corporal

Hemos determinado los valores de diferentes parámetros corporales de las plantas *ucu* (Tabla 16). De nuestros resultados se deduce que el enanismo de los mutantes *ucu* se debe fundamentalmente a que la longitud de los órganos situados a lo largo de su eje apical-basal es inferior a la silvestre (Tabla 16). En el caso de los individuos *ucu2/ucu2*, la rotación helicoidal de los órganos radiales contribuye también a acortarlos (véase el apartado IV.2.2.6, en la página 119).

Tabla 16.- Algunos parámetros corporales en los homocigotos *ucu/ucu*

| | <i>Ler</i> | <i>ucu1-1</i> | <i>ucu1-2</i> | <i>ucu1-3</i> | <i>ucu2-1</i> |
|--|------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Longitud de la raíz principal ^a | 64,3±9,0 | 28,9±12, | 27,5±9,3 | 40,9±10,5 | 30,5±9,4 |
| Longitud del hipocotilo ^a | 2,1±0,4 | 1,0±0,2 | ND | 1,7±0,3 | ND |
| Número de hojas vegetativas ^b | 9,4±0,6 | 9,5±0,8 | 9,5±0,8 | 9,5±0,5 | 9,9±0,9 |
| Cuerda mayor de la roseta ^b | 21,9±4,3 | 7,6±1,7 | 7,6±1,6 | 17,7±1,7 | 7,4±1,6 |
| Peso fresco ^b | 24,4±4,0 | 10,7±3,9 | 12,0±3,7 | 15,2±3,5 | 9,4±3,4 |
| Peso seco ^b | 1,9±0,4 | 1,0±0,9 | 1,1±0,5 | 1,4±0,5 | 0,8±0,3 |
| Longitud del pedicelo del fruto ^c | 3,5±1,1 | 1,8±0,7 | 1,6±0,9 | 1,4±0,3 | 1,4±1,2 |
| Longitud de la silicua ^c | 8,5±1,0 | 4,6±0,9 | 4,7±0,9 | 6,8±0,6 | ND |
| Semillas por silicua ^c | 34,1±5,2 | 15,8±4,1 | 13,4±5,0 | 26,7±2,9 | ND |
| Longitud del tallo principal ^c | 197,8±30,9 | 59,9±8,9 | 59,9±8,9 | 149,6±17,7 | 36,4±12,6 |
| Número de tallos secundarios ^c | 2,1±0,7 | 4,4±0,4 | 3,9±0,9 | 3,9±0,9 | 6,2±1,8 |

Los valores corresponden a la media de 20 medidas, con indicación de su desviación estándar. Las longitudes se indican en mm y los pesos en mg. Se estudiaron plantas recolectadas ^a11, ^b21 o ^c49 días después de la siembra. ND: No determinado.

IV.2.2.2.- Alteraciones de la expansión celular

Hemos estudiado las células de los mutantes *ucu1* en algunos de los órganos que presentan una reducción en su longitud, como la raíz principal, el hipocotilo, los peciolo, los pedicelos y las silicuas. El número de células epidérmicas a lo largo del eje longitudinal de estos órganos no difiere significativamente del silvestre, aunque la longitud de cada una de ellas es sensiblemente menor. La longitud de las células epidérmicas del hipocotilo de los mutantes *ucu1-3/ucu1-3* y *ucu1-2/ucu1-2* es 1,5 y 5,5 veces menor, respectivamente, que la de *Ler* (Figura 25).

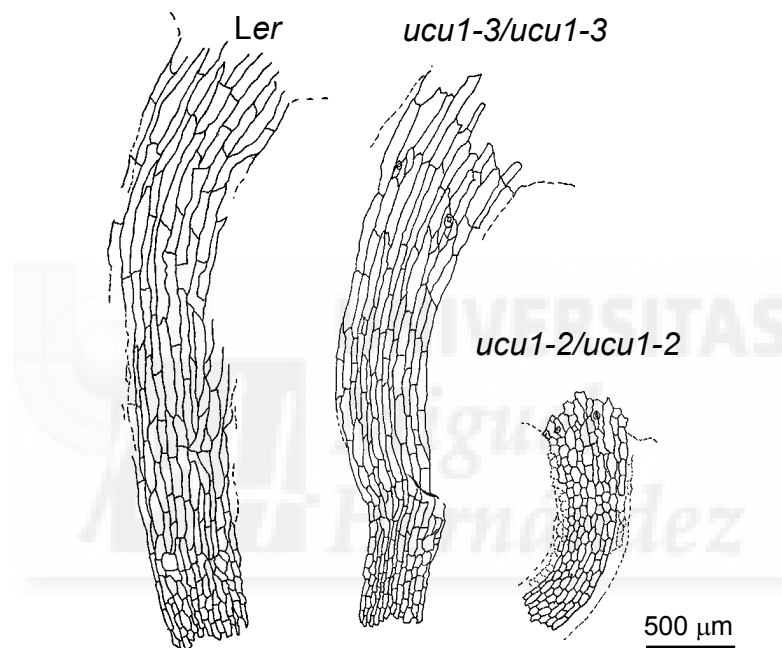


Figura 25.- Morfología de la epidermis del hipocotilo de los mutantes *ucu1*. Los trazos continuos corresponden a la pared celular de las células epidérmicas y los discontinuos a las que quedaban fuera del plano óptico. Las muestras se obtuvieron 23 días después de la siembra

IV.2.2.3.- Gravitropismo y fotomorfogénesis

Hemos estudiado la respuesta gravitrópica de la raíz de los mutantes *ucu*, tal como se indica en el apartado III.15.1.1 de Materiales y Métodos, en la página 100. Los mutantes *ucu1-1/ucu1-1*, *ucu1-2/ucu1-2* y *ucu1-3/ucu1-3* presentan una respuesta gravitrópica normal, indistinguible de la de su ancestro silvestre. La raíz del mutante *ucu2-1/ucu2-1*, que presenta rotación helicoidal (véase el apartado IV.2.2.6, en la página 119), también muestra una respuesta a la gravedad similar a la de su ancestro silvestre.

La germinación de una semilla silvestre en la oscuridad genera una plántula etiolada (*etiolated*), en la que el hipocotilo crece a causa de la elongación de sus células,

los cotiledones no se expanden y no se inicia el desarrollo foliar (Fankhauser y Chory, 1997; Figura 26A). Por el contrario, la luz desencadena una respuesta fotomorfogénica que consiste en el inicio del programa normal de desarrollo de la plántula, que empieza, tras la germinación, a producir hojas y a sintetizar los pigmentos fotosintéticos. Existen numerosos mutantes que presentan una respuesta fotomorfogénica constitutiva, es decir, que no manifiestan elongación del hipocotilo y producen hojas en la oscuridad, un fenotipo que se denomina desetioloado (*de-etiolated*; Chory, 1993; Fankhauser y Chory, 1997).

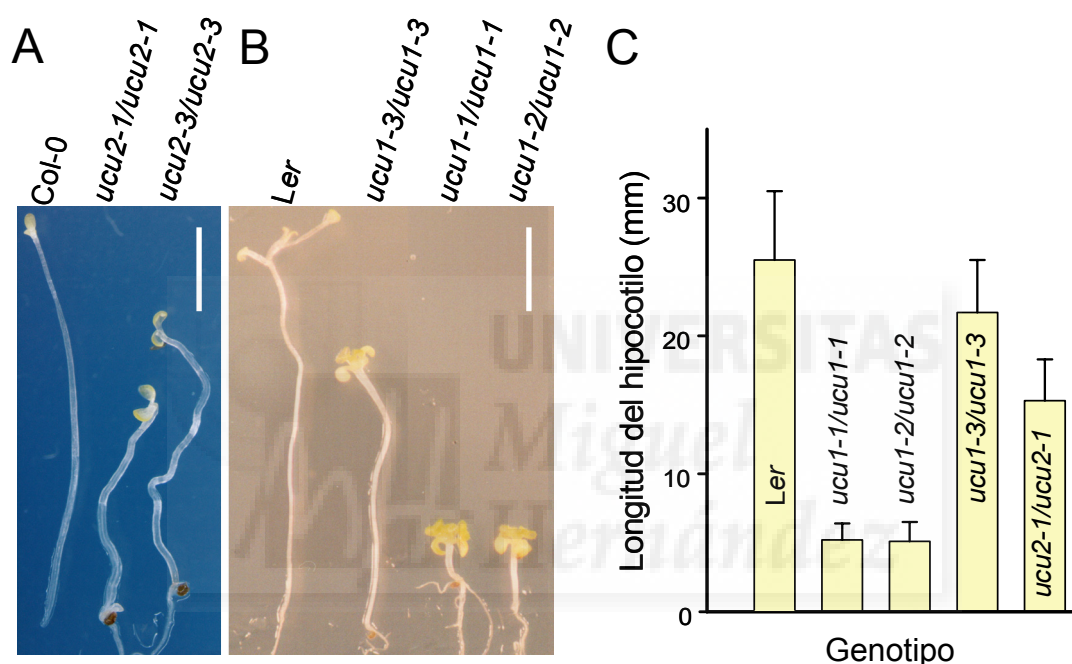


Figura 26.- Crecimiento de los mutantes *ucu* en la oscuridad. (A) Fenotipo etiolado de los mutantes *ucu2* y (B) respuesta fotomorfogénica constitutiva de los mutantes *ucu1*. Las plántulas fueron fotografiadas 21 días después de la siembra, periodo durante el que permanecieron en la oscuridad. Las barras de escala indican 1 mm. (C) Longitud del hipocotilo en plántulas que han crecido durante 11 días en la oscuridad. Cada barra representa la media de 15 medidas, con indicación de la desviación estándar.

Los mutantes *ucu1-1/ucu1-1* y *ucu1-2/ucu1-2* presentan una respuesta fotomorfogénica constitutiva muy ostensible (véase el apartado III.15.1.2 de Materiales y Métodos, en la página 100; Figura 26B-C). El mutante *ucu1-3/ucu1-3* también presenta esta respuesta, aunque su fenotipo desetioloado es más débil (Figura 26B-C).

El mutante *ucu2-1/ucu2-1* no manifiesta alteraciones en su crecimiento en la oscuridad tras la germinación, aunque la longitud de su hipocotilo es sensiblemente

menor que la de su ancestro silvestre, debido a su rotación helicoidal (véase el apartado IV.2.2.6, en la página 119).

IV.2.2.4.- Crecimiento radicular

Las raíces de los mutantes *ucu1-1/ucu1-1* y *ucu1-2/ucu1-2* son más cortas y ligeramente más gruesas que las silvestres (véase la Tabla 16, en la página 115; Figura 27A-B). Los pelos absorbentes de la raíz son más abundantes y largos y aparecen más cerca del ápice radicular en estos mutantes que en el tipo silvestre (Figura 27A-B). Las células epidérmicas de la raíz de los mutantes *ucu1* son también más cortas que las silvestres. La morfología de la raíz del mutante *ucu1-3/ucu1-3* es similar a la silvestre, aunque su longitud es ligeramente menor (véase la Tabla 16, en la página 115).

La raíz de los mutantes *ucu2/ucu2* también es más corta que la silvestre, lo que probablemente se debe a su enrollamiento en espiral (véase el apartado IV.2.2.6, en la página 119) ya que no hemos encontrado diferencias con respecto al tipo silvestre en el tamaño de sus células epidérmicas.

IV.2.2.5.- Estructura de la inflorescencia, fertilidad y desarrollo del fruto

La inflorescencia de los homocigotos *ucu1* es de menor porte (véase la Tabla 16, en la página 115) y sus entrenudos más cortos que los silvestres. Las flores de los mutantes *ucu1-1/ucu1-1* y *ucu1-2/ucu1-2* son más pequeñas que las silvestres y su pedicelo es corto, está curvado hacia el suelo y la corola apenas se abre (Figura 27C-D). Por su parte, la inflorescencia del mutante *ucu1-3/ucu1-3* es similar a la silvestre, tanto en tamaño como en morfología. Las silicuas de los mutantes *ucu1-1/ucu1-1* y *ucu1-2/ucu1-2* son más cortas y contienen menos semillas que las silvestres (véase la Tabla 16, en la página 115). Estos rasgos, unidos a que frecuentemente aparecen semillas que no han completado su desarrollo, contribuyen a que la fertilidad de los mutantes *ucu1* sea muy escasa.

La inflorescencia de los mutantes *ucu2/ucu2* es muy pequeña, con los tallos engrosados y retorcidos en espiral (Figura 27E-F). En las flores de los mutantes *ucu2/ucu2* los pistilos y los estambres están rotados helicoidalmente (véase el apartado IV.2.2.6, en la página 119) y se observa ocasionalmente que los estambres y los pétalos se transforman parcialmente en carpelos. En consecuencia, la fertilidad de los mutantes *ucu2/ucu2* también es escasa.

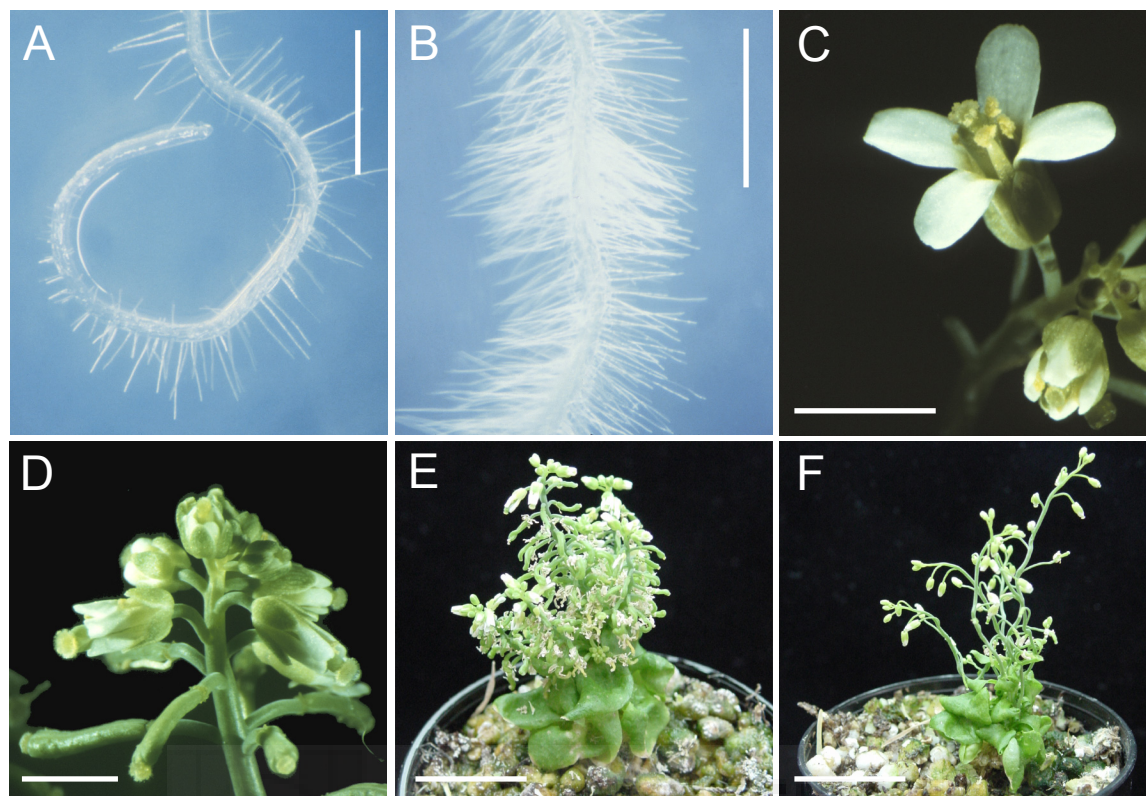


Figura 27.- Algunos rasgos morfológicos del fenotipo pleiotrópico de los mutantes *ucu*. Se presentan microfotografías de las raíces de la estirpe *Ler* (A) y *ucu1-1/ucu1-1* (B), y de la inflorescencia de *Ler* (C) y los mutantes *ucu1-1/ucu1-1* (D), *ucu2-1/ucu2-1* (E) y *ucu2-3/ucu2-3* (F). Las fotografías fueron tomadas 13 (A-B) y 45 (C-F) días después de la siembra. Las barras de escala indican 1 (A-B), 2 (C-D) y 4 (E-F) mm.

IV.2.2.6.- Rotación helicoidal de los órganos de los mutantes *ucu2*

Las plantas *ucu2/ucu2* presentan rotación helicoidal de las raíces, el hipocotilo, los tallos, los pistilos y las silicuas, que son estructuras casi cilíndricas en el tipo silvestre (Figura 28). Este rasgo fenotípico es claramente visible en la epidermis de estos órganos (Figura 28D), aunque también en algunos tejidos internos, como los haces vasculares de la raíz y el hipocotilo (Figura 28E). Este hábito de crecimiento espiral contribuye al acortamiento y el crecimiento desorganizado de dichos órganos. No hemos observado alteraciones obvias en el patrón de división de las células epidérmicas de estos órganos helicoidalmente rotados.

IV.2.3.- Ensayos fisiológicos

Se conocen muchas mutaciones que causan enanismo en *Arabidopsis thaliana*, como las que dañan a genes implicados en la síntesis o la percepción de hormonas como

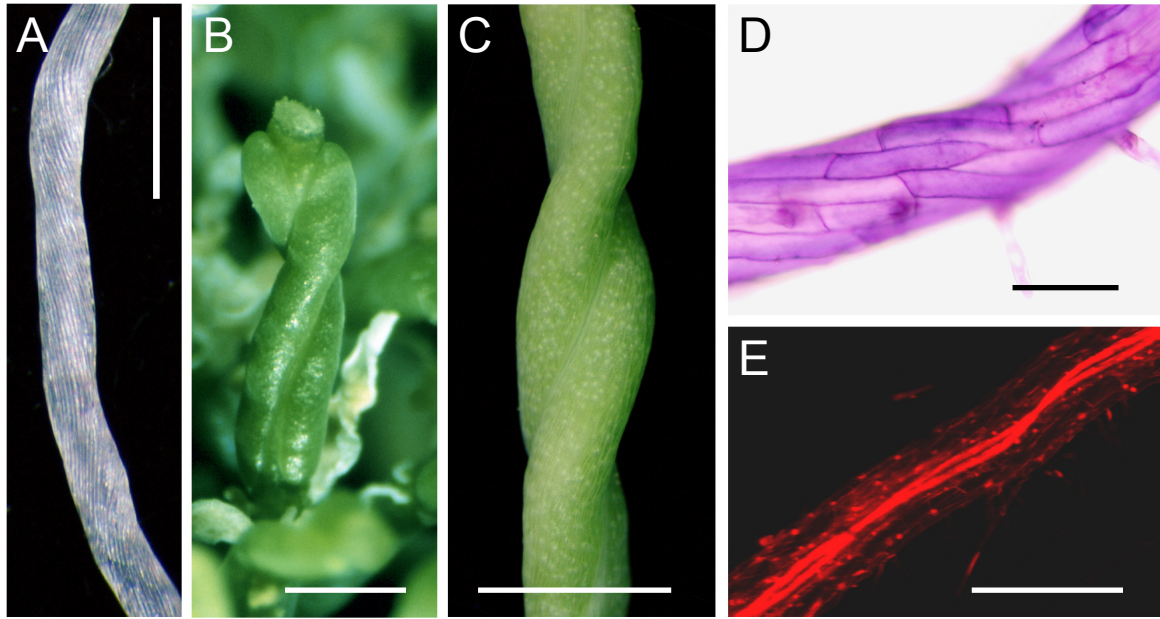


Figura 28.- Rotación helicoidal en los órganos de los mutantes *ucu2*. (A) Hipocotilo etiolado de un mutante *ucu2-3/ucu2-3*. (B) Pistilo elongado, (C) silicua madura, (D) epidermis de la raíz y (E) tejidos vasculares de la raíz de los mutantes *ucu2-1/ucu2-1*. Se empleó microscopía óptica para obtener la imagen D y confocal para la E. Las fotografías se tomaron 23 (C-D) y 45 (A-B) días después de la siembra. Las barras de escala indican 1 (A) y 2 mm (B-C), y 100 μm (D-E).

las auxinas, las giberelinas y los brasinosteroides (véase el apartado IV.5.2.2, en la página 176). Los mutantes *ucu* presentan, además de su enanismo, rasgos morfológicos comunes con otros previamente descritos por sus alteraciones en la síntesis o la percepción de fitohormonas. Esto nos ha llevado a analizar los efectos de la administración de fitohormonas sobre el crecimiento de los mutantes *ucu* (véase el apartado III.15.2 de Materiales y Métodos, en la página 100).

IV.2.3.1.- Efectos de las giberelinas, las citoquininas y el ácido abscísico

Tras su germinación en medio de cultivo no suplementado hemos trasplantado plántulas *ucu1-1/ucu1-1*, *ucu1-2/ucu1-2*, *ucu1-3/ucu1-3*, *ucu2-1/ucu2-1* y *Ler* a medios suplementados con 1, 10 o 100 μM de giberelina (GA_3), o bien 10 o 100 nM de citoquinina (6-benzilaminopurina).

La adición exógena de GA_3 induce la elongación del hipocotilo, el peciolo y el tallo, tanto en los mutantes *ucu* como en *Ler*. Por el contrario, la adición de GA_3 restaura el fenotipo silvestre en el mutante *ga5* (*giberellin requiring5*; Talon *et al.*, 1990), que hemos utilizado como control, cuyo semienanismo se debe a la insuficiencia de función de uno de los genes implicados en la biosíntesis de las giberelinas (Xu *et al.*, 1995a). Dado que

este efecto no se observa en los mutantes *ucu*, puede descartarse que su fenotipo se deba a una insuficiencia en giberelinas. De su respuesta similar a la silvestre puede descartarse también su insensibilidad a esta hormona.

La administración de 6-benzilaminopurina, una citoquinina, induce en las plantas la desdiferenciación del tejido radicular y la inhibición de su crecimiento a concentraciones elevadas (Cary *et al.*, 1995). La respuesta de los mutantes *ucu* a la adición exógena de esta hormona resultó similar a la de la estirpe silvestre.

Los mutantes *ucu1/ucu1* y *ucu2-1/ucu2-1* son incapaces de germinar en presencia de 3 y 5 μM de ácido abscísico (ABA), al igual que su ancestro *Ler*. Hemos utilizado en este experimento como control el mutante *sañ5/sañ5 (abi4-2/abi4-2)*, cuya germinación es resistente al ABA (Quesada *et al.*, 2000).

IV.2.3.2.- Efectos de las auxinas y de los inhibidores de su transporte

Hemos cultivado los mutantes *ucu* en medios suplementados con 0,1, 1 o 10 μM de ácido indol-acético (IAA), una auxina natural, y 10, 20 o 50 nM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), un análogo sintético de la auxina, sin que en ningún caso se apreciase grado alguno de restauración del fenotipo silvestre. Sin embargo, la inhibición del crecimiento de la raíz causada por la administración exógena de estas hormonas resultó mayor en los mutantes *ucu1* que en su ancestro *Ler* (Figura 29). La adición exógena de auxina produce en el tipo silvestre una inhibición notable del crecimiento de la raíz, claramente apreciable en su longitud, y un engrosamiento leve de ésta, así como un incremento en el número y la longitud de sus pelos radiculares. Cuando la concentración de auxina añadida es superior a 50 nM de 2,4-D, se produce una desdiferenciación del tejido radicular, que crece de forma desorganizada. En los mutantes *ucu1* hemos observado que la inhibición del crecimiento radicular y el crecimiento indiferenciado se manifiestan ante concentraciones muy bajas de 2,4-D (10 nM), que apenas afectan a las raíces de la estirpe silvestre (Figura 29B). Este comportamiento es mucho más patente en las plantas *ucu1-1/ucu1-1* y *ucu1-2/ucu1-2* que en las *ucu1-3/ucu1-3* (Figura 29B).

En cuanto a los mutantes *ucu2/ucu2*, la inhibición del crecimiento de la raíz en medios suplementados con 20 o 50 nM de 2,4-D fue similar a la sufrida por la estirpe silvestre. Sin embargo, la inhibición del crecimiento de la raíz de estos mutantes en medio suplementado con 10 nM de 2,4-D fue menor que la de la estirpe silvestre.

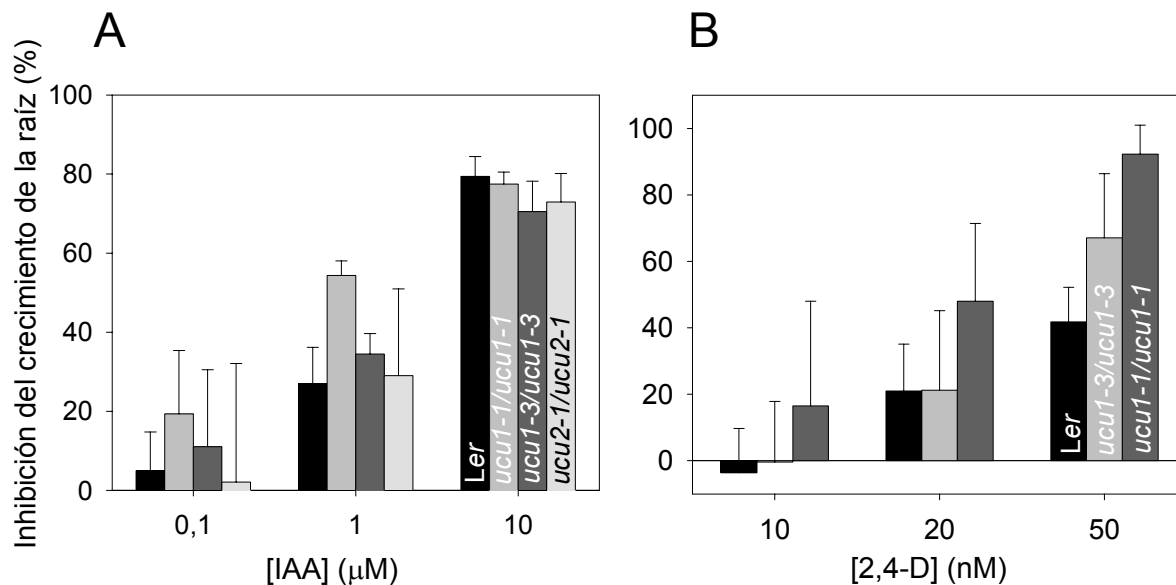


Figura 29.- Efectos de las auxinas sobre el crecimiento de la raíz en los mutantes *ucu*. Se representa, en porcentaje, la reducción en la longitud de la raíz sufrida por las plantas cultivadas en un medio suplementado con auxinas, con respecto a las que crecieron en un medio sin suplementar. Cada barra representa la media de 15 medidas, con indicación de la desviación estándar.

Hemos analizado también los efectos de la inhibición del transporte de entrada o influjo de las auxinas en las células (*auxin influx*), con 1-NOA (ácido 1-naftoxiacético; Parry *et al.*, 2001), o de su transporte de salida o eflujo (*auxin efflux*), con NPA (ácido 1-N-naftiltalámico) y TIBA (ácido 2,3,5-triodobenzoico; Fujita y Syono, 1996). La inhibición del crecimiento de la raíz en presencia de TIBA y NPA es mayor en los mutantes *ucu2/ucu2* que en *Ler* (Figura 30). Se produce además el engrosamiento de su raíz y el aumento del número y la longitud de los pelos absorbentes, cuya diferenciación se inicia en una zona más próxima al meristemo radicular (Figura 30C-D) que en *Ler*. Este rasgo de los mutantes puede fenocopiarse exponiendo las plantas silvestres a concentraciones altas de auxinas. Las partes aéreas de las plántulas *ucu2/ucu2* también presentaron hipersensibilidad a los inhibidores del eflujo de las auxinas (Figura 30E).

Al tratar las plantas silvestres y las mutantes *ucu2/ucu2* con 1-NOA, un inhibidor del influjo de la auxina que no perturba la elongación celular de la raíz (Parry *et al.*, 2001), ésta pierde su gravitropismo y crece de manera desorganizada. Este comportamiento es similar al de los mutantes *aux1/aux1*, que carecen de la permeasa AUX1, necesaria para el influjo de la auxina, cuyas raíces son agravitrópicas (Bennet *et al.*, 1996; Marchant *et al.*, 1999).

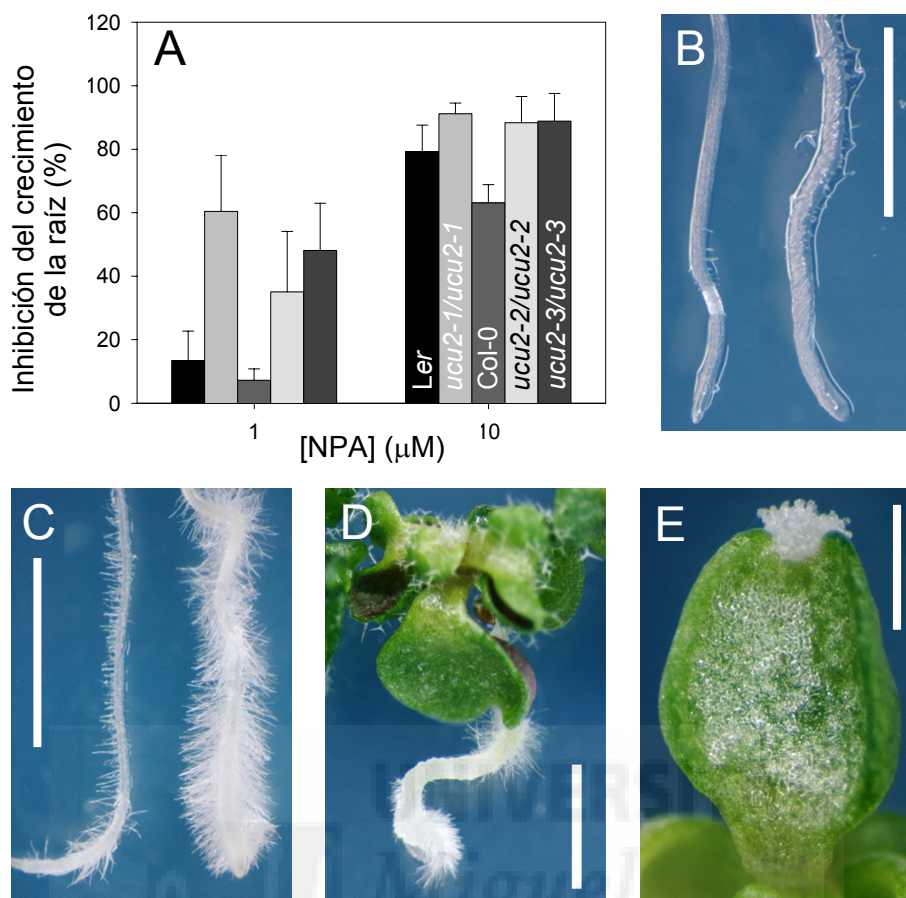


Figura 30.- Efectos de los inhibidores del transporte de las auxinas sobre el crecimiento de los mutantes *ucu*. (A) Inhibición del crecimiento radicular en respuesta a NPA. Se siguen las pautas definidas para la Figura 29. Raíces de la estirpe silvestre Col-0 (izquierda) y *ucu2-3/ucu2-3* (derecha) en medio (B) sin suplementar y (C) suplementado con NPA 10 μM. (D) Plántula *ucu2-3/ucu2-3* obtenida en medio suplementado con NPA 10 μM. (E) Cotiledón de un individuo *ucu2-3/ucu2-3* cultivado en medio suplementado con TIBA 10 μM, que muestra proliferación de tejido indiferenciado en su región apical. Las fotografías se tomaron 13 días después de la siembra. Las barras de escala indican 2 mm (B-E).

IV.2.3.3.- Respuesta a los brasinosteroides

Para estudiar la respuesta de los mutantes *ucu* a los brasinosteroides, se sembraron 30 semillas de *Ler*, *ucu1-1/ucu1-1*, *ucu1-2/ucu1-2*, *ucu1-3/ucu1-3* y *ucu2-1/ucu2-1* en medios suplementados con 25, 50, 100, 300 o 500 nM de 24-epibrasinólido. En los mutantes *dim-1/dim-1* y *det2-1/det2-1*, que son deficientes en la síntesis de los brasinosteroides (véase el apartado IV.5.2.2, en la página 176), se restaura el fenotipo silvestre tras la administración de 24-epibrasinólido. El fenotipo de los mutantes *ucu*, por el contrario, no se normaliza, por lo que cabe excluir que se deba a una alteración en la síntesis de los brasinosteroides.

Los mutantes enanos *bri1/bri1* se parecen mucho a los que son deficientes en la síntesis de los brasinosteroides. Sin embargo, y a diferencia de estos últimos, son insensibles a la administración de brasinosteroides (Clouse *et al.*, 1996). La adición al medio de cultivo de 24-epibrasinólido inhibe el crecimiento radicular del tipo silvestre, de forma relativamente proporcional a la concentración empleada (Figura 31A y C; Clouse *et al.*, 1996). Las raíces de los mutantes *ucu1-1/ucu1-1* y *ucu1-2/ucu1-2* no se ven afectadas por concentraciones elevadas de 24-epibrasinólido (100 a 300 nM), que inhiben casi por completo el crecimiento de las de *Ler* (Figura 31A, E). La elongación de la raíz de *ucu1-3/ucu1-3* se inhibe parcialmente en presencia de concentraciones altas de esta hormona (100 nM), aunque no tanto como la de *Ler* (Figura 31A, D). Estos resultados indican que las mutaciones semidominantes *ucu1* causan una insensibilidad total o muy extrema al brasinólido. Debe hacerse notar, no obstante, que una concentración 500 nM de 24-epibrasinólido produce una ligera reducción de la elongación de la raíz en estos mutantes, posiblemente por su toxicidad. La sensibilidad a los brasinosteroides de las plantas *ucu1-3/ucu1-3* es intermedia entre la del tipo silvestre y la de las plantas *ucu1-1/ucu1-1* y *ucu1-2/ucu1-2*.

El crecimiento de la raíz de las plantas *ucu2/ucu2* se ve afectado por el 24-epibrasinólido, pero su respuesta difiere de la silvestre. Las concentraciones superiores a 200 nM producen una inhibición de la elongación de la raíz similar en este mutante y su ancestro silvestre (Figura 31A). Sin embargo, ante una concentración inferior (50 nM), se reduce el crecimiento de la raíz mucho menos en los mutantes *ucu2* que en la estirpe silvestre (Figura 31A-B). Estos resultados indican que los mutantes *ucu2* son parcialmente insensibles a los brasinosteroides, aunque en menor medida que los *ucu1*.

IV.3.- Clonación posicional del gen *UCU1*

Hemos empleado un abordaje posicional para la clonación del gen *UCU1*, que se inició con su cartografía de baja resolución, que nos permitió asignarlo al cromosoma 4. Para ello, se llevó a cabo un análisis del ligamiento a microsatélites polimórficos, en una población cartográfica F₂ obtenida a partir de un cruzamiento *ucu1-2/ucu1-2* × Col-0. Se empleó la estirpe Col-0 dado que muestra un elevado grado de polimorfismo molecular con respecto a *Ler* (Jander *et al.*, 2002), el ancestro silvestre de los mutantes *ucu1*.

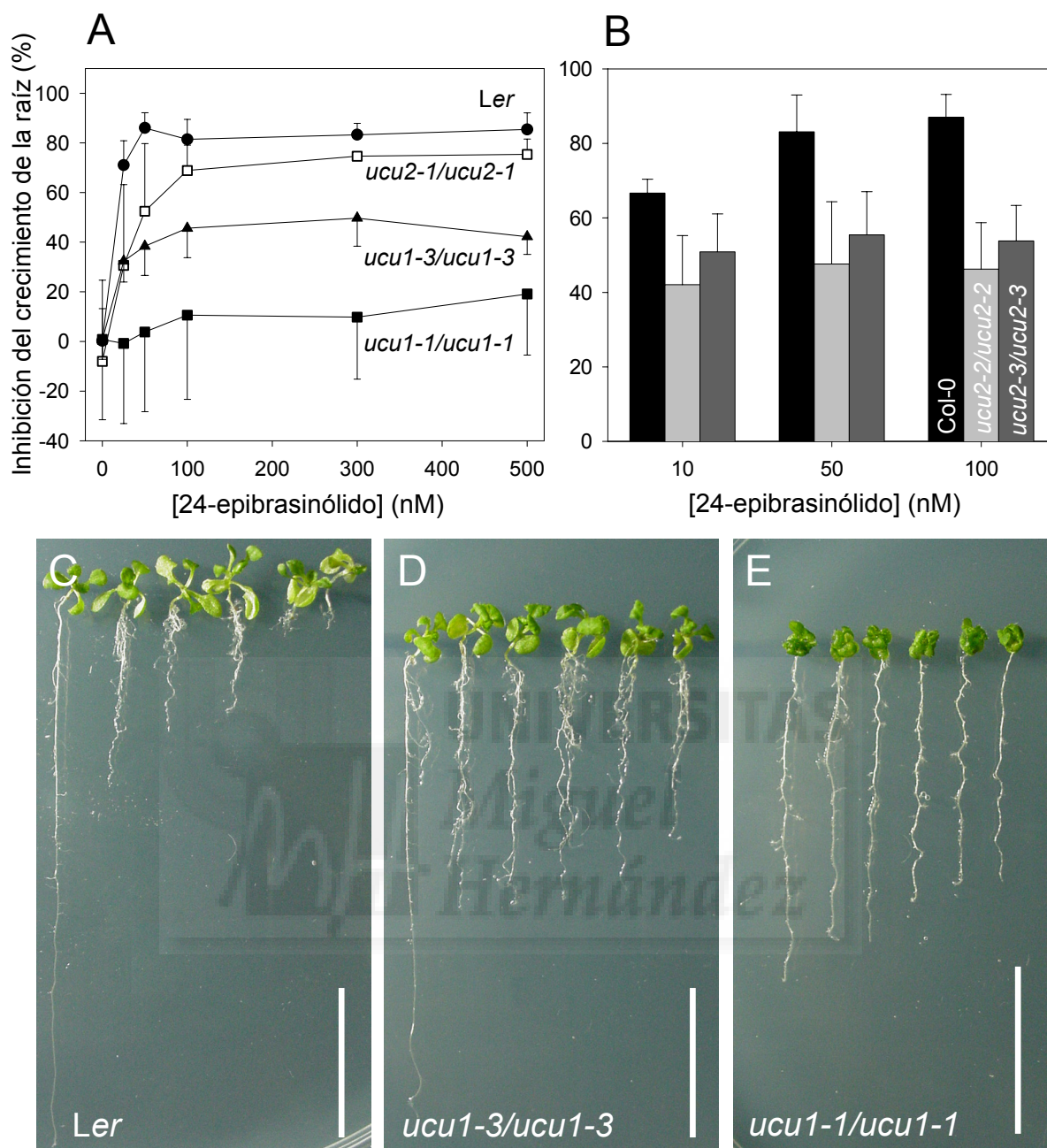


Figura 31.- Efectos del 24-epibrasinólido sobre el crecimiento de los mutantes *ucu*. (A-B) Inhibición del crecimiento radicular por 24-epibrasinólido. Cada punto representa la reducción en la longitud de la raíz, en porcentaje, observada en las plantas cultivadas en medio suplementado con la hormona ($n > 25$), con respecto a las de control. (C-E) Las imágenes corresponden, de izquierda a derecha, a plántulas que han crecido durante 13 días en medio suplementado con 0, 25, 50, 100, 300 y 500 nM. Las barras de escala indican 2 mm.

IV.3.1.- Cartografía de baja resolución

La cartografía génica en *Arabidopsis thaliana* suele iniciarse con el ensayo del eventual ligamiento entre el gen a estudio y varios marcadores de cada uno de sus cinco cromosomas. Hemos utilizado el método de cartografía desarrollado en el laboratorio de

J.L. Micol (Ponce *et al.*, 1999), que permite la comprobación simultánea del eventual ligamiento a 21 microsatélites espaciados de forma relativamente uniforme a lo largo del genoma de *Arabidopsis thaliana*. Los productos de la correspondiente amplificación mediante PCR múltiple son discriminados mediante un programa de análisis de fragmentos, tras su visualización en un secuenciador automático, tal como se describe en el apartado III.13.1 de Materiales y Métodos, en la página 95.

Tabla 17.- Cartografía de baja resolución del gen *UCU1*

| Marcador | Cromosoma | Posición de mapa (cM) ^a | Cromosomas estudiados | Frecuencia de recombinación ^b |
|------------|-----------|------------------------------------|-----------------------|--|
| AthACS | 1 | 1,20 | 34 | 61,76±8,33 |
| AthZFPG | 1 | 35,25 | 38 | 50,00±8,11 |
| T27k12-Sp6 | 1 | 59,10 | 32 | 37,50±8,56 |
| AthGENEA | 1 | 86,79 | 38 | 47,37±8,10 |
| nga111 | 1 | 113,44 | 28 | 32,14±8,83 |
| nga1145 | 2 | 9,60 | 38 | 47,37±8,10 |
| nga1126 | 2 | 50,65 | ND | ND |
| nga168 | 2 | 73,77 | 36 | 38,89±8,12 |
| AthCHIB | 3 | 19,10 | ND | ND |
| nga162 | 3 | 20,56 | 14 | 71,43±12,07 |
| AthGAPab | 3 | 43,77 | 36 | 50,00±8,33 |
| nga6 | 3 | 86,41 | ND | ND |
| nga12 | 4 | 22,92 | 38 | 23,68±6,90 |
| nga1111 | 4 | 29,64 | 38 | 21,05±6,61 |
| nga1139 | 4 | 83,41 | 20 | 20,00±8,94 |
| nga1107 | 4 | 104,73 | 34 | 17,65±6,54 |
| AthCTR1 | 5 | 9,32 | 38 | 42,11±8,01 |
| AthPHYC | 5 | 71,13 | 20 | 30,00±10,25 |
| MBK5 | 5 | 121,00 | 36 | 58,33±8,22 |

^aLas posiciones de mapa de los marcadores se han tomado del mapa genético de las líneas recombinantes consanguíneas de Lister y Dean (1993; http://nasc.nott.ac.uk/new_ri_map.html). ^bSe indican las frecuencias de recombinación, expresadas en porcentaje, y sus desviaciones estándar, sin aplicación de función de mapa alguna. Se destacan en negrita los valores de ligamiento que se consideraron más significativos, los inferiores al 20%. ND: no se obtuvieron productos de amplificación correspondientes a los alelos de este marcador.

Dado que la mutación *ucu1-2* es semidominante, se escogieron 19 individuos F₂ fenotípicamente silvestres de la población cartográfica F₂ anteriormente mencionada, homocigotos por tanto para el alelo silvestre del gen *UCU1*, cuyo genotipo se determinó en lo relativo a 19 microsatélites. Los resultados obtenidos, que se recogen en la

Tabla 17, indican que existe ligamiento entre el gen *UCU1* y todos los microsatélites del cromosoma 4 que hemos estudiado.

Tabla 18.- Análisis del ligamiento del gen *UCU1* a microsatélites del cromosoma 4

| Marcador | Posición de mapa (cM) | Cromosomas analizados | | Distancia (cM) |
|----------|-----------------------|-----------------------|-------|----------------|
| | | Recombinantes | Total | |
| nga12 | 22,92 | 72 | 262 | 30,89±3,95 |
| nga1111 | 29,64 | 57 | 218 | 29,02±4,10 |
| AM4 | 52,00 | 32 | 188 | 17,63±3,10 |
| nga1139 | 83,41 | 48 | 284 | 17,58±2,30 |
| nga1107 | 104,73 | 53 | 242 | 23,49±3,29 |

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 17. Las distancias de mapa han sido calculadas mediante la aplicación de la función de Kosambi (1944).

A continuación se intentó refinar la posición de mapa obtenida, empleando para ello 145 plantas F_2 de fenotipo silvestre de la población cartográfica antes mencionada (véase el apartado IV.3, en la página 124), que fueron genotipadas para los 5 microsatélites del cromosoma 4 que se detallan en la Tabla 18. Los resultados obtenidos indican que el gen *UCU1* se ubica entre los marcadores AM4 y nga1139 (en las posiciones 52,00 y 83,41 cM, respectivamente, del cromosoma 4).

Con el fin de delimitar con mayor precisión la región candidata a contener el gen *UCU1*, se emplearon otros 4 marcadores, 3 de los cuales son CAPS (véase el apartado I.3.4.3.2.2 de la Introducción, en la página 14). La Tabla 19 detalla los marcadores de este tipo que habían sido descritos para la región del cromosoma 4 flanqueada por los microsatélites AM4 y nga1139.

Tabla 19.- Otros marcadores utilizados en la cartografía del gen *UCU1*

| Marcador | Posición de mapa (cM) | Tamaño de los fragmentos de restricción (pb) | | Enzima de restricción |
|----------|-----------------------|--|-------------------|-----------------------|
| | | En <i>Ler</i> | En Col-0 | |
| SC5 | 56,00 | 300; 250 | 550 | <i>AccI</i> |
| AG | 63,16 | 1.073; 293 | 1.336 | <i>XbaI</i> |
| g3883 | 64,15 | 700 | 1.400 | -* |
| PG11 | 75,16 | 644; 353; 296 | 644; 296; 263; 90 | <i>BfaI</i> |

La secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de estos marcadores CAPS se tomó de <http://www.arabidopsis.org/aboutcaps.html>. *No es un CAPS (véase la explicación en el texto).

Se utilizaron en primer lugar los marcadores SC5 y g3883. El primero de ellos es un CAPS y el segundo corresponde a una región cuya longitud es distinta en la estirpe de referencia *Ws-2* y en *Col-0* (B. Dietrich, sin publicar). Previamente a su utilización, se determinaron las diferencias de tamaño entre los alelos de *Ler* y *Col-0* (Tabla 19). Se encontraron 23 cromosomas recombinantes para SC5 de un total de 370 estudiados, lo que indica que el gen *UCU1* dista $6,25 \pm 1,27$ cM de este marcador. El estudio de g3883 nos permitió identificar 20 cromosomas recombinantes entre los 446 analizados, lo que indicó que se encuentra a $4,50 \pm 0,99$ cM de *UCU1*. La región candidata a contener al gen *UCU1* quedó así limitada a unos 8,2 cM.

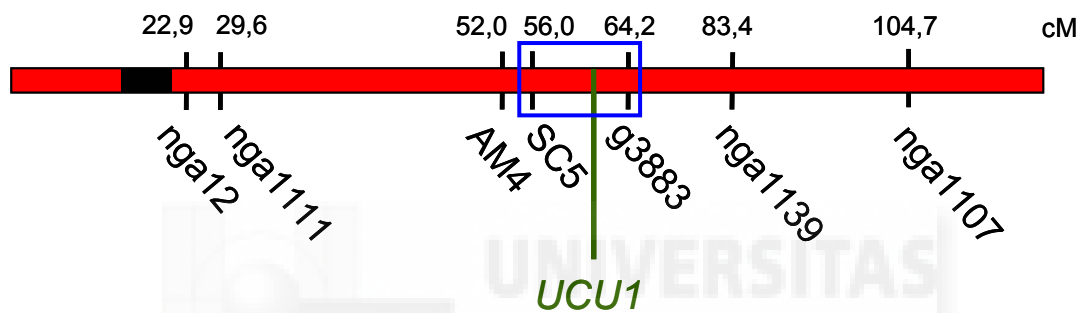


Figura 32.- Cartografía de baja resolución del gen *UCU1*. Se representa un mapa genético del cromosoma 4 de *Arabidopsis thaliana*, con indicación de las posiciones de los marcadores utilizados para la cartografía de baja resolución del gen *UCU1*. La región recuadrada en azul fue analizada según se detalla más adelante, en la Figura 33. La posición del centrómero se destaca en negro.

Se determinó a continuación el genotipo, en lo relativo al marcador AG, de las plantas heterocigóticas para SC5 o g3883. Ninguna de las 23 plantas heterocigóticas para SC5 lo fue para AG. Sin embargo, 3 de los 20 heterocigotos para g3883 lo fueron también para AG. Se concluyó, en consecuencia, que el gen *UCU1* está ubicado entre SC5 y AG.

En la región mencionada en el párrafo anterior se encuentra el gen *GA5*, implicado en la síntesis de las giberelinas, cuyas mutaciones causan semienanismo (Xu *et al.*, 1995a). Toda la progenie F_1 del cruzamiento *ga5-1/ga5-1* \times *ucu1-3/ucu1-3* fue silvestre, lo que indicó que los genes *GA5* y *UCU1* son distintos. Este resultado fue ratificado por el obtenido en un ensayo de complementación adicional, el cruzamiento *ga5-1/ga5-1* \times *ucu1-2/ucu1-2*, cuya progenie F_1 mostró el fenotipo característico de las plantas *ucu1-2/UCU1*, apareciendo, además, individuos de fenotipo silvestre en la descendencia F_2 resultante de su autofecundación.

IV.3.2.- Cartografía de alta resolución

Con el objetivo de reducir al máximo la longitud de la región candidata a contener el gen *UCU1*, se obtuvieron y ensayaron nuevos marcadores polimórficos, merced a la disponibilidad de la secuencia del genoma de la estirpe Col-0 de *Arabidopsis thaliana* (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000; <http://mips.gsf.de/proj/thal/db/index.html>), tal como se describe a continuación.

IV.3.2.1.- Obtención y ensayo de nuevos marcadores

Hemos identificado varios microsatélites polimórficos que no habían sido descritos previamente en la región del genoma de *Arabidopsis thaliana* que corresponde a los 17 clones BAC flanqueados por los marcadores SC5 y g3883 (véase la Figura 32, en la página 128). Se utilizó la secuencia disponible de esta región genómica para buscar segmentos ricos en repeticiones de dinucleótidos y trinucleótidos de los tipos (AT)_n, (CT)_n, (CTT)_n y (GAG)_n, entre otros. Se descartaron los microsatélites muy imperfectos y los de menos de 10 repeticiones. En la Tabla 20 se recogen las parejas de oligonucleótidos que se diseñaron a partir de las secuencias que flanquean a algunos de los microsatélites encontrados, que fueron elegidos de modo que quedasen regularmente espaciados a lo largo de la región candidata. Algunos de los microsatélites amplificados con estos cebadores resultaron ser polimórficos entre *Ler* y Col-0, por lo que fueron considerados de utilidad para la cartografía fina de *UCU1*. Se utilizaron con este fin los microsatélites AtFCA9.1, AtT6K21.1 y AtF28J12.3 (Tabla 20). El marcaje de uno de los miembros de cada pareja de oligonucleótidos con un fluorocromo distinto permitió la amplificación conjunta de estos tres marcadores en una misma reacción y la estimación simultánea de los tamaños de sus alelos. Los resultados de la cartografía de alta resolución del gen *UCU1* con estos marcadores se recogen en la Tabla 21.

Los genotipos de los individuos F₂ que resultaron ser recombinantes para alguno de los marcadores analizados se indican en la Tabla 22. En la mayoría de los casos, estas plantas eran portadoras de un único hecho de recombinación en la región candidata, entre el marcador a estudio y el gen *UCU1*. Se encontraron dos hechos de recombinación en los individuos 114, 123, 145, 209, 291 y 299, y tres en los numerados como 129 y 218. El genotipo del individuo 211, en el que se detectaron cuatro hechos de recombinación, pudiera deberse a un genotipado erróneo.

En la Figura 33 se representa el mapa genético, construido empleando el programa MAPMAKER/EXP 3.0b, de la región del cromosoma 4 comprendida entre los

Tabla 20.- Marcadores desarrollados en esta Tesis para la cartografía de alta resolución del gen *UCU1*

| Marcador | Repetición | Clon BAC | Posición de la repetición en el clon BAC (pb) | Secuencias nucleotídicas de los cebadores empleados (5' → 3') | | | Tamaño del producto de PCR (pb) | |
|-------------------|---------------------|----------|---|---|---------|--------------------------|---------------------------------|-------|
| | | | | Cebador marcado | Marcaje | Cebador sin marcar | Ler | Col-0 |
| AtFCA8.1 | (GAG) ₁₁ | Z97343 | 18.721-18.930 | TCCTTATCCGACACATCCGTT | - | CCGTTAGAGACGCCCTTAGT | 210 | 210 |
| AtFCA9.1 | (AT) ₂₄ | Z97344 | 14.931-15.182 | ACTGCATCTCTAGTAATAAAAGG | 6-FAM | GCAAAATGAACCAAAACCCACTG | 246 | 252 |
| AtT6K21.1 | (CT) ₃₈ | AL021889 | 53.045-53.234 | ACGAATGCCGAGAAAAATAGACG | 6-FAM | CTAACTAGATCGTCCCTCGTC | 139 | 191 |
| AtF28J12.1 | (GAT) ₁₃ | AL021710 | 22.826-22.997 | GCTCCGCCGTTGGATTCTG | - | GTTCCGGTTTAATTCTCGGGT | 172 | 172 |
| AtF28J12.3 | (CT) ₁₂ | AL021710 | 68.473-68.736 | AAATCTCAGATCCGTCATTTCCA | HEX | CCTTATCAATGGATGAGGAATC | 257 | 265 |
| AtF28A21.2 | (TA) ₄₆ | AL035526 | 10.634-10.984 | CTGGAATACATGTTGAAATGCAC | 6-FAM | CAATTGCCGGTTCGAATCCCTAAG | 354 | 352 |
| AtF28A21.1 | (CT) ₃₃ | AL035526 | 55.146-55.363 | GAAGAGCTGGATTCACATGG | 6-FAM | AACACAAGCAGCTTTACCTTAT | 224 | 219 |
| AtF28A21.3 | Inserción | AL035526 | 70.578-70.782 | GACAATGGACTGCTGAAAGAAG | TET | CCATTTACGCAATCCATACTTC | 216 | 207 |
| AtF13C5.1 | (CT) ₂₀ | AL021711 | 49.613-49.908 | GTAAGGAAGGACTATGAGGTC | TET | CATCTAAATTGTCCTACATGTAC | 296 | 296 |
| AtF7K2.1 | (TA) ₁₇ | AL033545 | 20.092-20.455 | TGTACCAACTGGCATTGATG | 6-FAM | GTTTCATGTCTCACCCTTTGCG | 312 | 364 |
| AtF16G20.1 | (AT) ₂₆ | AL031326 | 85.325-85.569 | TCAGTGTTACTATGTACCAAAGTA | - | TAGGACGTAATATCCCTTAGTTAC | 220 | 245 |
| AtM7J2.1 | (AT) ₁₆ | AL022197 | 55.635-56.067 | AGCAACTTGTGTTCTCATT | TET | TTATAGGGTACGACAACCCAT | 428 | 433 |

Se representan en **negrita** los microsatélites que resultaron polimórficos entre *Ler* y *Col-0* y en cursiva las repeticiones imperfectas. El tamaño de los alelos de *Ler* se ha estimado a partir de sus diferencias con respecto a los de *Col-0*, calculadas con el programa GeneScan 2.1 (Applied Biosystems).

Tabla 21.- Resultados de la cartografía de alta resolución del gen *UCU1*

| Marcador | Posición de mapa (cM) | Cromosomas analizados | | Distancia (cM) |
|------------|-----------------------|-----------------------|------------------|----------------|
| | | Recombinantes | Total | |
| AtFCA9.1 | 58,2 | 17 | 452 | 3,77±0,90 |
| AtT6K21.1 | 60,9 | 11 | 328 | 3,36±1,00 |
| AtF28J12.3 | 62,1 | 6 | 668 | 0,90±0,37 |
| AG | 63,2 | 3 | 446 ^a | 0,67±0,39 |

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 18, en la página 127. ^aSe estudiaron sólo los individuos F₂ que resultaron recombinantes para g3883, por lo que los cálculos se refieren al total de cromosomas analizados para este marcador (n = 446).

Tabla 22.- Genotipado de recombinantes informativos con respecto a algunos marcadores del cromosoma 4

| Marcador | Genotipo de los individuos analizados | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|---------------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 13 | 15 | 31 | 35 | 39 | 77 | 78 | 79 | 90 | 94 | 103 | 108 | 114 | 123 | 128 | 129 | 133 | 139 | 145 | 152 | 163 | 173 | 174 |
| SC5 (52,0) | H | H | H | C | H | H | H | C | C | C | H | H | C | H | C | H | - | C | H | - | H | H | H |
| AtFCA9.1 (58,2) | C | C | C | C | C | H | C | C | C | C | H | C | H | H | C | C | C | C | C | C | H | C | C |
| AtT6K21.1 (60,9) | C | C | C | C | C | H | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | H | C | C |
| AtF28J12.3 (62,1) | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | - | C | C | C | C | C | H | C | C |
| <i>UCU1</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| AG (63,2) | C | - | C | C | C | C | - | C | H | H | C | C | C | C | C | H | C | C | C | - | C | | |
| g3883 (64,2) | C | C | C | H | C | C | C | H | H | H | C | C | C | H | H | L | H | H | H | H | C | C | C |
| Hechos de recombinación | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 | 3 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 |

| Marcador | Genotipo de los individuos analizados | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|---------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 180 | 185 | 197 | 201 | 209 | 211 | 218 | 221 | 245 | 247 | 251 | 291 | 299 | 312 | 334 | 343 | 350 | 459 | 483 | 485 | 489 | 670 | 680 |
| SC5 (52,0) | H | C | H | H | L | H | H | H | H | C | C | C | | | | | | | | | | | |
| AtFCA9.1 (58,2) | C | C | C | C | L | C | C | H | C | H | C | C | C | H | H | H | H | H | H | H | | | - |
| AtT6K21.1 (60,9) | C | C | C | C | H | H | - | H | C | H | C | C | C | - | - | H | C | H | H | H | H | - | - |
| AtF28J12.3 (62,1) | C | C | C | C | C | C | H | C | C | H | C | C | C | - | - | C | C | C | C | C | H | H | H |
| <i>UCU1</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| AG (63,2) | C | - | C | C | - | - | C | C | C | C | C | C | | | | | | | | | | | |
| g3883 (64,2) | C | H | C | C | C | H | H | C | C | C | H | L | L | | | | | | | | | | |
| Hechos de recombinación | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 4 | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

Cada columna recoge el genotipo de uno de los individuos F₂ informativos, que habían sido previamente numerados según se indica. L y C indican, respectivamente, homocigosis para el alelo de *Ler* o el de Col-0. La letra H indica heterocigosis. El signo - se emplea para las amplificaciones fallidas. Los marcadores aparecen en la tabla en el orden en que se encuentran en el cromosoma, y el gen *UCU1* en la posición que se deduce del análisis de sus distancias a aquéllos. Los números entre paréntesis junto al nombre de un marcador indican su posición aproximada en el cromosoma, en cM. Se destacan en cursiva los genotipos que el programa MAPMAKER/EXP 3.0b (véase el apartado III.13.4 de Materiales y Métodos, en la página 97) consideró improbables.

Tabla 23.- Presuntos genes identificados en la región candidata a contener a *UCU1*

| Posición en F28A21 (pb) | Gen | Función atribuida al producto génico | Presuntos homólogos de la proteína deducida | Presuntos EST* |
|-------------------------|------------------|--|---|----------------|
| 13.711-13.217 | <i>At4g18620</i> | Presunta proteína | | |
| 17.454-16.036 | <i>At4g18630</i> | Presunta proteína | | |
| 22.435-19.342 | <i>At4g18640</i> | Presunta proteína (incompleta) | Receptor con actividad quinasa rico en leucina similar a CRINKLY4 de <i>Zea mays</i> (U67422) | 2 |
| 22.901-24.271 | <i>At4g18650</i> | Presunta proteína | Factor de transcripción OBF3.1 de <i>Zea mays</i> (S33223) | |
| 32.900-31.821 | <i>At4g18660</i> | Presunta proteína | Proteína tumoral de <i>Nicotiana glauca</i> x <i>Nicotiana langsdorffii</i> (D26453) | |
| 34.775-37.349 | <i>At4g18670</i> | Proteína similar a las extensinas | Proteína similar a extensinas de <i>Zea mays</i> (S49915) | |
| 40.598-39.891 | <i>At4g18680</i> | Presunta proteína | Proteína tumoral de <i>Nicotiana glauca</i> x <i>Nicotiana langsdorffii</i> (D26453) | |
| 43.525-41.646 | <i>At4g18690</i> | Presunta proteína | Proteína tumoral de <i>Nicotiana glauca</i> x <i>Nicotiana langsdorffii</i> (D26453) | |
| 47.968-49.437 | <i>At4g18700</i> | Presunta proteína quinasa (AtCIPK12) | Proteína quinasa wpk4 de <i>Triticum aestivum</i> (AB011670) | 3 |
| 57.771-55.332 | <i>At4g18710</i> | Proteína quinasa SHAGGY-like etha (EC 2.7.1.-) | | 1 |
| 60.086-58.803 | <i>At4g18720</i> | Presunta proteína | Producto del gen KIAA0244 de <i>Homo sapiens</i> (D87685) | |
| 60.859-60.931 | | ARNt para Glu | | |
| 62.064-61.096 | <i>At4g18730</i> | Proteína ribosómica L11 | | 4 |
| 62.401-63.337 | <i>At4g18740</i> | Proteína hipotética | | |
| 66.323-63.708 | <i>At4g18750</i> | Presunta proteína | | |
| 67.021-68.316 | <i>At4g18760</i> | Proteína de unión a glicosilfosfatidilinositol (GPI) | Proteína Hcr2-0B de <i>Lycopersicon esculentum</i> (AF053995) | |
| 71.415-69.926 | <i>At4g18770</i> | Factor de transcripción de la familia MYB | | 1 |

Se relacionan los presuntos genes de la región candidata a contener a *UCU1*, en el clon BAC F28A21, delimitada por los marcadores AtF28A21.2 y AtF28A21.3. *Se indica el número de EST que contienen la secuencia de cada gen. La existencia de al menos un EST se considera evidencia de la transcripción de un presunto gen.

marcadores SC5 y g3883. Para identificar más individuos F₂ informativos que permitiesen completar la cartografía de *UCU1*, se prepararon mezclas de ADN, cada una de ellas a partir de cinco individuos de fenotipo silvestre de la población cartográfica F₂, que se utilizaron para su genotipado con respecto a AtF28J12.3 y AtF28A21.3, simultáneamente.

Se analizaron así otras 243 plantas, lo que permitió identificar 4 heterocigotos adicionales, que fueron denominados P39, P170, P202 y P204.

De un total de 1.470 cromosomas genotipados para AtF28FJ12.3, sólo 9

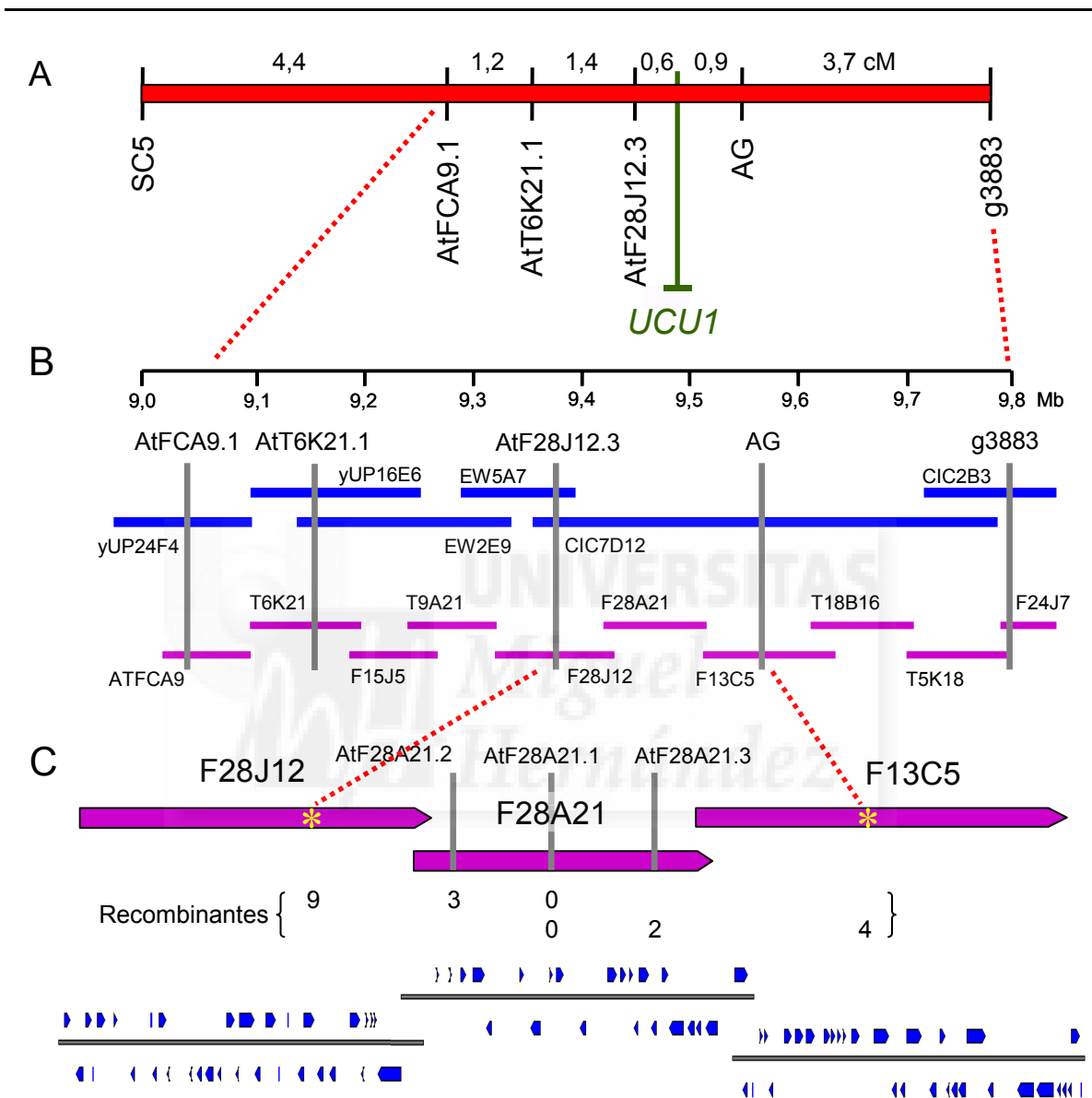


Figura 33.- Cartografía de alta resolución del gen *UCU1*. Se representan, de arriba abajo, las etapas del proceso. (A) Mapa genético de la región del cromosoma 4 en la que radica el gen *UCU1*. Se indican las distancias entre los marcadores y también la posición aproximada de *UCU1*. (B) Mapa físico de la región candidata a contener a *UCU1*. (C) Cántigo de clones BAC candidatos a contener a *UCU1*. En la parte inferior de la figura, el sentido de las flechas azules indica el de la transcripción de cada presunto gen, según la información depositada en la base de datos <http://mips.gsf.de/proj/thal/db/index.html>. Se representa también el número de recombinantes informativos encontrados.

resultaron ser recombinantes, lo que redujo a $0,61 \pm 0,20$ cM la distancia de *UCU1* a este marcador. De los 932 cromosomas estudiados para g3883, únicamente 4 resultaron recombinantes para AG, lo que indicó que este último dista $0,43 \pm 0,21$ cM de *UCU1*. Considerados en conjunto, estos resultados conducen a la conclusión de que *UCU1* está flanqueado por los marcadores AtF28J12.3 y AG (Figura 33B), en una región de 1,1 cM (180 kb) que está representada por los clones BAC parcialmente solapantes F28J12 (AL021710), F28A21 (AL035526), y F13C5 (AL021711).

Para reducir aún más el tamaño de la región candidata se analizaron tres de los nuevos marcadores que habíamos identificado en el clon F28A21 (véase la Tabla 20, en la página 130), únicamente en las plantas de la población cartográfica que eran heterocigóticas tanto para AtF28J12.3 como AG. Los resultados obtenidos indican que el gen *UCU1* se encuentra en una región de 60 kb del clon F28A21, ya que no hemos detectado ningún hecho de recombinación entre los marcadores AtF28A21.2 y AtF28A21.3 (Figura 33C). Según los resultados del proyecto de secuenciación del genoma de *Arabidopsis thaliana* (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000), las unidades de transcripción contenidas en la región candidata a contener al gen *UCU1* son las que se reflejan en la Tabla 23.

IV.3.2.2.- Estudio de la región candidata

Según la información suministrada por el proyecto de secuenciación del genoma de *Arabidopsis thaliana*, en la región de 60 kb flanqueada por AtF28A21.2 y AtF28A21.3 existen 17 presuntos genes, cuyos productos son 16 presuntas proteínas y un ARN de transferencia (Tabla 23; <http://mips.gsf.de/proj/thal/db/index.html>). Para la obtención de nuevos marcadores en esta región hemos optado por la búsqueda de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP; véase el apartado I.3.4.3.2.3 de la Introducción, en la página 15). Se eligieron 4 genes de la región candidata cuyos productos se consideraron de interés, que fueron amplificados a partir de ADN genómico de las estirpes silvestres Ler y Col-0, así como de plantas homocigóticas para cada uno de los tres alelos mutantes del gen *UCU1*. El producto de uno de tales genes candidatos, *At4g18640*, es un receptor con secuencias ricas en leucina y actividad quinasa, similar a la proteína CRINKLY4 de *Zea mays*. Este último forma parte de una ruta de transducción de señales implicada en la diferenciación celular en la epidermis foliar (Becraft *et al.*, 1996). Por su parte, *At4g18670* cifra una proteína de la familia de las extensinas, enzimas que han sido relacionadas con la expansión celular en las plantas (revisado en Cosgrove, 2000a; 2000b). El producto del

Tabla 24.- Polimorfismos encontrados tras la secuenciación de genes candidatos del clon F28A21

| Marcador | Posición en F28A21 | Secuencias nucleotídicas de los cebadores empleados (5' → 3') | Polimorfismos entre Col-0 y <i>Ler</i> ^a | | | |
|-----------|--------------------|---|---|--|---|--|
| A14g18640 | 21.606-22.636 | GAACGGCTTACTGTCTTCAACA ATACAAACACATATCGAAACTCGT | 21.739 (A→G) 21.745 (Del21.745-21.767) 21.843 (G→A) 21.847 (T→A) 21.849 (T→C) | 21.851 (G→C) 21.879 (A→C) 21.952 (A→T) 22.021 (G→A) 22.033 (C→A) | 22.039 (T→C) 22.096 (Del22.096-22.097) 22.123 (Del22.123) 22.144 (C→T) | 22.158 (C→A) 22.171 (A→G) 22.249 (G→A) 22.328 (G→T) |
| A14g18670 | 36.210-37.503 | TGATCTCTGCCAGGTCTCG ATGAATAGGGCTGAGCTGTGC | 36.292 (G→C) 36.326 (A→G) 36.346 (G→C) 36.357 (C→G) 36.363 (A→C) | 36.468 (T→A) 36.492 (C→A) 36.540 (A→C) 36.542 (GA→AG) 36.597 (C→T) | 36.603 (A→G) 36.636 (C→T) 36.669 (A→G) 36.941 (C→A) | 36.960 (T→C) 36.966 (G→C) 37.342 (G→A) 37.352 (C→A) |
| A14g18700 | 48.645-49.899 | GATTCGTCTCCAAAAGCTTCGA CATTGCAACCCATTTGTTAGTC | 48.715 (C→T) 48.766 (C→T) 48.768 (A→G) 48.886 (C→A) | 49.201 (T→A) 49.204 (A→C) 49.261 (C→T) | 49.455 (G→C) 49.565 (A→G) 49.704(C→G) | 49.732 (G→C) 49.788 (T→A) 49.813 (A→C) |
| A14g18740 | 62.304-63.420 | AAAAATGTTTCAGCTTTACAAGAATG TGTTGTGAGGGTGAAGAAAGAGG | 62.544 (T→C) 62.705 (A→G) 62.740 (Del62.740-62.741) | 62.964 (C→T) 63.019 (T→A) | 63.021 (T→A) 63.170 (Del63.170-63.171) | |

^aLos números indican las posiciones de los polimorfismos encontrados entre *Ler* y Col-0 tras la secuenciación de genes candidatos del clon F28A21. Se indican además los cambios nucleotídicos (Col-0 → *Ler*) encontrados. “Del” indica una delección encontrada en la secuencia de *Ler* cuando se comparó con la de Col-0. Se indica en cursiva el polimorfismo representado en la Figura 34, en la página 136.

gen *At4g18700* presenta una gran homología con la quinasa WPK4 de *Triticum aestivum*, presuntamente relacionada con la modulación del metabolismo por las citoquininas en función de la disponibilidad de nutrientes (Sano y Youssefian, 1994). Por último, también se eligió a *At4g18740*, que cifra una proteína hipotética, dado que equidista del gen *At4g18700* y el marcador AtF28A21.3.

La secuenciación de las unidades de transcripción de los cuatro genes mencionados en las tres estirpes mutantes *ucu1* no nos ha permitido identificar mutación alguna que les distinga de su ancestro silvestre *Ler*. Por el contrario, se encontraron numerosos SNP entre *Ler* y Col-0, los que se indican en la Tabla 24. Un ejemplo de ello se recoge en la Figura 34, que muestra un electroforegrama que corresponde a un segmento de la secuencia del gen *At4g18670*, obtenida a partir del ADN de un individuo de la F₁ de un cruzamiento *Ler* × Col-0. En este electroforegrama se distinguen con una N los polimorfismos encontrados, ya que en el heterocigoto la superposición de la secuencia de los alelos de ambos parentales produce dos picos yuxtapuestos, que no pueden ser discriminados por el secuenciador.

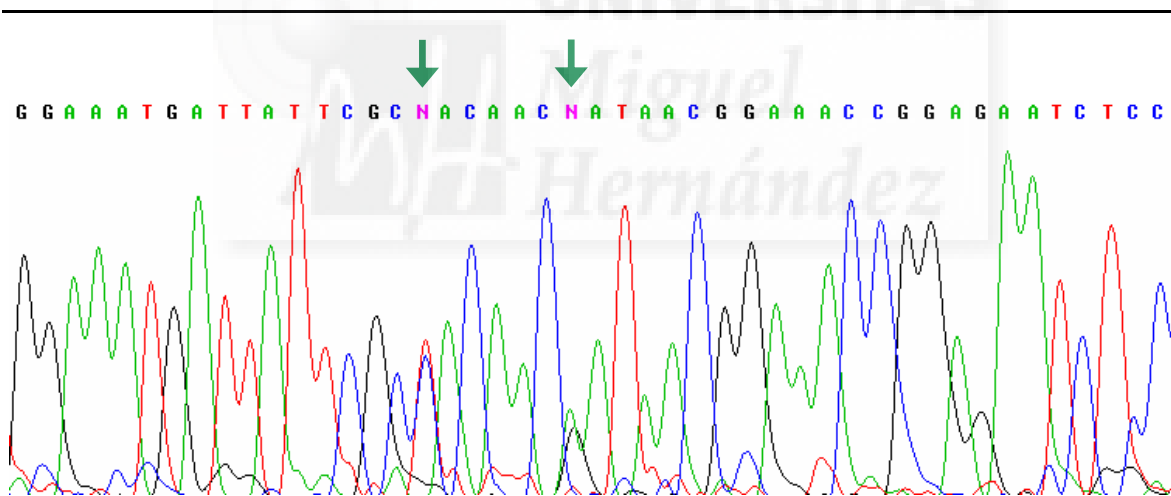


Figura 34.- Electroforegrama obtenido tras la secuenciación parcial del gen *At4g18670*. Se empleó, como molde de la reacción de secuenciación cíclica, ADN genómico de un individuo de la F₁ de un cruzamiento *Ler* × Col-0, cuyo producto fue sometido a electroforesis en un analizador genético ABI PRISM 377. En las posiciones destacadas con flechas aparecen dos picos superpuestos, cada uno de los cuales corresponde a una de las variantes polimórficas identificadas.

IV.3.2.2.1.- Análisis del ligamiento de *UCU1* a nuevos marcadores SNP

Hemos utilizado las parejas de oligonucleótidos indicadas en la Tabla 24 para amplificar los 4 genes candidatos del clon F28A21, empleando como molde ADN genómico, y a continuación secuenciar los productos de la amplificación, de los individuos

heterocigóticos para los marcadores AtF28A21.2 y AtF28A21.3 identificados en la cartografía fina del gen *UCU1*. En la Tabla 25 se indica el genotipo de estos individuos y

Tabla 25.- Genotipado de los recombinantes informativos con respecto a algunos marcadores de la región genómica de F28A21

| Marcador | Individuo | | | | | | | | | | | | | |
|------------------|-----------|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|--|
| | 90 | 94 | 129 | 163 | 218 | 247 | 489 | 670 | 680 | P39 | P170 | P202 | P204 | |
| AtF28J12.3 | C | C | C | H | H | H | H | H | H | H | H | H | C | |
| AtF28A21.2 | C | C | | C | - | H | - | C | C | H | H | - | | |
| At4g18640 | | | | | | - | | | | - | - | H | | |
| At4g18670 | | | | | | | | | | C | C | H | | |
| At4g18700 | | | | | | | | | | - | C | H | | |
| AtF28A21.1 | C | C | C | C | - | C | C | C | C | C | C | C | C | |
| At4g18740 | H | | | | | | | | | - | - | C | H | |
| AtF28A21.3 | H | C | C | C | - | C | C | C | C | C | C | C | H | |
| AG | H | H | H | | | | | | | | | | H | |

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 22, en la página 131. Se ha sombreado la parte relevante de los genotipos de aquellos individuos F_2 que permitieron delimitar la región en la que radica *UCU1*, destacándose en negrita los marcadores que la flanquean.

de todos los de la población cartográfica estudiada que habían resultado heterocigotos para los marcadores analizados previamente. El estudio del genotipo de algunos de los individuos representados en la Tabla 25 (90, P202 y P204) nos permitió establecer que dos de ellos (90 y P204) eran heterocigotos para el marcador At4g18740, pero no para At4g18700. Por su parte, el individuo P202 era heterocigoto para At4g18700, pero no para At4g18740. De ello se deduce que la región candidata a contener a *UCU1* está flanqueada por los marcadores At4g18700 y At4g18740, cuya longitud es de 15 kb.

IV.3.2.2.2.- Secuenciación de la región candidata

La región candidata mencionada en el párrafo anterior incluye cuatro presuntos genes, tres de los cuales cifran proteínas y el cuarto un ARN transferente (véase la Tabla 24, en la página 135). Se diseñaron varias parejas de oligonucleótidos para la amplificación por PCR de varios segmentos parcialmente solapantes de la región candidata, cada uno de ellos de unas 1.200 pb (Tabla 26 y Figura 35).

Se mezcló ADN de tres plantas, cada una de ellas homocigótica para uno de los tres alelos mutantes del gen *UCU1*, a fin de emplearlo como molde en amplificaciones mediante PCR en las que se usaron como cebadores los de la Tabla 26. Se secuenciaron

Tabla 26.- Oligonucleótidos utilizados para la amplificación y ulterior secuenciación de segmentos solapantes de la región de 15 kb que contiene a *UCU1*

| Segmento amplificado | Tamaño (pb) | Posición en F28A21 (pb) | Secuencias nucleotídicas de los cebadores empleados (5' → 3') ^a | |
|----------------------|-------------|-------------------------|--|--------------------------|
| | | | Cebador F | Cebador R |
| At4g18700 | 1.255 | 48.645-49.899 | GATTCGTCTCCAAAAGCTTCGA | CATTGCAACCCATTTTGTAGTC |
| SeqF28A21.1 | 1.307 | 49.825-51.131 | TATAAATTTAATGCAGGATTTTGTG | ACATCATTATCGTTCTAAATTGAC |
| SeqF28A21.2 | 1.306 | 50.993-52.298 | CTATTGCAACGGTTGGTGAAG | GCTGTTTTGGAACGTACAGTC |
| SeqF28A21.3 | 1.313 | 52.202-53.514 | TTTGGTTATGGTGGGCTAAAAG | AATTATTCATAACAGTCATTGACG |
| SeqF28A21.4 | 1.332 | 53.396-54.727 | CTCTCCGTTTCGTACAAACC | TGTTCAACAAGTTCGACTTCAAG |
| SeqF28A21.5 | 746 | 54.618-55.363 | GCAAGTAATTTCTTATATGAAATTG | AACACAAGCAGCTTTACCTTAT |
| AtSH1F+1R | 1.686 | 55.216-56.901 | TCTCTATCGCCACAATGATCATT | CGTGAGCAGATGTAAGAAATGTT |
| AtSH3F+2R | 1.130 | 56.740-57.869 | ATCTGTGACTTTGGCAGTGCG | TGAATTGTGTCCTCCACGTTTG |
| AtSH3F+5R | 729 | 56.740-57.468 | ATCTGTGACTTTGGCAGTGCG | AGTATTGAAGCAGCCTTGATGC |
| SeqF28A21.6 | 1.279 | 57.751-59.029 | TTGAATCAATCTGGAACCTAAAAG | CTTCCTTCCGATCGAATTTTAG |
| SeqF28A21.7 | 1.300 | 58.930-60.229 | CCAAGTCACTTGTTTGTGACG | CAGATTCTTTATGTTCCAGATTG |
| SeqF28A21.8 | 1.305 | 60.136-61.440 | GCATCACCTGAACTAGTCAAC | ACAATAACCAAACTCTCGATTC |
| SeqF28A21.9 | 1.313 | 61.354-62.666 | TTAGCAACATTGAAATGGATTGG | CAAAGAGACAAGTAGAGCTTC |
| At4g18740 | 1.117 | 62.304-63.420 | AAAATGTTTCAGCTTTACAAGAATG | TGTTGTGAGGTGAAGAAAGAGG |

^aLas letras F y R (de “forward” y “reverse”) se utilizan para denotar a cada uno de los dos cebadores que forman una pareja.

todos los productos de PCR así obtenidos y se analizaron los correspondientes electroforegramas en busca de indeterminaciones que pudieran corresponder a la presencia de dos o más nucleótidos distintos en una posición dada. La comparación de tales indeterminaciones con la secuencia de la estirpe *Ler* nos permitió identificar tres cambios puntuales en el gen *At4g18710*, cuyo producto es una quinasa homóloga a las proteínas SHAGGY (SGG) de *Drosophila melanogaster* (Siegfried *et al.*, 1990) y GLYCOGEN SYNTHASE KINASE3 (GSK3) de *Homo sapiens* (Woodgett, 1990).

IV.3.2.3.- Identificación y caracterización del gen *UCU1*

IV.3.2.3.1.- Estructura del gen *UCU1*

Empleando como molde ADN de *Ler* hemos amplificado mediante PCR los segmentos solapantes SeqF28A21.5, AtSH1F+1R y AtSH3F+2R (véanse la Tabla 26 y la Figura 35, en las páginas 138 y 139, respectivamente), que corresponden al intervalo comprendido entre las posiciones 54.618 y 57.869 pb del clon F28A21. La unidad de transcripción del gen *At4g18710* (55.332 a 57.771 pb del clon F28A21) está dentro de este intervalo. Hemos obtenido un total de 2.654 pb de la secuencia nucleotídica de este

gen, que incluyen la totalidad de sus exones e intrones, así como parte de sus regiones 5' y 3' no codificantes (véase la Figura 36, en la página 140).

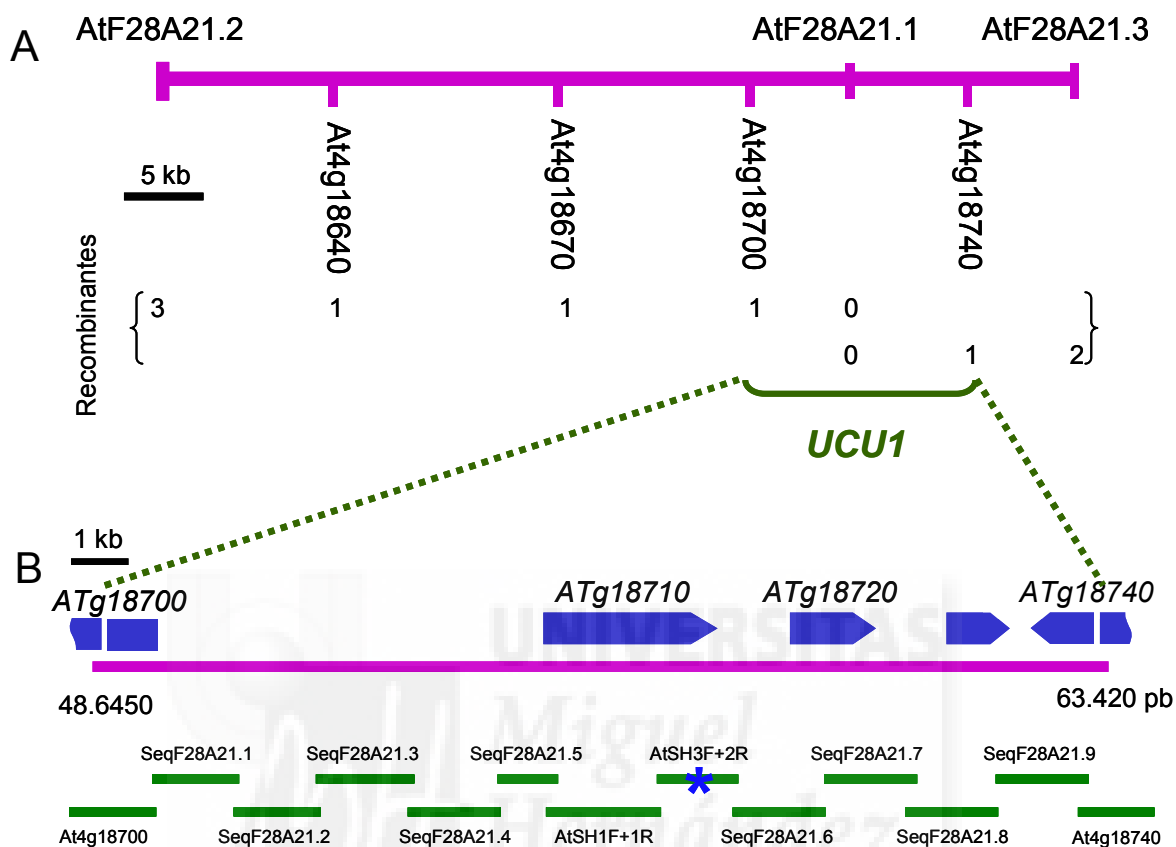
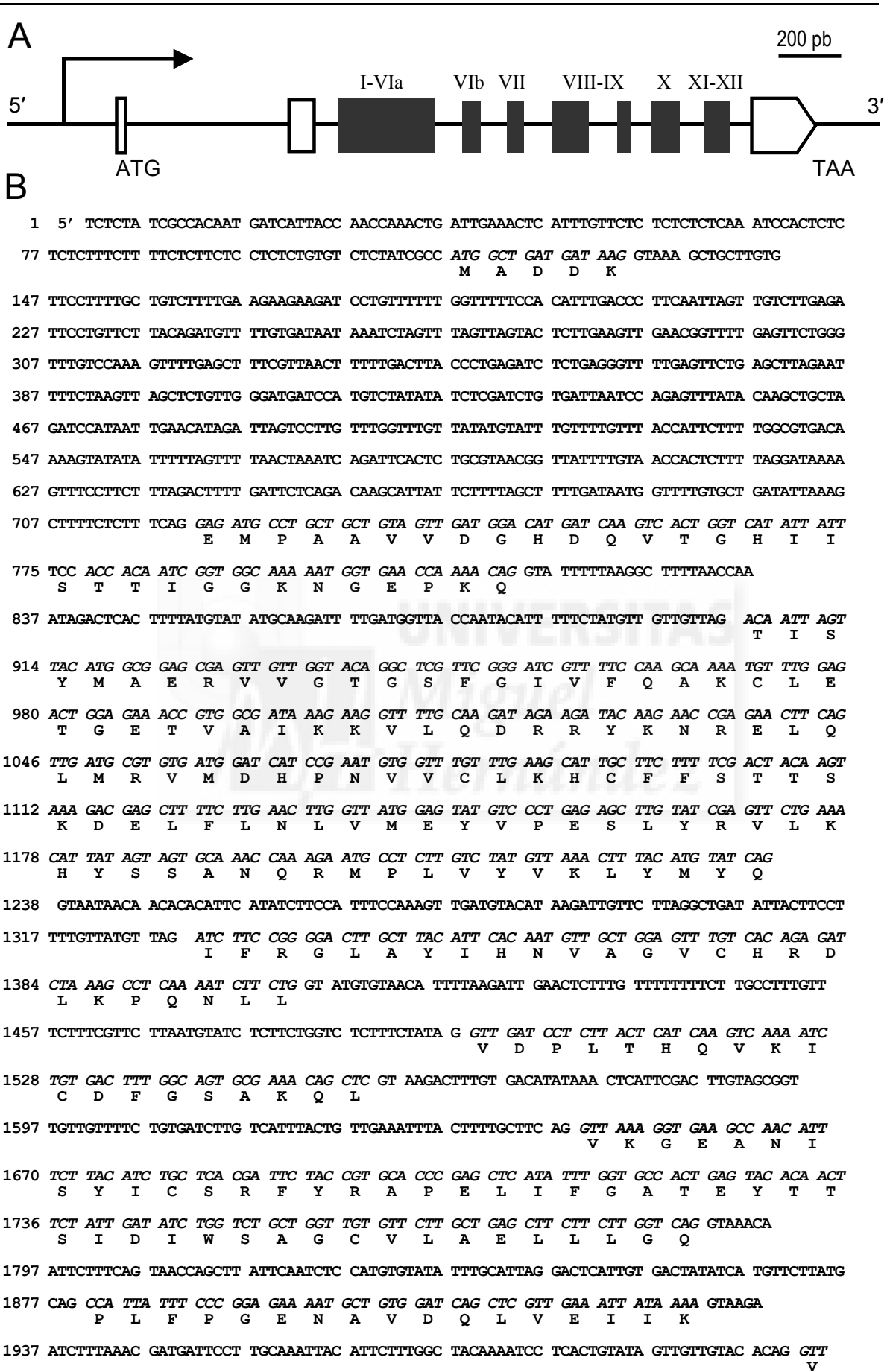


Figura 35.- Identificación del gen *UCU1*. (A) Región de 60 kb del clon BAC F28A21 en la que presuntamente radica el gen *UCU1*, con indicación de los marcadores SNP (en vertical) que se utilizaron para identificar hechos de recombinación adicionales a los previamente encontrados en el análisis del ligamiento a microsatélites. (B) Región de 15 kb que contiene el gen *UCU1*, que fue secuenciada totalmente a partir de la amplificación de los segmentos parcialmente solapantes representados en la parte inferior de la figura. Se destacan en azul los presuntos genes de esta región, denotándose con puntas de flecha el sentido de su transcripción. En la parte inferior de la figura se representan los productos de amplificación que se obtuvieron con el propósito de secuenciar esta región. El asterisco indica el producto de amplificación en el que se encontraron las mutaciones *ucu1*.

El gen *At4g18710* está constituido por 10 exones, cuyos tamaños varían desde las 51 pb del séptimo a las 333 del tercero, y 9 intrones, con tamaños comprendidos entre 80 y 589 pb (Figura 36), cuyas secuencias donantes y aceptoras se atienen a las de consenso para *Arabidopsis thaliana* (Brown *et al.*, 1996; <http://www.arabidopsis.org/>)



```

2014 CTT GGT ACA CCA ACT CGA GAA GAA ATC CGT TGT ATG AAT CCA CAT TAC ACA GAT TTC AGG TTT CCA
      L G T P T R E E I R C M N P N Y T D F R F P
2080 CAG ATA AAG GCA CAT CCC TGG CAC AAG GTTAGTGTCT TTTCTCTTTT TGCATGTGTT CTTGTTTCAG
      Q I K A H P W H K
2147 TTTCTTTCTT CACACATCAA CTGATCATAA TTACGTTTTG GTTTAG ATC TTC CAC AAA AGG ATG CCC CCA GAA
                        I F H K R M P P E
2220 GCG ATT GAT TTT GCA TCA AGG CTG CTT CAA TAC TCT CCA AGT CTA AGA TGC ACA GCG GTAAGCATTG
      A I D F A S R L L Q Y S P S L R C T A
2287 GTCTTGAGGT TTCTTCAGTC TCTAAGAATC CAACTGAATC CTTACTATAT ATTTTGTTC CTCGTATTTT AG CTC GAA
                        L E
2365 GCT TGT GCA CAT CCG TTC TTT GAT GAA CTC AGA GAA CCA AAC GCT CGT TTA CCA AAT GGA CGG CCT
      A C A H P F F D E L R E P N A R L P N G R P
2431 TTC CCG CCT CTC TTC AAC TTC AAA CAA GAA GTA GCT GGA TCA TCA CCT GAA CTG GTC AAC AAG TTG
      F P P L F N F K Q E V A G S S P E L V N K L
2497 ATT CCA GAC CAT ATC AAG AGA CAA TTG GGT CTA AGC TTC TTG AAT CAA TCT GGA ACT TAA
      I P D H I K R Q L G L S F L N Q S G T *
2557 AAGGGATCCT GCAAAGACA ACTACTTTTT TATATATAAT GTACCATTAC ACGAGCCACA AGGTCGTAGT TGAAGCAAA
2637 CGTGGAGGAC ACAATTCA 3'

```

Figura 36.- Estructura y secuencia del gen *UCUI*. (A) Estructura de la unidad de transcripción del gen *UCUI*. Los rectángulos representan a los exones, y las líneas que los separan, a los intrones. Los rectángulos coloreados en negro corresponden a los exones que cifran el dominio catalítico de la quinasa *UCUI*, cuyos subdominios se indican con números romanos. (B) Secuencias nucleotídicas y peptídicas del gen *UCUI* de *Arabidopsis thaliana*. Los nucleótidos se numeran a la izquierda y los exones se indican en cursiva.

splice_site.html). El ADNc del gen *At4g18710* tiene una longitud de 1.738 pb (X94939; Dornelas *et al.*, 1997), lo que incluye una región 5' no traducida de 200 pb, una pauta de lectura abierta de 1.143 pb y una cola 3' no traducida de 395 pb. La pauta de lectura abierta de este gen corresponde a una proteína de 380 aminoácidos y 43,1 kDa. El gen *UCUI* cifra la quinasa SHAGGY-like *etha* (EC 2.7.1.-) de *Arabidopsis thaliana*, también denominada AtSK21 (Dornelas *et al.*, 1999; Charrier *et al.*, 2002).

IV.3.2.3.2.- Filogenia molecular

Mediante el análisis bioinformático de la secuencia de aminoácidos de la proteína SHAGGY-like *etha* (AAM63594; véase el apartado III.9.3.2 de Materiales y Métodos, en la página 86), hemos identificado el dominio catalítico característico de las quinasa eucarióticas (Hanks, 1991), que incluye 284 aminoácidos de esta proteína, agrupados en 12 dominios estructurales definidos por homología (que suelen numerarse como I-XII), entre sus residuos 40 y 324, lo que incluye tanto el dominio de unión a ATP (desde el aminoácido 46 al 70, que define el subdominio I) como el sitio activo en el que reside la actividad quinasa de serina y treonina (desde el aminoácido 161 al 173; subdominio VII). También hemos identificado dos sitios potenciales de modificación postraduccional por

miristilación, en las posiciones 28 a 33 y 228 a 233. UCU1 (AtSK21) presenta semejanza con los miembros de la subfamilia 4.5.4 de quinasas de proteínas (<http://plantsp.sdsc.edu>), que agrupa a las homólogas de SHAGGY de *Drosophila melanogaster* (Siegfried *et al.*, 1990) y GSK3 de los vertebrados (Woodgett, 1990).

La proteína UCU1 presenta un 81% de semejanza y un 64% de identidad con la GSK3-β de *Xenopus laevis* (U31862), así como un 80% de semejanza y un 64% de identidad con las GSK3-β de *Danio rerio* (CAA11420), *Homo sapiens* (P49841), *Rattus norvegicus* (P18266) y *Mus musculus* (NP_062801). Es de destacar también el 76% de semejanza y el 59% de identidad que presenta con la proteína SHAGGY de *Drosophila melanogaster* (S11675). Por otro lado, en el genoma de *Arabidopsis thaliana* se han descrito nueve parálogos de *UCU1* que cifran proteínas de la subfamilia SHAGGY/GSK3 de quinasas (Jonak *et al.*, 1995; Dornelas *et al.*, 1997; 1998; 1999; 2000; Tichtinsky *et al.*, 1998; Charrier *et al.*, 2002; Jonak y Hirt, 2002). Otros ortólogos de *UCU1* son *OSKetha* (Y13437) del arroz, *PSK4* (X83619) de *Petunia × hybrida*, *NtK1* (X77763) del tabaco y

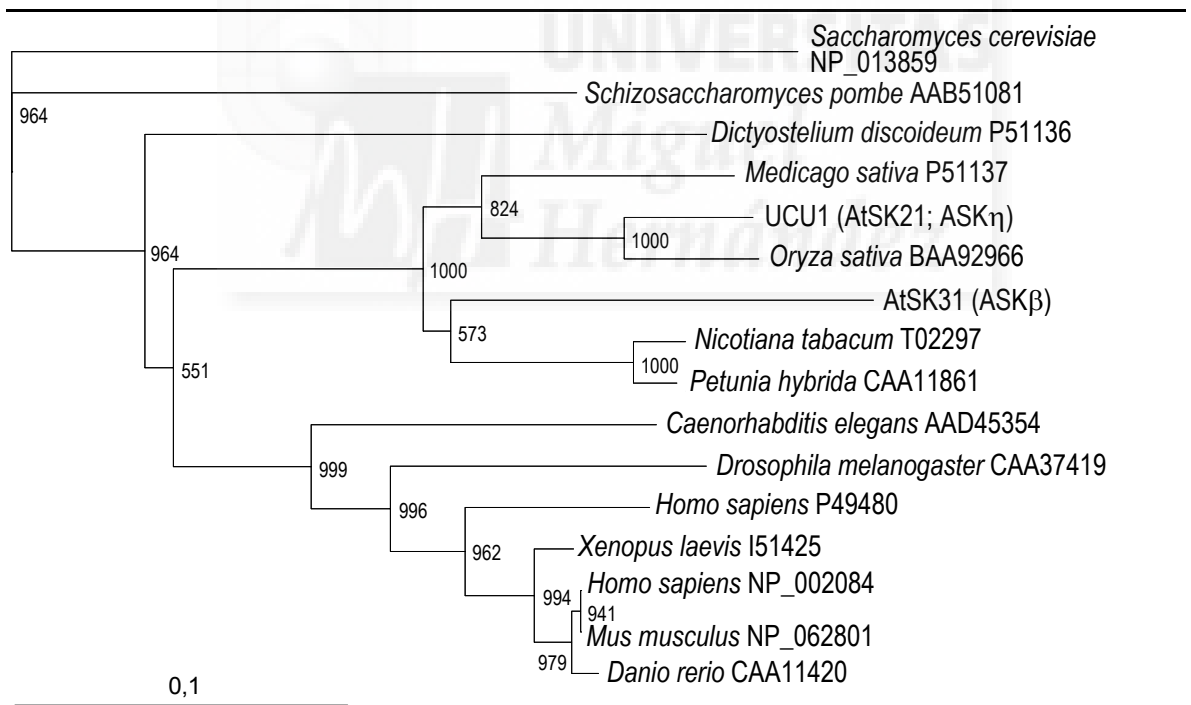


Figura 37.- Una hipótesis acerca de la relación filogenética entre algunos miembros representativos de la subfamilia SHAGGY/GSK3 de las quinasas. La longitud de las ramas horizontales del árbol es proporcional a la distancia entre los miembros de la subfamilia. Los números en los nudos del árbol indican los valores de *bootstrap* obtenidos a partir de 1000 iteraciones. Se indica el número de acceso de cada proteína en la base de datos. La barra de escala indica una distancia evolutiva de 0,1 sustituciones de aminoácidos por cada posición.

MsK-3 (X68409) de la alfalfa (*Medicago sativa*), cuyas proteínas presentan un 95%, 90%, 90% y 88% de semejanza con UCU1, respectivamente, así como un 89%, 60%, 79% y 78% de identidad, también respectivamente.

Hemos obtenido un alineamiento múltiple del extremo carboxilo del dominio catalítico (Hanks, 1991) de 23 quinasas relacionadas con SHAGGY, GSK3 y UCU1, cuya secuencia está depositada en las bases de datos del GenBank (Benson *et al.*, 2002). Mediante el programa CLUSTALX 1.5b (Thompson *et al.*, 1997) se calculó la matriz de las distancias entre varios miembros representativos de la subfamilia SHAGGY/GSK3 y se construyó el árbol filogenético que se recoge en la Figura 37, cuya representación gráfica se realizó utilizando el programa TreeView 1.40 (Page, 1996, véase el apartado III.9.3.2 de Materiales y Métodos, en la página 86). Se observa en la Figura 37 que todas las quinasas de esta subfamilia pertenecientes a especies vegetales se agrupan en una misma rama del árbol, mientras que las de los metazoos lo hacen en otra.

La Figura 38 muestra los resultados del alineamiento de los subdominios X y XI



Figura 38.- Alineamiento múltiple de la región carboxi-terminal de varios miembros representativos de la subfamilia SHAGGY/GSK3 de las quinasas. Cada aminoácido idéntico al de la misma posición en la proteína UCU1 de *Arabidopsis thaliana* se destaca en blanco sobre fondo negro, sombreándose en gris los que son similares. Las dos primeras letras de las denominaciones de cada secuencia indican la especie a la que corresponde, seguidas de su número de acceso (Sc: *Saccharomyces cerevisiae*; Sp: *Schizosaccharomyces pombe*; Dd: *Dictyostelium discoideum*; Ce: *Caenorhabditis elegans*; Dm: *Drosophila melanogaster*; Dr: *Danio rerio*; Xl: *Xenopus laevis*; Mm: *Mus musculus*; At: *Arabidopsis thaliana*; Os: *Oryza sativa*; Nt: *Nicotiana tabacum*; Ms: *Medicago sativa*; Ph: *Petunia hybrida*; y Hs: *Homo sapiens*). Las puntas de flecha indican los aminoácidos modificados por las mutaciones *ucul*.

de algunas de las proteínas SHAGGY/GSK3 que se estudiaron. Se evidencia la existencia de varios residuos altamente conservados, que muy probablemente están implicados en la regulación de la actividad de estas quinasas mediante su interacción con otras proteínas (Ferkey y Kimelman, 2002; Fraser *et al.*, 2002). Los aminoácidos que se muestran en el alineamiento incluyen los alterados por las mutaciones *ucu1* (véase el apartado IV.3.2.3.3, en la página 144).

IV.3.2.3.3.- Identificación de mutaciones

Para confirmar las mutaciones encontradas en el gen *At4g18710* en las estirpes *ucu1*, hemos amplificado, empleando los cebadores AtSH3F y AtSH2R (véase la Tabla 26, en la página 138), y posteriormente secuenciado la región en la que se encontraron las indeterminaciones mencionadas en el apartado IV.3.2.2.2, en la página 137. Se utilizó para ello ADN genómico de plantas *ucu1-1/ucu1-1*, *ucu1-2/ucu1-2* y *ucu1-3/ucu1-3*, comparando la secuencia nucleotídica obtenida en cada caso con la de su ancestro silvestre. Las mutaciones encontradas se detallan en la Figura 39.

Los alelos *ucu1-1* y *ucu1-2* presentan la misma mutación, una transición G→A en el nucleótido 1.855 de la unidad de transcripción, en su octavo exón, que determina la sustitución de un residuo de ácido glutámico (E) por otro de lisina (K), lo que podría modificar la estructura secundaria de la proteína. La reconstrucción tridimensional de la proteína UCU1, que hemos realizado con el programa RasMol 2.6 (Sayle y Milner-White, 1995) utilizando sus secuencias silvestre y mutante, confirma esta hipótesis. La mutación daña el subdominio X de la proteína, que se encuentra altamente conservado entre todos los miembros de la subfamilia SHAGGY/GSK3, sustituyendo la secuencia consenso TREEIR por TREKIR.

El alelo mutante *ucu1-3* presenta una transición C→T en la posición 1.919 del gen, en el octavo exón, a sólo 63 pb de la mutación presente en *ucu1-1* y *ucu1-2*. Esta mutación introduce una serina (S) en lugar de una prolina (P) que está muy conservada entre todos los miembros de la subfamilia SHAGGY y GSK3 (Figura 38), lo que también podría modificar la estructura tridimensional de la proteína.

IV.3.2.3.4.- Análisis de la expresión del gen *UCU1*

La expresión del gen *AtSK21* (*SHAGGY-like etha*; *UCU1*) ha sido analizada por autores anteriores mediante el método de Northern, concluyendo que se transcribe en

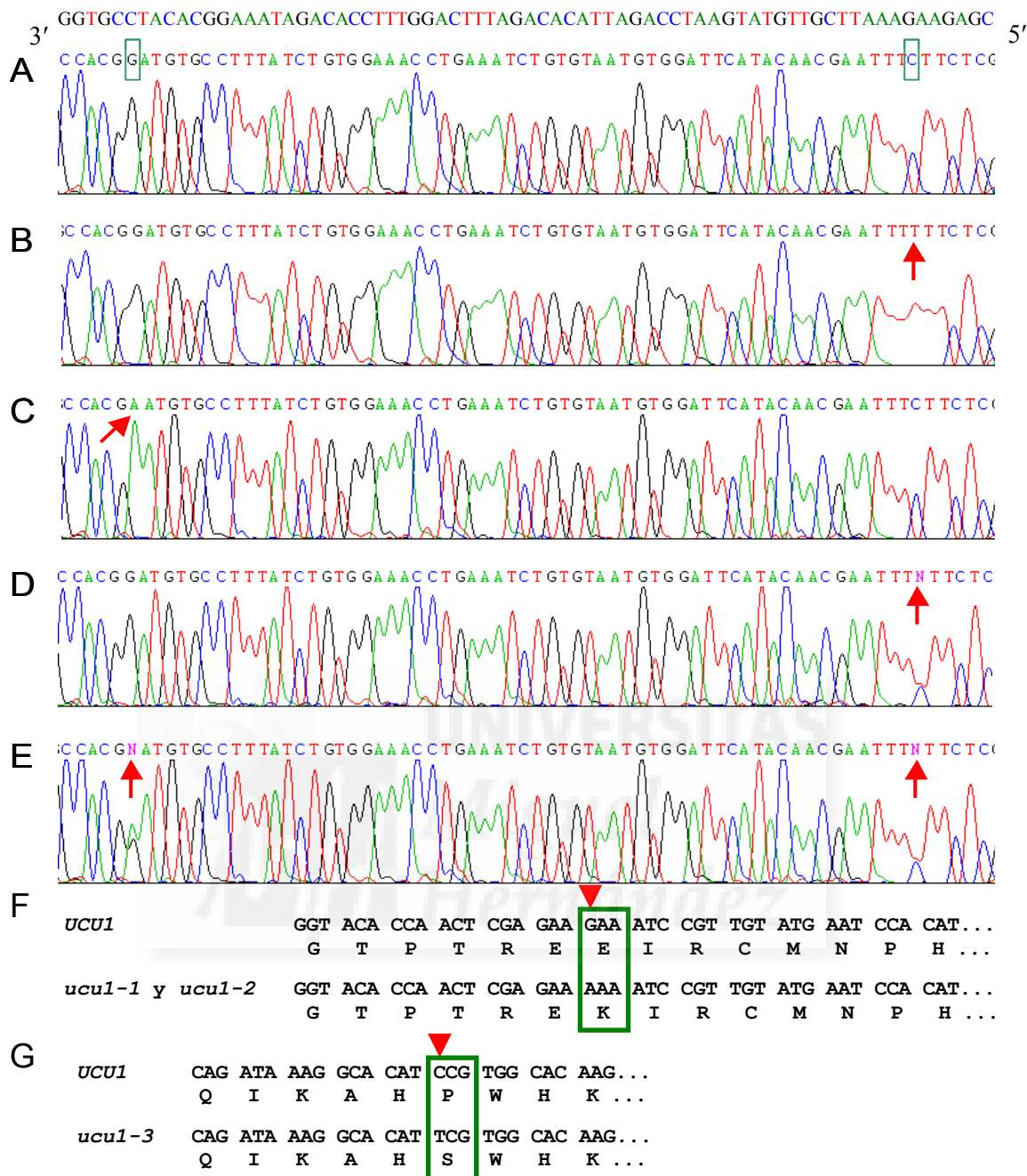


Figura 39.- Naturaleza estructural de las mutaciones *ucu1*. (A-E) Electroforegramas correspondientes a las secuencias nucleotídicas de los alelos del gen *UCU1*. Los genotipos de los individuos cuya secuencia se representan son los siguientes: (A) *Ler*, (B) *ucu1-1/ucu1-1*, (C) *ucu1-3/ucu1-3*, (D) *ucu1-1/UCU1*, y (E) *ucu1-1/ucu1-3*. Se representa únicamente la secuencia de la región del gen que incluye las mutaciones. Se destacan con un recuadro verde los nucleótidos del alelo silvestre que corresponden a los modificados en los mutantes, y estos últimos con una flecha. Las indeterminaciones (N) en las secuencias nucleotídicas de los heterocigotos se deben a la incapacidad del secuenciador para resolver la ambigüedad causada por la presencia simultánea de dos picos en la misma posición. (F-G) Secuencias nucleotídicas y peptídicas de *UCU1* en *Ler* y en los mutantes *ucu1*. Se representa únicamente la zona adyacente a las mutaciones presentes en los alelos (F) *ucu1-1* y *ucu1-2* y (G) *ucu1-3*. Se indica con una flecha el nucleótido modificado por las mutaciones.

todos los órganos de la planta adulta y que en las etapas más tempranas del desarrollo, su actividad parece restringida al suspensor embrionario (Dornelas *et al.*, 1999). Con el fin de determinar si la transcripción de *UCU1* (*AtSK21*) se ve modificada en los mutantes *ucu1*, hemos realizado experimentos de RT-PCR, según se describe en el apartado III.7.3 de Materiales y Métodos, en la página 82. Para ello, hemos empleado como cebadores parejas de oligonucleótidos diseñados a partir de secuencias de dos exones distintos, que flanquean a un intrón, y como molde ARN total extraído de hojas y flores de la estirpe *Ler* y los mutantes *ucu1*. La utilización de los cebadores AtSH1F y AtSH1R (véanse la Tabla 26 y la Figura 35, en las páginas 138 y 139, respectivamente) rinde un producto de amplificación de 1.686 pb al utilizar ADN genómico como molde, y otro de 727 si se emplea ADNc. Por otra parte, la combinación de AtSH3F y AtSH5R (véanse la Tabla 26 y la Figura 35, en las páginas 138 y 139, respectivamente) rinde productos de 729 y 379 pb al utilizar ADN genómico y ADNc, respectivamente. No hemos encontrado diferencias en la expresión de este gen entre los mutantes y su ancestro *Ler*, tanto en las hojas como en las flores (Figura 40).

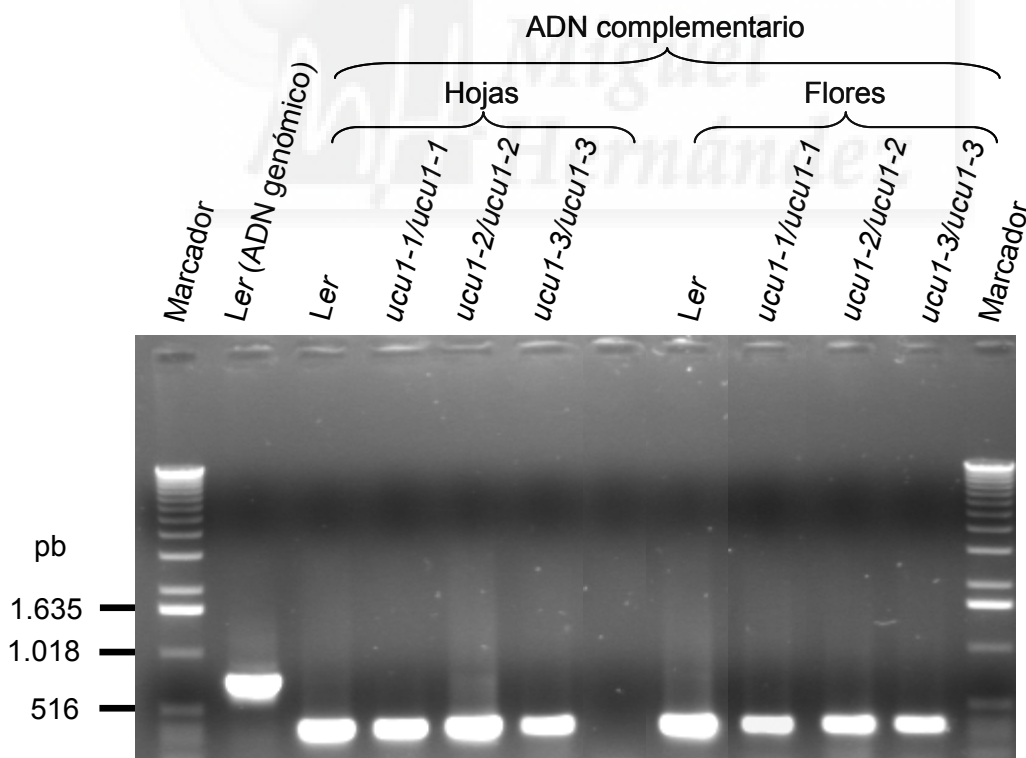


Figura 40.- Expresión del gen *UCU1* en los mutantes *ucu1*. Aparecen en la imagen los productos de transcripción del gen *UCU1* obtenidos con los cebadores AtSH3F y AtSH5R y visualizados en un gel del 1% en agarosa, teñido con bromuro de etidio. Las calles de los extremos corresponden a un marcador de peso molecular.

IV.3.2.3.5.- Construcción y transferencia de transgenes

La confirmación de la identidad de un gen candidato, identificado a partir del aislamiento de uno o varios de sus alelos mutantes, suele hacerse en *Arabidopsis thaliana* mediante rescate fenotípico. Esta última denominación, o la de complementación funcional, es la que recibe la restauración del fenotipo silvestre en un mutante al que se ha transferido un transgén que contiene el alelo silvestre del gen candidato.

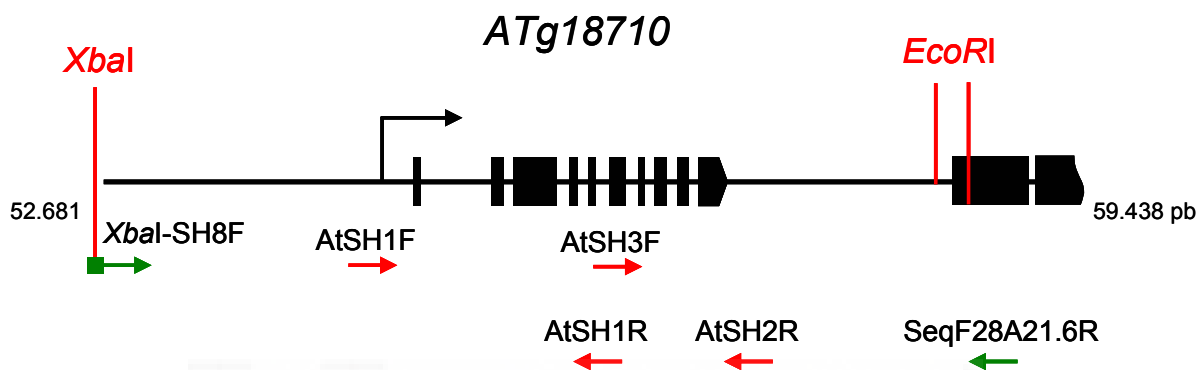


Figura 41.- Construcción de transgenes para el rescate fenotípico de los mutantes *ucul*. Se representa la región del genoma de *Arabidopsis thaliana* que contiene al gen *At4g18710*. Los rectángulos negros representan a los exones, las flechas verdes a los cebadores utilizados para la construcción del transgén y las rojas a los que se utilizaron para comprobar su integridad en los transformantes. Las líneas verticales representan dianas de restricción.

Hemos obtenido varios transgenes con el propósito de confirmar que *UCU1* es *At4g18710*. Para ello, hemos amplificado mediante PCR un segmento de 6.367 pb que incluye a *At4g18710*, utilizando como molde ADN plasmídico del clon BAC F28A21 y como cebadores los oligonucleótidos *XbaI*-SH8F y SeqF28A21.6R (Figura 41). Su restricción con las enzimas *EcoRI* y *XbaI* (Figura 41; véase el apartado III.6.4 de Materiales y Métodos, en la página 80) produjo tres fragmentos, el mayor de los cuales, de 6.205 pb, incluye toda la región codificante de *UCU1*, así como 2.651 pb de su extremo 5' y 1.108 pb del 3'. Hemos insertado este fragmento de 6,2 kb en el vector plasmídico pCLD04541 (véase el apartado III.11 de Materiales y Métodos, en la página 89), mediante su restricción con *EcoRI* y *XbaI* y la ligación de ambos, según se indica en el apartado III.6.4 de Materiales y Métodos, en la página 80. Con la construcción así obtenida, que hemos denominado *pUCU1-04541*, se transformaron células de *Escherichia coli* (véase el apartado III.12.1 de Materiales y Métodos, en la página 91). Para comprobar la integridad de la construcción en los presuntos transformantes, se

empleó una porción de cada colonia como molde en dos amplificaciones, llevadas a cabo con la pareja de cebadores AtSH1F y AtSH1R en un caso, y AtSH3F y AtSH2R en el otro (Figura 41). Se obtuvieron los productos de tamaño esperado a partir de cuatro de las colonias analizadas, lo que confirmó la presencia de la región codificante del gen *UCU1*. El ADN plasmídico de estos transformantes fue purificado (véase el apartado III.6.2 de Materiales y Métodos, en la página 78) y utilizado a su vez para transformar células competentes de la estirpe LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* (véase el apartado III.12.1 de Materiales y Métodos, en la página 91). En los presuntos transformantes así obtenidos también se comprobó la integridad del gen *At4g18710* mediante PCR.

Se realizó a continuación un cultivo en medio líquido de uno de los clones de *Agrobacterium tumefaciens* que contenía la construcción *pUCU1-04541*, que se utilizó para infectar por infiltración plantas de *Arabidopsis thaliana*, según se describe en el apartado III.12.2.1 de Materiales y Métodos, en la página 94. Se sometieron a infiltración 150 plantas *Ler*, 400 *ucu1-3/ucu1-3* y 150 *ucu1-2/ucu1-2*. Las plantas sometidas a infiltración (T_1) completaron su ciclo de vida y la progenie resultante de su autofecundación (T_2) fue sometida a selección en presencia de kanamicina (Figura 42; véase el apartado III.12.2.2 de Materiales y Métodos, en la página 95). La eficacia de la transformación fue del 0,01% en *Ler* (2 plantas Kan^R de un total de 20.000 semillas T_2), el 0,032% en *ucu1-3/ucu1-3* (24 de 75.000) y el 0,005% en *ucu1-2/ucu1-2* (1 de 20.000).

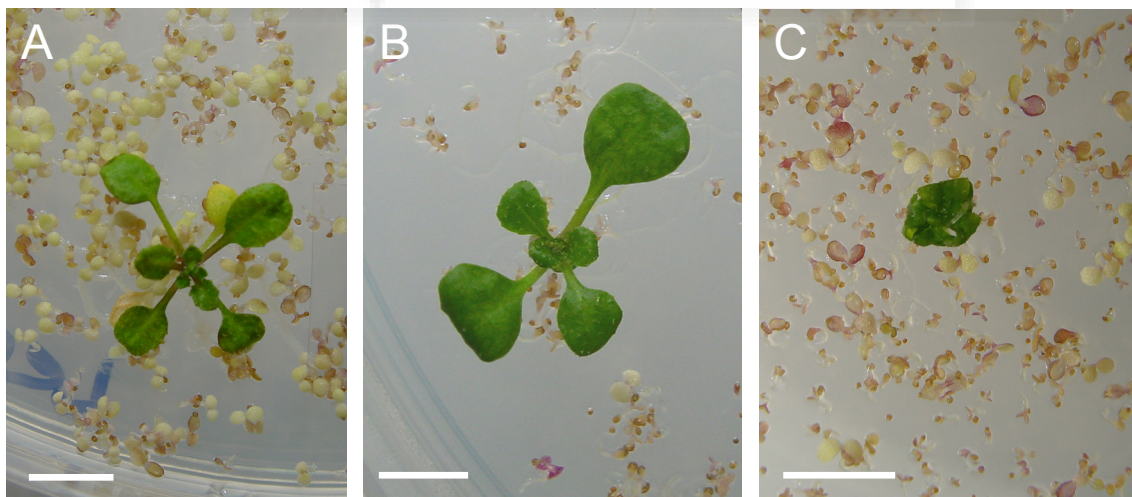


Figura 42.- Fenotipo de las plantas transgénicas portadoras de la construcción *pUCU1-04541*. Las imágenes corresponden a rosetas de los individuos T_2 resistentes a kanamicina que incorporan presuntamente la construcción *pUCU1-04541*, descendientes de *Ler* (A), *ucu1-3/ucu1-3* (B) y *ucu1-2/ucu1-2* (C). Las fotografías se tomaron 21 días después de la siembra. Las barras de escala indican 4 mm.

Tabla 27.- Segregación de la resistencia a kanamicina en la progenie de plantas transformadas por infección con *Agrobacterium tumefaciens*

| Planta T ₁ que se autofecundó | T ₂ | T ₃ | | | |
|--|----------------|-----------------------|----------------------|------------------|----------|
| | | Medio sin suplementar | Medio con kanamicina | | |
| | | | Kan ^R | Kan ^S | χ^2 |
| <i>Ler;pUCU1-04541</i> | Silvestre(1) | 87 Silvestre | 85 | - | 0,021 |
| | Silvestre(2) | 56 Silvestre | 47 | 17 | |
| <i>ucu1-3/ucu1-3;pUCU1-04541</i> | UcuD(1) | 62 UcuD | 43 | 19 | 0,774 |
| | UcuD(2) | 94 UcuD | 72 | 19 | 0,619 |
| | UcuD(3) | 18 UcuD | 23 | 3 | 1,846 |
| | UcuD(5) | 76 UcuD | 60 | 18 | 0,068 |
| | UcuD(6) | 82 UcuD | 55 | 26 | 1,815 |

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 37, en la página 175. El valor de χ^2 representa el ajuste de los datos de la población T₃ estudiada a una segregación fenotípica 3:1 (Kan^R:Kan^S).

Aunque las plantas transgénicas obtenidas a partir de los mutantes *ucu1-3/ucu1-3* presentaron una variabilidad fenotípica considerable, todas mostraban alguna hoja recurvada, similar a las de sus parentales (Figura 42B). La única planta transgénica obtenida a partir del mutante *ucu1-2/ucu1-2* fue morfológicamente indistinguible de su parental (Figura 42C). Estos resultados, considerados en conjunto con los que se presentan en la Tabla 27, indican que la incorporación de una o incluso dos dosis del alelo silvestre de *UCU1* a los mutantes *ucu1-2/ucu1-2* y *ucu1-3/ucu1-3* no restaura el fenotipo silvestre, lo que sugiere que las mutaciones *ucu1* no son hipomorfas ni nulas.

IV.4.- Clonación posicional del gen *UCU2*

IV.4.1.- Cartografía de baja resolución

En una Tesis previa se determinó la existencia de ligamiento entre el gen *UCU2* y varios microsatélites del cromosoma 3 (Robles, 1999; Tabla 28). Para confirmar estos resultados, hemos obtenido dos poblaciones cartográficas F₂, a partir de los cruzamientos *ucu2-2/ucu2-2* × *Ler* y *ucu2-3/ucu2-3* × *Ler* (el ancestro silvestre de la estirpe *ucu2-2* es Col-1 y el de *ucu2-3*, Col-0), en cada una de las cuales hemos genotipado 32 plantas de fenotipo mutante. Estos resultados (Tabla 28), considerados en conjunto con los obtenidos anteriormente a partir de un cruzamiento *ucu2-1/ucu2-1* × Col-0 (Robles, 1999), indicaron que el gen *UCU2* radica en el cromosoma 3, ligado a los marcadores AthCHIB, nga162 y AthGAPab (en las posiciones 19,10, 20,56 y 43,77 cM, respectivamente) y que el mutante *ucu2-2* podría ser portador de una translocación.

Tabla 28.- Cartografía de baja resolución del gen *UCU2*

| Marcador | Cromosoma y posición de mapa (en cM) | <i>ucu2-1</i> ^a | <i>ucu2-2</i> | <i>ucu2-3</i> |
|------------|--------------------------------------|----------------------------|-------------------------|------------------------|
| AthACS | 1; 1,20 | 12,50±11,69 (8) | 53,57±6,66 (56) | 87,50±4,42 (56) |
| AthZFPG | 1; 35,25 | 55,56±11,71 (18) | 45,00±6,42 (60) | 52,17±7,37 (46) |
| T27k12-Sp6 | 1; 59,10 | 42,86±13,23 (14) | 13,33±6,21 (30) | 58,62±6,47 (58) |
| AthGENEA | 1; 86,79 | ND | 35,48±6,08 (62) | 36,21±6,31 (58) |
| nga111 | 1; 113,44 | 66,67±11,11 (18) | 41,94±6,27 (62) | 62,96±6,57 (54) |
| nga1145 | 2; 9,60 | 55,56±11,71 (18) | 45,16±6,32 (62) | ND |
| nga1126 | 2; 50,65 | ND | 64,58±6,90 (48) | 13,46±4,73 (52) |
| nga361 | 2; 63,02 | 33,33±19,25 (6) | 63,33±6,22 (60) | 31,03±6,07 (58) |
| nga168 | 2; 73,77 | 50,00±25,00 (4) | 41,67±10,06 (24) | 29,31±5,98 (58) |
| AthCHIB | 3; 19,10 | 12,50±8,27 (16) | ND | 10,71±4,13 (56) |
| nga162 | 3; 20,56 | 0,00±0,24 (18) | 72,41±5,87 (58) | 6,90±3,33 (58) |
| AthGAPab | 3; 43,77 | 0,00±0,32 (10) | 1,61±1,60 (62) | 10,34±4,00 (58) |
| nga6 | 3; 86,41 | 55,56±11,71 (18) | 93,55±3,12 (62) | 23,91±6,29 (46) |
| nga12 | 4; 22,92 | 35,71±12,81 (14) | 32,26±5,94 (62) | 55,17±6,53 (58) |
| nga1111 | 4; 29,64 | 44,44±11,71 (18) | 20,97±5,17 (62) | 55,36±6,64 (56) |
| AM4 | 4; 52,0 | ND | 20,00±12,65 (10) | 82,76±4,96 (58) |
| nga1139 | 4; 83,41 | 62,50±12,10 (16) | 3,23±2,24 (62) | 56,90±6,50 (58) |
| nga1107 | 4; 104,73 | 31,25±11,59 (16) | 65,38±9,33 (26) | 75,00±7,65 (32) |
| AthCTR1 | 5; 9,32 | 50,00±12,50 (16) | 46,67±6,44 (60) | 56,90±6,50 (58) |
| nga139 | 5; 50,48 | 38,89±11,49 (18) | 75,00±6,25 (48) | 50,00±7,07 (50) |
| AthPHYC | 5; 71,13 | 66,67±13,61 (12) | 45,45±7,51 (44) | 41,07±6,57 (56) |
| MBK5 | 5; 121,00 | ND | 43,10±6,50 (58) | 46,43±6,66 (56) |

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 17, en la página 126. Se indica entre paréntesis el número de cromosomas genotipados para cada marcador. ^aEstos datos se han tomado de Robles, 1999.

Se preparó a continuación una mezcla de tres parejas de cebadores que permiten la coamplificación simultánea de los microsatélites AthCHIB, nga162 y AthGAPab, con los que se obtuvieron los resultados de la Tabla 29, tras analizar 140 individuos UcuE de la F₂ del cruzamiento *ucu2-1/ucu2-1* × Col-0. Se concluyó que *UCU2* está flanqueado por nga162 y AthGAPab, de los que dista 8,35±1,76 y 17,63±3,10 cM, respectivamente (Figura 43).

Con el propósito de estrechar la región candidata a contener a *UCU2*, se empleó el marcador AtDMC1, que se encuentra en la posición 32,66 cM del cromosoma 3. La estirpe Col-0 difiere de Ler en la presencia de un transposón en el promotor del gen *AtDMC1* (Klimyuk y Jones, 1997). La amplificación mediante PCR del promotor de

Tabla 29.- Análisis del ligamiento del gen *UCU2* a microsatélites del cromosoma 3

| Marcador | Posición de mapa (cM) | Cromosomas analizados | | Distancia (cM) |
|----------|-----------------------|-----------------------|-------|----------------|
| | | Recombinantes | Total | |
| AthCHIB | 19,10 | 27 | 258 | 10,62±1,99 |
| nga162 | 20,56 | 23 | 278 | 8,35±1,76 |
| AthGAPab | 43,77 | 29 | 252 | 17,63±3,10 |

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 18, en la página 127.

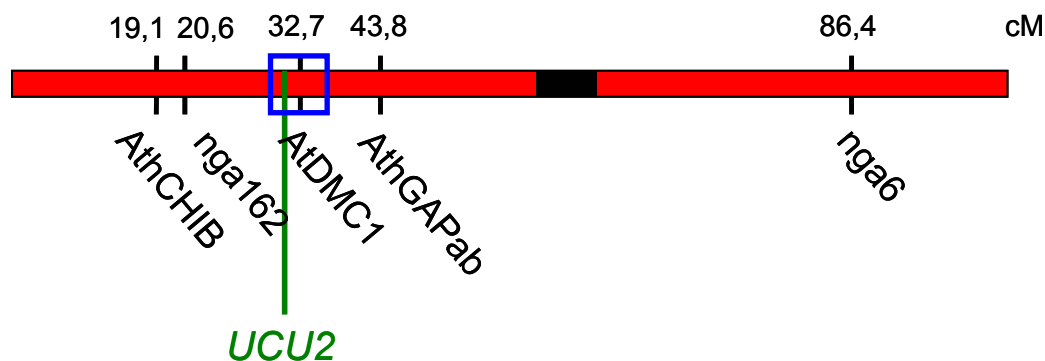


Figura 43.- Cartografía de baja resolución del gen *UCU2*. Se representa un mapa genético del cromosoma 3 de *Arabidopsis thaliana*, con indicación de las posiciones de los marcadores utilizados para la cartografía de baja resolución del gen *UCU2*. La región recuadrada en azul fue analizada según se detalla más adelante, en la Figura 44. La posición del centrómero se destaca en negro.

AtDMC1 utilizando simultáneamente tres oligonucleótidos (cuya secuencia se indica en <http://www.arabidopsis.org/aboutcaps.html>) rinde dos productos, de 2.200 y 446 pb, cuando se emplea como molde ADN genómico de la estirpe Col-0, y sólo uno, de 342 pb, a partir del de Ler. Tras genotipar para este marcador 315 individuos de la población cartográfica F₂ obtenida del cruzamiento *ucu2-1/ucu2-1* × Col-0, se encontraron 11 cromosomas recombinantes de los 574 estudiados. Además, ninguno de los 23 recombinantes para nga162 identificados previamente lo fue para *AtDMC1* y 6 de los 29 recombinantes para AthGAPab también lo eran para *AtDMC1*. Estos resultados indican que *UCU2* está dentro de una región de 12,10 cM, flanqueada por nga162 y *AtDMC1*, y a 1,92±0,57 cM de este último (Figura 43). En esta región se encuentran los genes *DIM* y *AXR2*, cuyas mutaciones causan enanismo (véase el apartado IV.5.2.2, en la página 176), lo que nos indujo a realizar cruzamientos *dim-1/dim-1* × *ucu2-1/ucu2-1* y *axr2-1/axr2-1* × *ucu2-1/ucu2-1*. Estos ensayos de alelismo condujeron a la conclusión de que *UCU2* es un gen distinto de *DIM* y *AXR2*. En el primero de dichos análisis de

Tabla 30.- Marcadores desarrollados en esta Tesis para la cartografía de alta resolución del gen *UCU2*

| Marcador | Repetición | Clon BAC | Posición de la repetición en el clon BAC (pb) | Secuencias nucleotídicas de los oligonucleótidos empleados (5' → 3') | | Tamaño del producto de PCR (pb) | | |
|------------------------------|---|----------|---|--|---------|---------------------------------|-----|-------|
| | | | | Cebador marcado | Marcaje | Cebador sin marcar | Ler | Col-0 |
| AtMQC12 | (TA) ₁₇ | AB024036 | 79.407-79.613 | ATATCTATGGATGTTTAAATTATCG | HEX | AAATTTACATGGGAGTATGCCT | 207 | 207 |
| AtMSA6.1 | (GA) ₃₆ | AP000604 | 29.318-29.604 | ACCACAGAGTGAAATAACACCG | TET | CAGAAGCTTGGACGGTACG | 287 | 287 |
| AtMXL8.1 | (A) ₄₅ (CT) ₁₉ | AB023045 | 63.712-64.082 | TCTTTCTTGAAGCCAAAGGCAAG | TET | CAACATGTATTGATGCATACGTG | 371 | 371 |
| AtMHC9.1 | (TA) ₄₂ y (GA) ₁₅ | AP001305 | 3.316-3.716 | ACAGAGGAACAA TTGATCTCATC | HEX | TCACAGGAAACTCTGAGAAAACG | 448 | 400 |
| AtMIL23.1 | (TTC) ₁₀ | AB019232 | 5.221-5.428 | CCAGATAATTAGGTAGTTCACGC | - | GGCAATTCATCCACTGACAAAAC | 208 | 208 |
| AtMSD21.1 | (AT) ₁₆ | AB025634 | 29.271-29.544 | GTAGATATTATACATGTAACATTCG | 6-FAM | TTAAAAACGGTAAGGTAGTTATTAC | 247 | 274 |
| AtMZN24.2 | (AT) ₁₇ | AB028622 | 69.687-69.707 | ATCAACTGGAAGCACCTTGCGC | HEX | TGAGGTGTTTGCCGATCTACG | 230 | 240 |
| AtMCB17.1 | (GA) ₃₄ | AB022215 | 33.258-33.477 | CGTGGATTTATTGCTACTCTG | - | ATTTCCGGCAGCCGCCCATAG | 220 | 220 |
| AtMWI23.1^a | (TGGAGG) ₁₅ | AB022223 | 52.271-52.588 | GAAGCCTTAGTAATGCACCCGG | 6-FAM | GATTGTGCATCCTTTGGCTGC | 318 | 354 |

Se siguen las pautas definidas en la Tabla 20. ^aEl tamaño de cada alelo se confirmó mediante la secuenciación de los productos de amplificación, lo que nos permitió encontrar 15 repeticiones del motivo TGGAGG en la secuencia de la estirpe Col-0, y 9 en Ler.

complementación se obtuvo una F_1 silvestre, tal como cabía esperar de un cruzamiento entre homocigotos para mutaciones recesivas no alélicas. Por su parte, la mutación *axr2-1* es dominante, por lo que todas las plantas F_1 del cruzamiento *axr2-1/axr2-1* × *ucu2-1/ucu2-1* presentaron fenotipo Axr2 (véase el apartado IV.5.2.2.4, en la página 181). Entre las 990 plantas F_2 analizadas, que procedían de la autofecundación de 6 plantas F_1 , se encontraron 14 silvestres, 732 Axr2 y 244 UcuE. Estos resultados permiten concluir que *UCU2* es un gen distinto de *AXR2*, del que dista $2,85 \pm 0,37$ cM.

IV.4.2.- Cartografía de alta resolución

IV.4.2.1.- Obtención y ensayo de nuevos marcadores

Tal como se hizo con *UCU1* (véase el apartado IV.3.2.1, en la página 129), hemos analizado la secuencia nucleotídica de los 20 clones BAC que cubren la región comprendida entre nga162 y AtDMC1 (<http://mips.gsf.de/proj/thal/db/index.html>), con el fin de encontrar microsatélites presuntamente polimórficos. En la Tabla 30 se indica la secuencia de los oligonucleótidos que hemos diseñado para amplificar algunos de dichos microsatélites y los tamaños de los productos de amplificación obtenidos empleando como molde ADN genómico de Ler y Col-0. Aquéllos que resultaron polimórficos se utilizaron para la cartografía de alta resolución del gen *UCU2*. El marcaje de uno de los miembros de cada pareja de oligonucleótidos con distintos fluorocromos permitió la coamplificación simultánea de los microsatélites AtMHC9.1, AtMSD21.1, AtMZN24.2 y AtMWI23.1. Para la estimación ulterior del tamaño de sus alelos se procedió tal como se describe en el apartado III.13.1.1 de Materiales y Métodos, en la página 96.

La Tabla 31 recoge los resultados del análisis de 588 individuos (1.176 cromosomas) de la población cartográfica F_2 obtenida del cruzamiento *ucu2-1/ucu2-1* × Col-0. Se concluyó que el gen *UCU2* está íntimamente ligado a AtMSD21.1, ya que sólo uno de los 1.176 cromosomas estudiados fue recombinante para este marcador. Un total de 47 individuos de esta última población cartográfica resultaron heterocigotos para nga162 o para AtDMC1 (Tabla 32). Ninguno de los tres heterocigotos encontrados para el marcador AtMHC9.1 (los individuos que hemos denominado 49, 505 y 601) lo era para AtMSD21.1. Por su parte, el individuo 499 era heterocigoto para AtMSD21.1 pero no para AtMHC9.1. De lo anterior se deduce que *UCU2* radica en una región de 165 kb, flanqueada por AtMHC9.1 y AtMSD21.1. Esta región candidata está representada en tres clones BAC, los denominados MHC9 (AP001305), MIL23 (AB019232) y MSD21 (AB025634) (véase la Figura 44, en la página 155).

Tabla 31.- Resultados de la cartografía de alta resolución del gen *UCU2*

| Marcador | Posición de mapa (cM) | Cromosomas analizados | | Distancia (cM) |
|-----------|-----------------------|-----------------------|-------|----------------|
| | | Recombinantes | Total | |
| AtMHC9.1 | 28,5 | 3 | 716 | 0,42±0,24 |
| AtMSD21.1 | 29,1 | 1 | 1.176 | 0,09±0,08 |
| AtMZN24.2 | 29,2 | 7 | 989 | 0,71±0,27 |
| AtMWI23.1 | 30,1 | 20 | 986 | 2,03±0,45 |

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 18, en la página 127.

Tabla 32.- Genotipado de recombinantes informativos con respecto a algunos marcadores del cromosoma 3

| Marcador | Genotipo de los individuos analizados | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|---------------------------------------|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 2 | 7 | 9 | 11 | 18 | 25 | 26 | 40 | 42 | 46 | 49 | 52 | 66 | 93 | 122 | 163 | 167 | 172 | 180 | 182 | 189 | 195 | 199 |
| nga162 (20,6) | H | H | H | - | H | H | H | L | H | H | H | H | H | - | L | H | H | H | H | H | H | H | H |
| AtMCH9.1 (28,5) | L | L | L | | L | L | L | | L | L | H | L | L | | L | L | L | L | L | L | L | L | L |
| <i>UCU2</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| AtMSD21.1 (29,1) | L | L | L | | L | L | L | L | L | L | L | L | L | | L | L | L | L | L | L | L | L | L |
| AtMZN24.2 (29,2) | | | | | | | | | H | | | | | | H | | | | | | | | |
| AtMWI23.1 (30,1) | | | | L | | | | | H | | | | | L | H | | | | | | | | |
| AtDMC1 (32,7) | L | L | L | H | L | L | L | H | L | L | L | L | L | H | H | L | L | L | L | L | L | L | L |
| Hechos de recombinación | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

| Marcador | Genotipo de los individuos analizados | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|---------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|
| | 200 | 203 | 208 | 216 | 258 | 259 | 313 | 325 | 347 | 398 | 413 | 435 | 448 | 455 | 472 | 489 | 499 | 505 | 541 | 544 | 567 | 581 | 595 | 601 | |
| nga162 (20,6) | H | H | H | H | L | L | L | L | L | - | L | | | | | | | | | | | | | | |
| AtMCH9.1 (28,5) | L | L | L | L | | | | | | | | L | L | L | L | L | L | H | L | L | L | L | L | - | H |
| <i>UCU2</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| AtMSD21.1 (29,1) | L | L | L | L | | L | L | L | L | L | L | L | L | - | L | L | H | L | L | L | L | L | L | L | |
| AtMZN24.2 (29,2) | | | | | | | | H | H | L | | | | | | H | | H | H | | | | | | |
| AtMWI23.1 (30,1) | | | | | L | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | L | H | H | H | H | L | |
| AtDMC1 (32,7) | L | L | L | L | H | H | H | H | H | H | H | | | | | | | | | | | | | | |
| Hechos de recombinación | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | |

Se siguen las pautas definidas en la Tabla 22, en la página 131. Se ha sombreado la parte relevante del genotipo de aquellos individuos merced a los cuales hemos podido delimitar la región en la que se encuentra *UCU2*.

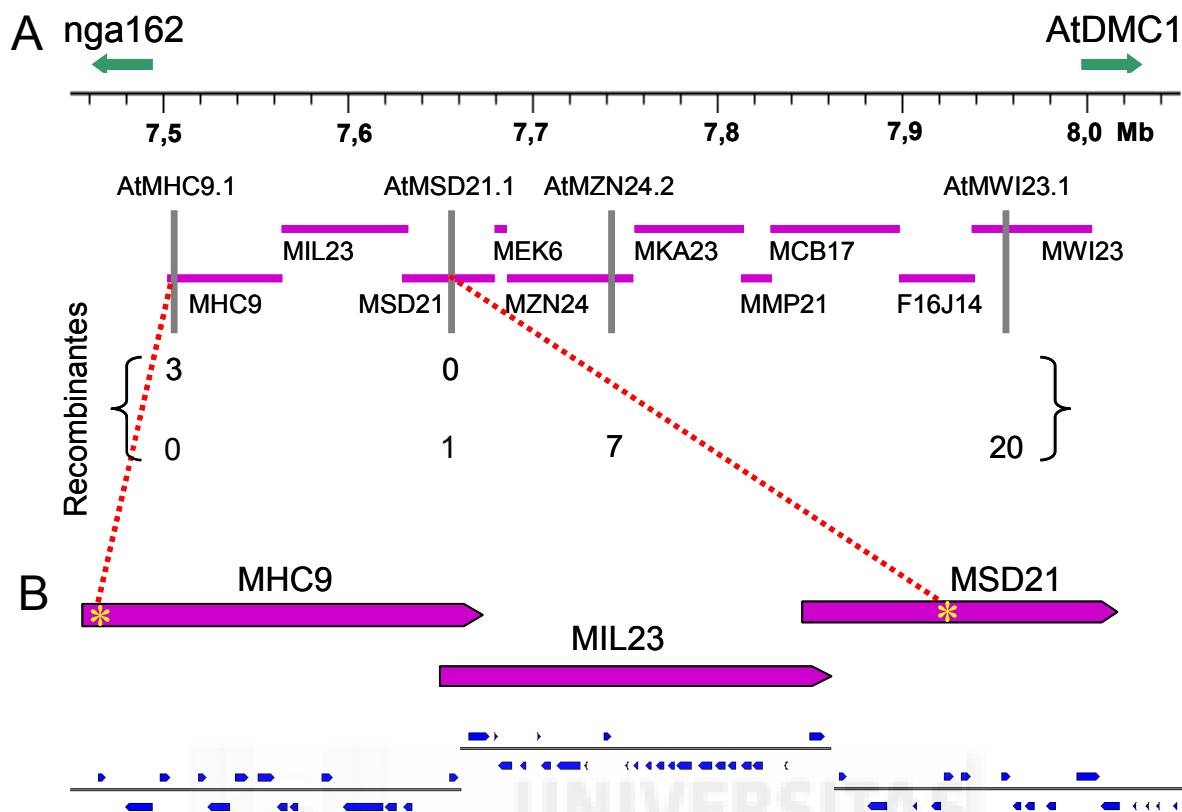


Figura 44.- Cartografía de alta resolución del gen *UCU2*. Se representan, de arriba abajo, las etapas del proceso. (A) Mapa físico de la región candidata a contener a *UCU2*. Se indican los marcadores que resultaron informativos y el número de recombinantes encontrados. (B) Cóntigo de clones candidatos a contener a *UCU2*. En la parte inferior de la figura, el sentido de las flechas azules indica el de la transcripción de cada presunto gen.

IV.4.2.2.- Estudio de la región candidata

IV.4.2.2.1.- Secuenciación de genes candidatos

La secuencia nucleotídica de la región de 165 kb que contiene a *UCU2* ha sido publicada y anotada (<http://mips.gsf.de/proj/thal/db/index.html>). Para la búsqueda y el análisis de genes candidatos en esta región hemos elegido aquéllos que eran inequívocamente semejantes a otros descritos previamente (Tabla 33).

Tal como se ha comentado en apartados anteriores, hemos demostrado que el gen *UCU1* cifra una quinasa de serina y treonina homóloga a las de la familia de SHAGGY y GSK3 de los metazoos (véase el apartado IV.3.2.3, en la página 138; Pérez-Pérez *et al.*, 2002), que participan en la ruta de transducción de la señal de Wingless/Wnt (Moon *et al.*, 2002). Dada la semejanza fenotípica entre los mutantes *ucu1* y *ucu2*, hemos buscado en la región candidata a contener a *UCU2* genes homólogos de los que interaccionan con SHAGGY y GSK3 o que participan en la ruta de Wingless/Wnt.

Nuestro candidato más obvio fue el gen *At3g21650*, en el clon MIL23, que cifra la subunidad reguladora B' de la fosfatasa de proteínas 2A (PP2A B', también llamada AtB' ζ ; Terol *et al.*, 2002), que presenta un 54% de identidad y un 71% de semejanza con la subunidad B56 de la fosfatasa de proteínas 2A de *Homo sapiens* (NP_006236), que participa en la inhibición de la señal de Wingless/Wnt al degradar a la β -catenina (Seeling *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2001b). Los resultados obtenidos en experimentos de inmunoprecipitación sugieren que B56 forma parte del complejo de degradación de la β -catenina, en el que también participa GSK3- β (Li *et al.*, 2001b).

Tabla 33.- Presuntos genes identificados en la región candidata a contener a *UCU2*

| Clon | Posición (pb) | Gen | Función atribuida al producto génico |
|---------------|------------------|--|---|
| MHC9 | 8.329-12.418 | <i>At3g21340</i> | Presunta quinasa de serina y treonina |
| | 20.767-24.060 | <i>At3g21370</i> | Presunta beta-glucosidasa |
| | 54.048-54.356 | <i>At3g21460</i> | Presunta glutarredoxina |
| | 58.661-57.450 | <i>At3g21465</i> | Presunta adenilato ciclasa |
| MIL23 | 13.899-11.524 | <i>At3g21500</i> | Presunta 1-D-desoxixilulosa 5-fosfato sintetasa |
| | 16.131-17.236 | <i>At3g21510</i> | Mediador del fosforrelé de dos componentes |
| | 23.799-28.555 | <i>At3g21540</i> | Proteína con repeticiones WD |
| | 33.583-35.073 | <i>At3g21560</i> | Presunta UDP-glucosa:indol-3-acetato beta-D-glucosiltransferasa |
| | 56.230-53.243 | <i>At3g21630</i> | Receptor con actividad quinasa de proteínas |
| | 56.725-58.797 | <i>At3g21640</i> | Presunta peptidil-prolil <i>cis-trans</i> isomerasa |
| | 59.380-61.112 | <i>At3g21650</i> | Presunta subunidad reguladora B' de la PP2A |
| MSD21 | 62.195-64.354 | <i>At3g21660</i> | Presunta proteína reguladora de la ubiquitina |
| | 64.642-66.654 | <i>At3g21670</i> | Transportador de nitrato |
| | 76.450-79.561 | <i>At3g21690</i> | Presunta proteína integral de membrana |
| | 3.174-1.565 | <i>At3g21700</i> | Presunta proteína G monomérica SGP1 |
| | 9.773-12.732 | <i>At3g21720</i> | Presunta isocitrato liasa |
| | 22.970-21.549 | <i>At3g21750</i> | Presunta UDP-glucosa glucosiltransferasa |
| 25.540-24.083 | <i>At3g21760</i> | Presunta UDP-glucosa glucosiltransferasa | |

Se representan algunos de los presuntos genes de la región candidata a contener a *UCU2*, que corresponde a los clones BAC MHC9, MIL23 y MSD21, delimitada por los marcadores AtMHC9.1 y AtMSD21.1.

IV.4.2.2.2.- Identificación de mutaciones en la estirpe *ucu2-3*

Se diseñaron dos parejas de oligonucleótidos (SeqMIL231F y SeqMIL231R, y SeqMIL232F y SeqMIL232R; Tabla 34 y Figura 45) para la amplificación de dos segmentos parcialmente solapantes que cubren una región de 2.771 pb del gen *At3g21650*, que incluye dos exones, de 1.254 y 387 pb, y las secuencias que los

flanquean. No obtuvimos ningún producto de amplificación con estas parejas de cebadores utilizando como molde ADN genómico de las plantas *ucu2-1/ucu2-1* y *ucu2-2/ucu2-2*, a pesar de haber realizado varios intentos de optimizar las condiciones de reacción. Por el contrario, sí se obtuvieron los productos de amplificación esperados a partir del ADN genómico de plantas silvestres *Ler* y *Col-0*, así como de *ucu2-3/ucu2-3*.

Tabla 34.- Oligonucleótidos utilizados para la amplificación y ulterior secuenciación de segmentos solapantes de la región candidata a contener a *UCU2*

| Oligonucleótido | Posición en MIL23 (pb) | Secuencia nucleotídica (5'→3') |
|------------------|------------------------|--------------------------------|
| SeqMIL23.16R | 51.854-51.875 | TTCAGTGTGATGATAGCTCG |
| SeqMIL23.9R | 53.066-53.087 | ACGTGAGATGCTGATATCGGAG |
| SeqMIL23.14R | 54.096-54.116 | AGTTGCTGAACCTCCAACCTTC |
| SeqMIL23.9F | 54.161-54.180 | TTTGTACCGCTCTGAGTCG |
| SeqMIL23.10R | 54.661-54.682 | CAGGTTGACATGATGTACACGC |
| SeqMIL23.14F | 54.727-54.747 | GCTGCGATTAAGAAGATGGAC |
| SeqMIL23.15R | 55.642-55.665 | GATTATATCTCTGCAGAATATCCG |
| SeqMIL23.13F | 55.692-55.712 | TCCTGAAGACAGTCTCAGTTC |
| SeqMIL23.8R | 56.147-56.168 | GCTAGTCCTGCACTTAGATTCC |
| SeqMIL23.4R | 56.671-56.691 | GGTAGATCTTTCACGTTGGTC |
| SeqMIL23.15F | 56.671-56.692 | AGACCAACGTGAAAGATCTACC |
| SeqMIL23.6R | 56.731-56.751 | TGCTTTAACTCTGTGGCGTCG |
| SeqMIL23.3R | 57.051-57.073 | TCAACACCTGATAAGGTTTTGAG |
| SeqMIL23.4F | 57.150-57.170 | GAAGCAATTGGTCACTGCAAC |
| SeqMIL23.5R | 57.931-57.952 | ATGGGCTAATCAGCATTGAAGC |
| SeqMIL23.6F | 58.144-58.165 | AACTCGCAGCACAAATTTGAGG |
| SeqMIL23.2R | 58.419-58.439 | CTCTTGAGATGGCTCACTATG |
| SeqMIL23.3F | 58.510-58.533 | TAAGAATTGAGAATGACTATTGGG |
| SeqMIL23.10F | 59.091-59.111 | TCTTCGTGAGTGACTTCGACG |
| SeqMIL23.5F | 59.352-59.374 | TCTCGTAGGTTACTATGTACTIONG |
| SeqMIL23.PP2Ac2R | 59.697-59.718 | CTTTATGGTTCTGAGTGATCAG |
| SeqMIL23.1R | 59.750-59.771 | AATGCTCTTTCAGCAACCTGAC |
| SeqMIL23.2F | 59.832-59.854 | GAGTCTTTGACTATCATCACAAC |
| SeqMIL23.PP2Ac2F | 60.084-60.105 | TTCATCAGTCTATCACCAACAG |
| SeqMIL23.13R | 60.836-60.856 | ACGGTCCAGCTTGTACAACAG |
| SeqMIL23.1F | 61.167-61.189 | ACATACTCACAGCTGGTTTTTAG |
| SeqMIL23.11R | 62.231-62.251 | AGCCTTCTCGATGGTTTGGTC |
| SeqMIL23.8F | 62.316-62.337 | GCTTCATAGACACGTCTAGACC |
| SeqMIL23.12R | 62.922-62.943 | AGCTGAATCAGTTTCTCCAGAC |
| SeqMIL23.11F | 62.960-62.982 | GTCAGCTATAGAAAGATCTGAGC |
| SeqMIL23.16F | 63.613-63.633 | TTCTCGTTTACCCAGAAATCG |
| SeqMIL23.12F | 64.329-64.348 | GTAACTCGCCGGAGACGAC |

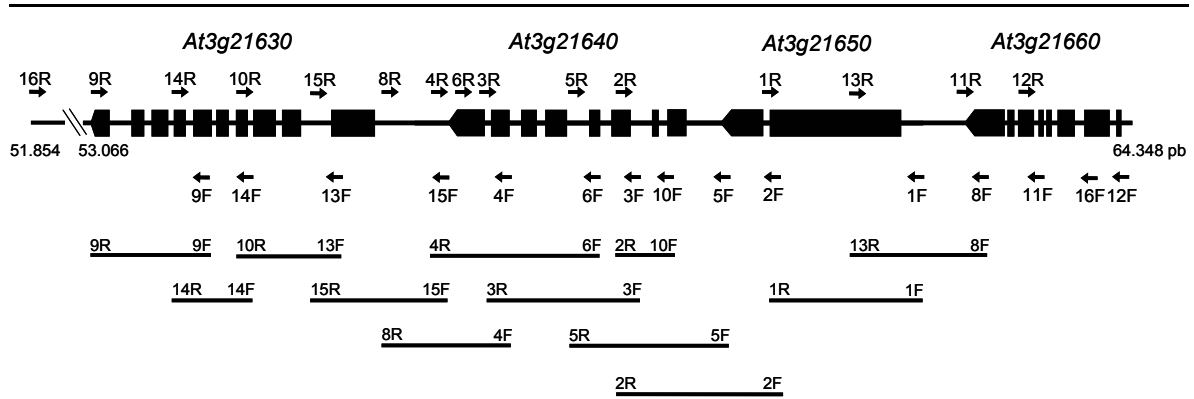


Figura 45.- Estructura de la región candidata a contener a *UCU2*, que hemos secuenciado en el mutante *ucu2-3* y su ancestro silvestre Col-0. Los rectángulos negros representan a los exones y las flechas a los cebadores utilizados y su orientación. Se indica únicamente la parte diferencial del nombre de cada oligonucleótido (sus nombres completos aparecen en la Tabla 34). En la parte inferior de la figura se representan los productos de amplificación a partir de los cuales se obtuvo la secuencia nucleotídica de esta región en el mutante *ucu2-3*, con indicación, en sus extremos, de los cebadores empleados.

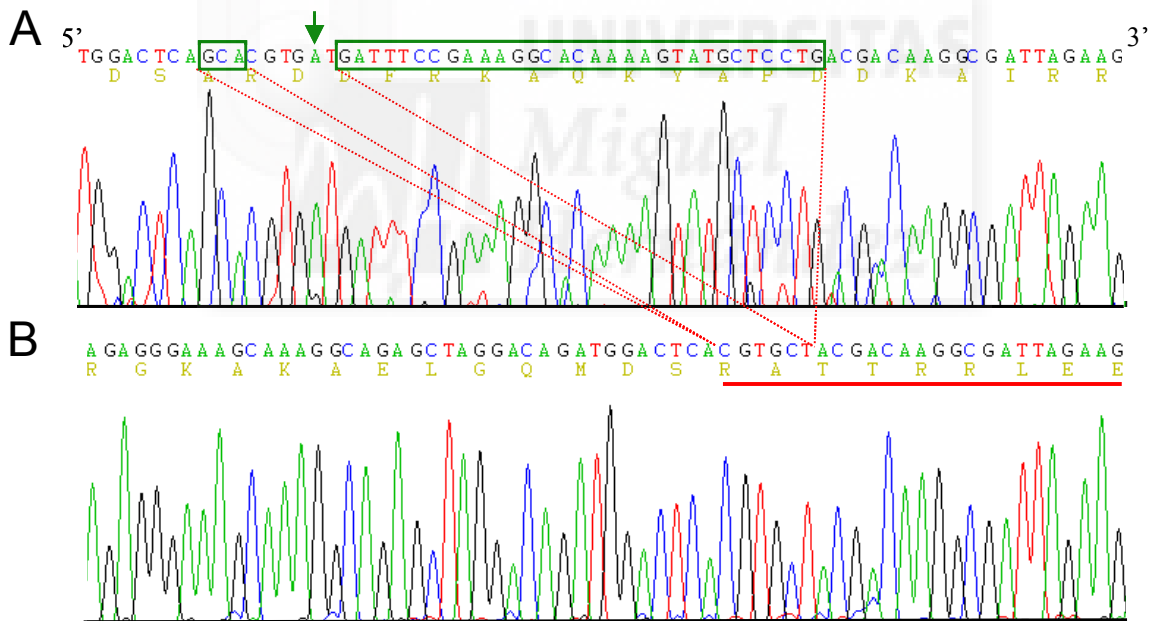


Figura 46.- Naturaleza estructural de la mutación *ucu2-3*. Se representan dos electroforegramas parciales correspondientes a las secuencias nucleotídicas del gen *At3g21640* en la estirpe silvestre Col-0 (A) y en una planta *ucu2-3/ucu2-3* (B). Los recuadros verdes indican las regiones ausentes en el ADN del mutante y la flecha destaca un cambio de base. En la secuencia peptídica deducida se subrayan en rojo los aminoácidos que son distintos de los silvestres en el mutante *ucu2-3*.

Hemos obtenido la secuencia nucleotídica de estos dos segmentos solapantes (véase el apartado III.9 de Materiales y Métodos, en la página 84) sin encontrar diferencia alguna entre la del mutante *ucu2-3/ucu2-3* y la de su ancestro silvestre Col-0.

Los resultados comentados en el párrafo anterior indican la existencia de una delección en la región que contiene al gen *At3g21650* en los mutantes *ucu2-1* y *ucu2-2*, pero lo excluyen como candidato a ser *UCU2*, dado que está indemne en *ucu2-3*. Hemos diseñado varias parejas adicionales de oligonucleótidos (Tabla 34 y Figura 45) para amplificar varios segmentos solapantes, que cubren unas 11,3 kb de la región candidata, que incluye cuatro genes: (a) *At3g21630*, que cifra una presunta quinasa de proteínas, (b) *At3g21640*, cuyo producto es una isomerasa de la subfamilia FKBP de las inmunofilinas, (c) *At3g21650*, que cifra la presunta subunidad reguladora B' de la PP2A, y (d) *At3g21660*, que cifra una presunta proteína reguladora de la ubiquitina. Hemos amplificado y secuenciado una región de 9.271 pb (véase el apartado III.9, en la página 84) comprendida entre las posiciones 53.066 y 62.337 pb del clon MIL23, que incluye las unidades de transcripción de los genes *At3g21630*, *At3g21640* y *At3g21650* (Figura 45), a partir del ADN genómico de *Ler*, Col-0 y *ucu2-3/ucu2-3*.

Hemos encontrado en el mutante *ucu2-3* un pequeño reordenamiento de 40 pb, en el último exón del gen *At3g21640*. La mutación incluye dos delecciones, de 3 y 31 pb, separadas por 6 pb, una de las cuales presenta además un cambio de base (Figura 46). La delección de 34 pb que genera este reordenamiento en *At3g21640* altera su pauta de lectura e introduce un codón de terminación prematuro que elimina 84 aminoácidos del extremo carboxilo de *UCU2* en el mutante *ucu2-3/ucu2-3*, que son sustituidos por 48 aminoácidos distintos a los silvestres (Figura 46B).

A pesar de nuestros repetidos intentos de amplificación de esta región utilizando ADN genómico de los otros dos mutantes, *ucu2-1/ucu2-1* y *ucu2-2/ucu2-2*, no hemos obtenido los productos correspondientes a los genes *At3g21640* y *At3g21650* (véase la Figura 45, en la página 158). Tampoco hemos obtenido ningún producto de amplificación a partir del ADN genómico de estos dos mutantes utilizando los cebadores SeqMIL23.16F y SeqMIL23.16R (Tabla 34 y Figura 45), situados en los extremos de la región de 11,3 kb que incluye los genes *At3g21630*, *At3g21640*, *At3g21650* y *At3g21660*.

IV.4.2.2.3.- Análisis de Southern de la región candidata

Hemos llevado a cabo un análisis de Southern para contrastar la hipótesis de la existencia de una reorganización en la región candidata a contener a *UCU2* en los

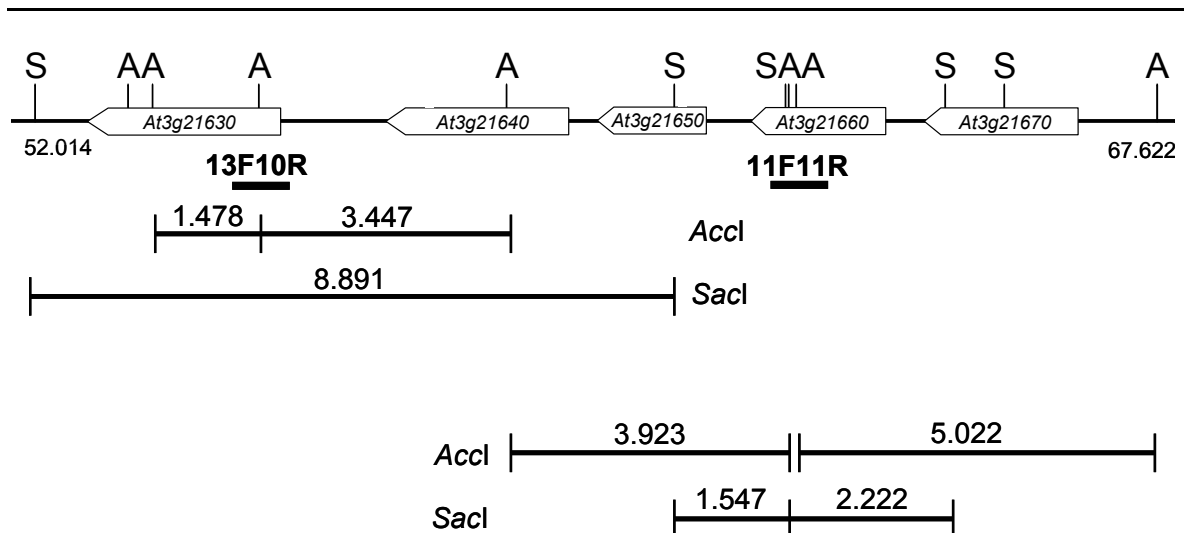


Figura 47.- Representación esquemática de la región candidata a contener a *UCU2*. En la parte superior de la figura se indican las dianas para las enzimas de restricción que se utilizaron en el análisis de Southern (S, *SacI*; A, *AccI*), los genes que contiene esta región y la orientación de su transcripción. En la parte inferior de la figura se destacan los fragmentos de restricción que se detectarían tras la hibridación del ADN genómico silvestre con las sondas 13F10R y 11F11R. Todos los valores numéricos indican pb. Para una explicación más detallada, véase el texto.

mutantes *ucu2-1* y *ucu2-2*, tal como sugerían los resultados obtenidos en el apartado anterior. Para ello, hemos sintetizado dos sondas de ADN que hemos denominado 11F11R y 13F10R (Figura 47; véase el apartado III.10.2 de Materiales y Métodos, en la página 87), mediante amplificación por PCR con cebadores diseñados de acuerdo con la secuencia de la región 5' del gen *At3g21630* (SeqMIL23.11F y SeqMIL23.11R) y la 3' de *At3g21660* (SeqMIL23.13Fy SeqMIL23.10R) (véase la Tabla 34, en la página 157).

En la Figura 47 se representa la región candidata a contener a *UCU2*, indicándose las posiciones de las dianas de las enzimas de restricción que hemos empleado y los tamaños de los fragmentos de restricción esperados a partir del ADN genómico silvestre. El ADN genómico de plantas *Ler*, *ucu2-1/ucu2-1*, *ucu2-2/ucu2-2* y *ucu2-3/ucu2-3* fue digerido con *SacI* y *AccI*, por separado, sometido a electroforesis en un gel de agarosa y posteriormente transferido a membrana, según se indica en el apartado III.10.1 de Materiales y Métodos, en la página 86. La membrana fue hibridada sucesivamente con las sondas 13F10R y 11F11R (véanse los apartados III.10.3 y III.10.4 de Materiales y Métodos, en la página 88), obteniéndose finalmente los resultados que muestra la Figura 48, que sugieren que la mutación *ucu2-1* es una delección de 6 kb que elimina totalmente a los genes *At3g21660*, *At3g21650* y parcialmente a *At3g21640*. Por su parte, *ucu2-2* parece ser una delección de los genes *At3g21650* y *At3g21640* y de parte de

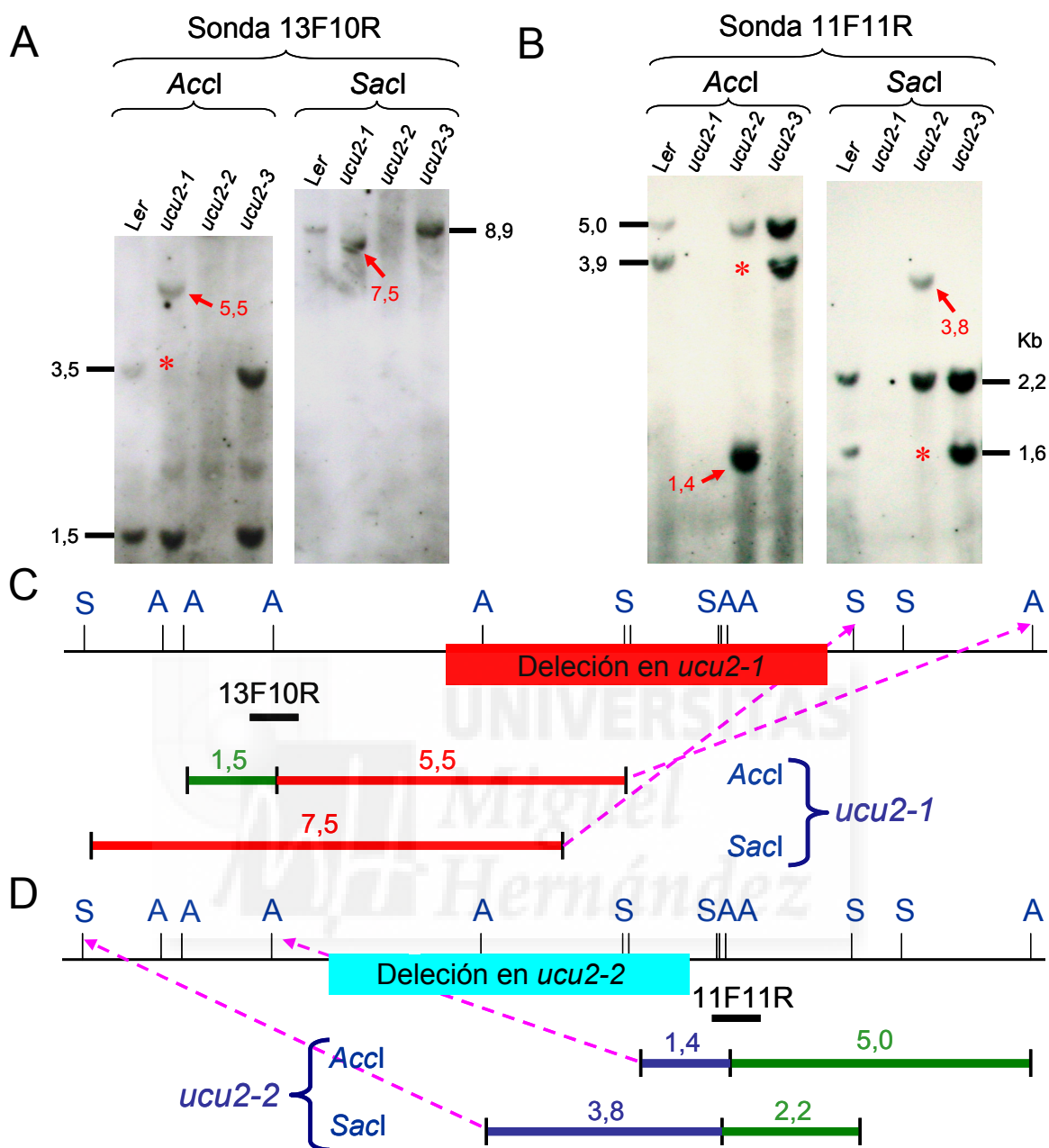


Figura 48.- Análisis de Southern del ADN genómico de los mutantes *ucu2* y la estirpe silvestre *Ler*, tras su digestión con *AccI* y *SacI*. Las diferencias entre los patrones de bandas que se comparan se destacan con asteriscos y flechas, que corresponden respectivamente a los fragmentos de restricción silvestres de los que carece un mutante, y viceversa. (C-D) Interpretación de los resultados del análisis de Southern. En el mapa físico de la región candidata a contener a *UCU2* se indican en verde los fragmentos de restricción comunes al tipo silvestre y los mutantes, y en rojo y en azul, respectivamente, los que corresponden exclusivamente a *ucu2-1* y *ucu2-2*. Las flechas de color magenta indican las dianas de restricción que permitirían explicar la presencia de los fragmentos específicos de los mutantes. Todos los valores numéricos indican kb.

At3g21660. Considerados en conjunto con los del apartado IV.4.2.2.2, en la página 156, estos resultados indican que *UCU2* es *At3g21640*, el único gen que presenta daños estructurales en las tres estirpes mutantes estudiadas.

IV.4.2.2.4- Análisis de la expresión de los genes candidatos

La transcripción del gen *At3g21630* puede visualizarse mediante amplificación por RT-PCR (véase el apartado III.7.3 de Materiales y Métodos, en la página 82), utilizando para ello los cebadores SeqMIL23.14F y SeqMIL23.14R (véanse la Tabla 34 y la Figura 45, en las páginas 157 y 158, respectivamente), lo que rinde un producto de 384 pb a partir del ARN silvestre. Este gen se transcribe tanto en las plantas *ucu2-1/ucu2-1* y *ucu2-3/ucu2-3* como en sus ancestros silvestres. En las plantas *ucu2-2/ucu2-2*, por el contrario, no hemos obtenido productos de RT-PCR a partir de su ARN, ni de PCR a partir de su ADN genómico, lo que confirma la delección de *At3g21630*.

En lo que respecta a *At3g21640*, hemos empleado los cebadores SeqMIL23.10F y SeqMIL23.2R, por un lado, y SeqMIL23.4F y SeqMIL23.4R, por otro (véanse la Tabla 34 y la Figura 45, en las páginas 157 y 158, respectivamente), que rinden productos de 160 y 411 pb, respectivamente, cuando se utiliza ADNc de la estirpe silvestre como molde. Ninguno de estos productos se obtuvo a partir de ARN o ADN genómico de las plantas *ucu2-2/ucu2-2*. Tampoco hemos logrado la amplificación de ninguno de estos dos productos a partir del ADNc de *ucu2-1/ucu2-1*, lo que indica que este gen no se expresa en este mutante.

Mediante amplificaciones llevadas a cabo con los cebadores SeqMIL23.4F y SeqMIL23.4R (véanse la Tabla 34 y la Figura 45, en las páginas 157 y 158, respectivamente), hemos podido comprobar que la delección de *ucu2-3* no altera la transcripción de *At3g21640* ni presumiblemente la estabilidad de su ARNm, que es más corto que el silvestre (Figura 49). Hemos amplificado el gen *At3g21650* y sus transcritos con la pareja de cebadores SeqMIL23.PP2Ac2F y SeqMIL23.PP2Ac2R (véanse la Tabla 34 y la Figura 45, en las páginas 157 y 158, respectivamente), que rinden productos de 409 y 317 pb, respectivamente. Hemos obtenido los productos esperados al utilizar ADNc del silvestre y del mutante *ucu2-3* como molde. Sin embargo, no hemos obtenido ningún producto al utilizar como molde ADNc de *ucu2-1/ucu2-1* y *ucu2-2/ucu2-2*. Estos resultados demuestran que la expresión de *At3g21650*, que cifra la subunidad reguladora B' de la PP2A, está alterada en las plantas *ucu2-1/ucu2-1* y *ucu2-2/ucu2-2*, pero no en las *ucu2-3/ucu2-3*.

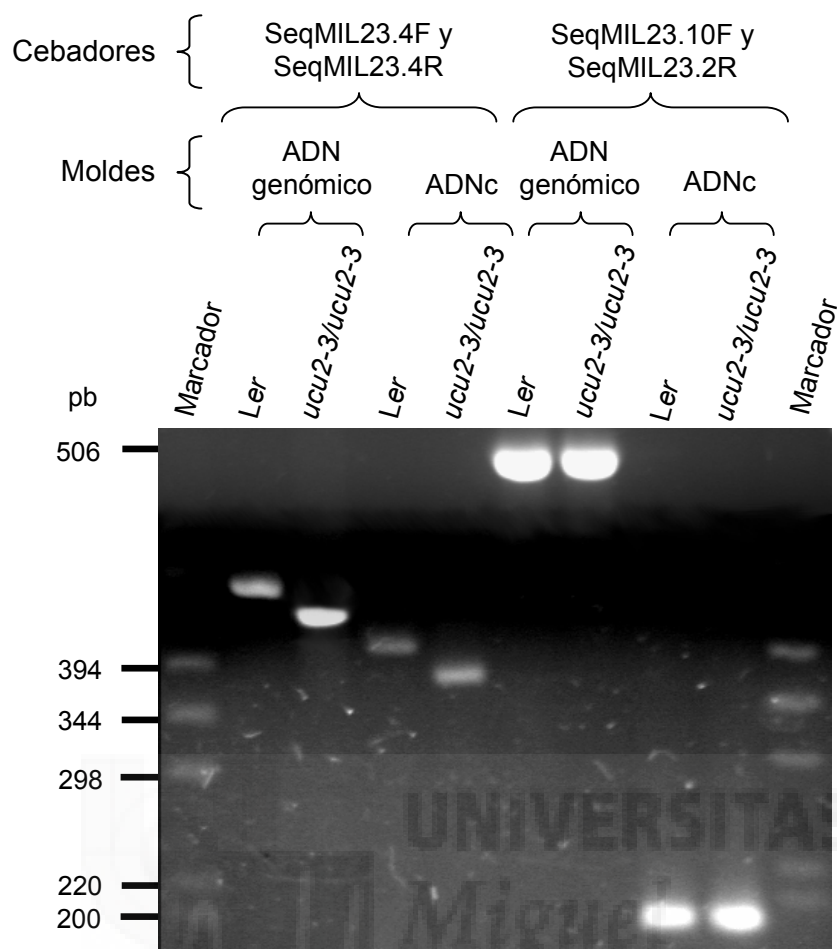


Figura 49.- Análisis de la expresión del gen *At3g21640* en el mutante *ucu2-3* y su ancestro silvestre. La imagen corresponde a la visualización, en un gel del 1% de agarosa teñido con bromuro de etidio, de los productos de amplificación obtenidos por PCR empleando los cebadores y los moldes que se indican.

IV.4.2.3.- Caracterización del gen *UCU2*

La pauta de lectura abierta del gen *At3g21640* comprende 1.071 pb y 7 exones, cuyo tamaño varía desde las 36 pb del segundo hasta las 332 del último. Este gen cifra una proteína de 356 aminoácidos y 41 kDa. Estos datos del MIPS (<http://www.mips.biochem.mpg.de/>) difieren de los del GenBank, en donde se afirma que la proteína AJ224640 tiene 365 aminoácidos y 42 kDa. Esta discrepancia parece deberse a un error en la identificación del sitio de procesamiento del segundo intrón de *At3g21640*. La proteína es muy similar a las isomerasas *cis/trans* de prolina (también llamadas PPlasas o rotamasas, E.C. 5.2.1.8; Schiene-Fischer y Yu, 2001) de la subfamilia de las inmunofilinas, a las que se une la droga inmunosupresora FK506 (*FK506-binding proteins*, FKBP). Las FKBP participan en la modificación postraduccional

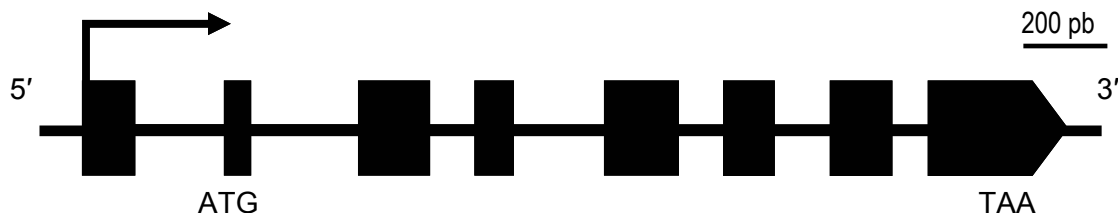
A

1 ... AATCAA AATCTGAAAT TTATCTCTCG GTCGATCCAG TCTTCGTGAG TGACTTCGAC GACGACGAC AGTCACACTA
77 CTCTTGAGCT TCTCATACTT CACCCAGGTT GATTTGGGAA ATA ATG GAT GAA TCT CTG GAG CAT CAA ACT CAA
M D E S L E H Q T Q
150 ACA CAT G GTA AGTAAATTT CATAGATTA ATCTCTCTGA ATACATATAT ATGACTTCAA TATGTTTGAT
T H
220 TGGAGTTTTT TTGTTGTCCT ATATTCAATF GGATGCTTTG TTAAAGGATA AATGTCTATC AAATTATGTT GACTGCGTTA
300 TTCTTTCTAA ATCATATTTG GAATCTTGGA ACAAAGCATG TATACAACAA ATTTGTTAGA CTTGATAACT CCTTTTCTGT
380 TTGTTAAGAA TTGAGAATGA CTATTGGGGT TGACTAATGC ATCTTTTGTG GCTCCAG AC CAA GAG AGC GAA ATA
D Q E S E I
454 GTT ACT GAA GGA AGT GCC GTT GTG CAT AGT GAG CCA TCT CAA GAG GGT AAT GTT CCT CCT AAA GTT
V T E G S A V V H S E P S Q E G N V P P K V
520 GAT AGT GAA GCT GAG GTC TTG GAT GAG AAA GTC AGT AAG CAG ATT ATA AAG GAA GGT CAC GGT TCC
D S E A E V L D E K V S K Q I I K E G H G S
586 AAA CCA TCC AAG TAC TCT ACA TGC TTT T GTAAGT ACCCTTTAGC TTTCTGTTGA TTGGATGTTG ATTTTTCGAT
K P S K Y S T C F
660 TGCATTGTT GGCTATTGC TACTGTTTAT TTGAATCTTT CTATCTGACC AATTTTCATAT TGGCCATAG TG CAC TAC
L H Y
737 AGG GCA TGG ACC AAA AAC TCG CAG CAC AAA TTT GAG GAT ACA TGG CAT GAG CAG CAA CCT ATT GAA
R A W T K N S Q H K F E D T W H E Q Q P I E
803 TTG GTT CTT GGA AAA G TATGTGGCTG TCGAATATGT ACTCTACACC TATGTGGCTG TCGAATATGT ACTCTACACC
L V L G K
879 TCCATTTCTG TAGATGAATC GTCATTGGTA AATTTGATGA GTTAGCTTGT GTATTATATG AACCCAATGA GATGGATATT
959 TGGGAGGAAA AAAGATTGAG TTTTGTATTT TTTTGTCTTC AATGCTGATT AGCCCATTTT AACGTCACATA TACAATTTTT
1039 TTTATAAAAA AGATTGTGCA CTAAGAGTGA AATGTTGTCT GTGAGACAG
1088 AG AAA AAA GAA CTA GCC GGT TTA GCC ATC GGT GTT GCT AGC ATG AAG TCT GGT GAA CGT GCG CTT
E K K E L A G L A I G V A S M K S G E R A L
1154 GTG CAT GTT GGC TGG GAA TTA GCT TAT GGG AAA GAA GGA AAC TTT TCT TTT CCG AAT GTT CCA CCT
V H V G W E L A Y G K E G N F S F P N V P P
1220 ATG GCA GAC TTG TTA TAT GAG GTG GAA GTT ATT GGG TTT GAT GAA ACA AAG GAG GTAAGT
M A D L L Y E V E V I G F D E T K E
1280 TATTTCTAT ACCATCATCT TGTTCCTTA CCAAGACGAC TCCACATCCA AGCTTTATCC CAACCTCCTT GCTTACCTCT
1360 CTGACTTAGA TGATGTATTG AACAG GGA AAA GCT CGC AGT GAT ATG ACT GTA GAG GAA AGG ATT GGT GCA
G K A R S D M T V E E R I G A
1430 GCA GAC AGA AGA AAA ATG GAT GGG AAT TCT CTT TTT AAG GAG GAG AAA CTG GAG GAA GCC ATG CAA
A D R R K M D G N S L F K E E K L E E A M Q
1496 CAG TAT GAA ATG GT TATGCATCTC TCTCTATCTC TATCTCTCTT TCCAACAATT ACGGTCAAAG TTTAGGTTTT
Q Y E M
1570 CAGGCATACT TAGTGAGTCT GCTCGAGGCT CTTGTGTCTT CTTTCGGCTT TTGATTAGTC ATGGTTTTGC TGTTCAG
1648 GCC ATA GCA TAC ATG GGG GAC GAT TTT ATG TTT CAG CTG TAT GGG AAG TAC CAG GAT ATG GCT TTA
A I A Y M G D D F M F Q L Y G K Y Q D M A L
1714 GCA GTT AAA AAC CCA TGC CAT CTT AAC ATA GCA GCT TGC CTC ATC AAA CTA AAA CGA TAC GAT GAA
A V K N P C H L N I A A C L I K L K R Y D E
1780 GCA ATT GGT CAC TGC AAC ATT GTAAGACTC ATCAAACCAT TCATTGGAAG AAAATCATTAA AAGTTCATAC
A I G H C N I
1850 TCGGTTTCTC GAAATCTAAT CAAACTCAAA ACCTTATCAG GTG TTG ACA GAA GAA GAG AAA AAC CCA AAA GCA
V L T E E E E K N P K A
1923 CTG TTC AGA AGA GGG AAA GCA AAG GCA GAG CTA GGA CAG ATG GAC TCA GCA CGT GAT GAT TTC CGA
L F R R G K A K A E L G Q M D S A R D D F R
1989 AAG GCA CAA AAG TAT GCT CCT GAC GAC AAG GCG ATT AGA AGA GAG CTA CGA GCA CTT GCA GAG CAA
K A Q K Y A P D D K A I R R E L R A L A E Q
2055 GAG AAA GCC TTG TAC CAA AAG CAG AAA GAA ATG TAC AAA GGA ATA TTC AAA GGG AAA GAT GAA GGT
E K A L Y Q K Q K E M Y K G I F K G K D E G

2121 *GGT GCT AAG TCA AAG AGC CTT TTT TGG TTG ATA GTG TTA TGG CAA TGG TTT GTT TCC CTT TTC*
 G A K S K S L F W L I V L W Q W F V S L F

2184 *TCC CGT ATC TTT CGA CGC CAC AGA GTT AAA GCA GAT TAA TGTATGAAG AAGGGTAACA ATTCAACTCT...*
 S R I F R R H R V K A D *

B



C

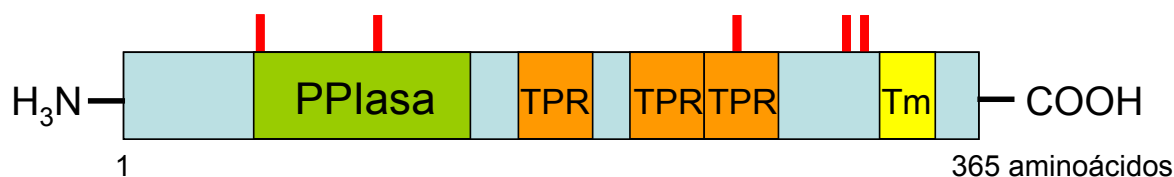


Figura 50.- Estructura del gen *UCU2* y su producto proteico. (A) Secuencias nucleotídica y peptídica del gen *UCU2*. Los nucleótidos se numeran a la izquierda y los exones se indican en cursiva. (B) Estructura de la unidad de transcripción del gen *UCU2*. Los rectángulos coloreados representan a los exones, y las líneas que los separan a los intrones. (C) Estructura de la proteína *UCU2* (AtFKBP42). TPR: repetición del tetratricopéptido. Tm: dominio transmembrana. Las líneas rojas indican puntos de N-miristilación.

y la estabilización de numerosas proteínas (Galat, 2000): El gen *UCU2* cifra una isomerasa de la subfamilia FKBP de las inmunofilinas de *Arabidopsis thaliana* (Figura 50).

El análisis bioinformático de la secuencia proteica deducida a partir de la nucleotídica de *UCU2* (Figura 50C) indica la existencia de un dominio de 99 aminoácidos con presunta actividad isomerasa (residuos 58 a 156). Hemos constatado la presencia de tres dominios del tipo denominado “repeticiones del tetratricopéptido”, entre los aminoácidos 179 y 212, 230 y 263, y 264 y 297, cuya presunta función es la de participar en la formación de complejos multiproteicos (Blatch y Lassel, 1999), así como cinco señales de modificación postraduccional por N-miristilación. La proteína contiene un dominio hidrofóbico, desde el residuo 338 al 357, cuya estructura de hélice α sugiere su integración en las membranas celulares. También hemos identificado secuencias de fosforilación por la quinasa de calmodulina II (CaMII) y las quinasas de caseína I y II (CKI y CKII), pero ninguna para la fosforilación por la quinasa GSK3- β , la ortóloga de *UCU1*.

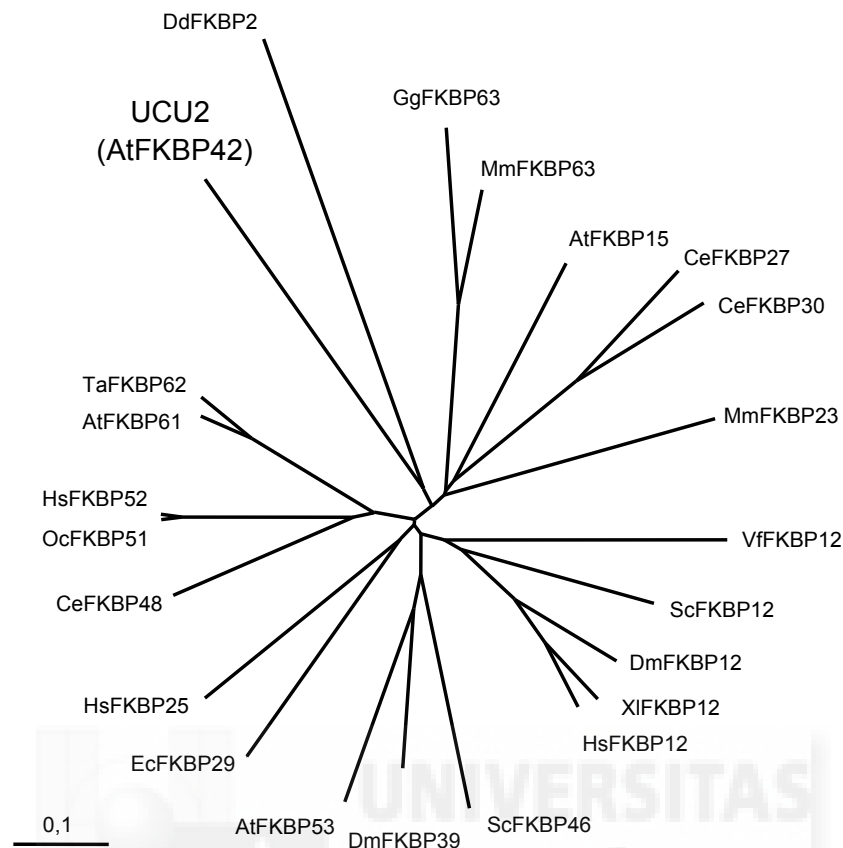


Figura 51.- Una hipótesis acerca de la relación filogenética entre algunos miembros representativos de la subfamilia FKBP de las inmunofilinas. La longitud de las ramas del árbol es proporcional a la distancia entre los miembros de la subfamilia. La barra de escala indica una distancia evolutiva de 0,1 sustituciones de aminoácidos por cada posición. Las proteínas se denotan con dos letras, que indican la especie a la que cada una de ellas corresponde, seguidas de su número de acceso (Ec: *Escherichia coli*; Sc: *Saccharomyces cerevisiae*; Dd: *Dictyostelium discoideum*; Ce: *Caenorhabditis elegans*; Dm: *Drosophila melanogaster*; At: *Arabidopsis thaliana*; Vf: *Vicia faba*; Ta: *Triticum aestivum*; Oc: *Oryctolagus cuniculus*; Xl: *Xenopus laevis*; Gg: *Gallus gallus*; Mm: *Mus musculus*; Hs: *Homo sapiens*).

La comparación de la secuencia proteica de UCU2 con las depositadas en las bases de datos del GenBank (Benson *et al.*, 2002; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>) mediante el programa BLASTP (Altschul *et al.*, 1997; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) nos ha permitido identificar algunos de sus ortólogos y sus regiones conservadas. UCU2 (AtFKBP42) presenta una semejanza del 50 y el 46%, y una identidad del 46 y el 28%, respectivamente, con las rotamasas FKBP1 [ROF1 (S72485); Vucich y Gasser, 1996] y PASTICCINO1 [PAS1 (AL132960); Vittorioso *et al.*, 1998], ambas de *Arabidopsis thaliana*. Su semejanza e identidad con otras FKBP son, respectivamente, del 50 y el

32% con la FKBP de 77 kDa del trigo (wFKPB77; T06489), y del 52 y el 29% con la FKBP de 59 kDa del ratón (AAH03447). Todas estas FKBP contienen tres dominios PPIasa, frente al único presente en UCU2. Esta última es además la única que presenta un dominio transmembrana y se ubica en la membrana plasmática y la vacuolar (Kamphausen *et al.*, 2002).

Hemos obtenido un alineamiento múltiple de las 23 FKBP más parecidas a UCU2, alineando únicamente uno de sus dominios catalíticos, y calculado la matriz de sus distancias mediante el programa CLUSTALX 1.5b (Thompson *et al.*, 1997; véase el apartado III.9.3.2 de Materiales y Métodos, en la página 86). En la Figura 51 aparece el árbol filogenético así obtenido, cuya representación gráfica se realizó con el programa TreeView 1.40 (Page, 1996; véase el apartado III.9.3.2 de Materiales y Métodos, en la página 86).

IV.4.2.3.1.- Construcción y transferencia de transgenes

Aplicando un razonamiento similar al expuesto en relación a *UCU1* en el apartado IV.3.2.3.5, en la página 147, hemos intentado confirmar mediante rescate fenotípico la identidad de *UCU2*. Para ello, hemos amplificado por PCR un segmento de 2.441 pb del gen *At3g21640*, que contiene íntegramente su región codificante, empleando los cebadores ClonMIL23.10F y ClonMIL23.4R (véanse el apartado III.11 de Materiales y Métodos, en la página 89, y la Figura 52) y el ADN plasmídico del clon BAC MIL23 como molde. Hemos digerido el producto de amplificación así obtenido con *KpnI* y *XbaI*, cuyas dianas están presentes en los extremos 5' de los oligonucleótidos empleados como

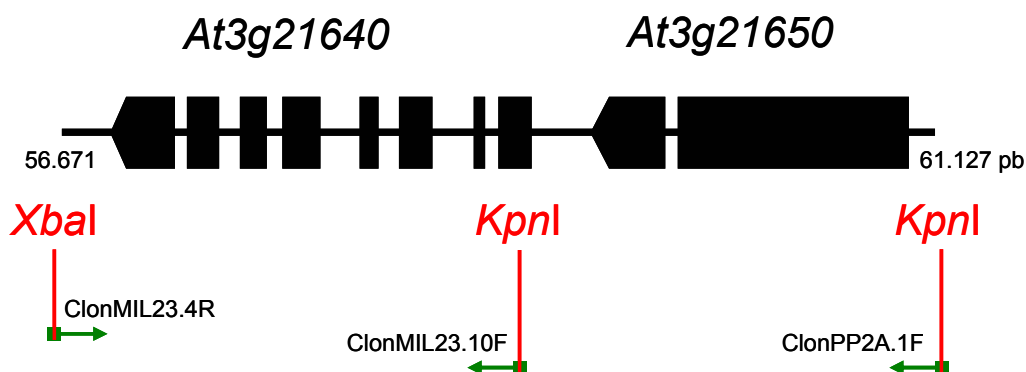


Figura 52.- Construcción de transgenes para el rescate fenotípico de los mutantes *ucu2*. Se representa la región del genoma de *Arabidopsis thaliana* que contiene a los genes *At3g21640* y *At3g21650*. Los rectángulos negros representan a los exones y las flechas verdes a los cebadores utilizados para la construcción de los transgenes. Se indican las dianas de restricción incluidas en el extremo 5' de los oligonucleótidos.

cebadores. El producto de esta restricción fue insertado en el vector pART7, previamente digerido con *KpnI* y *XbaI* (véanse los apartados III.6.4 y III.11 de Materiales y Métodos, en las páginas 80 y 89, respectivamente). El inserto quedó así flanqueado por el promotor 35S y el terminador *ocs*. Hemos empleado esta construcción para transformar células DH5 α de *Escherichia coli* (véase el apartado III.12.1.2 de Materiales y Métodos, en la página 92), aislando 45 presuntos transformantes, 15 de los cuales contenían el inserto esperado, según pudimos demostrar mediante su amplificación por PCR. Hemos aislado el ADN plasmídico de tres de estos clones, que fue digerido a continuación con *NotI*, cuyas dianas flanquean al promotor 35S y el terminador *ocs*, lo que libera el fragmento 35S:*At3g21640:ocs*, de unas 4,5 kb, que fue clonado en el vector binario pART27 (véase el apartado III.11 de Materiales y Métodos, en la página 89). La construcción resultante fue utilizada para transformar células DH5 α de *Escherichia coli*. Se comprobó, mediante amplificación por PCR con los cebadores ClonMIL23.10F y ClonMIL23.4R (Figura 52), que 13 de los 14 presuntos transformantes presentaban el inserto esperado, cuya integridad se confirmó posteriormente mediante restricción con *NotI* (Figura 53A-B). Con el ADN plasmídico de estos clones hemos transformado células C58C1 de *Agrobacterium tumefaciens* (véase el apartado III.12 de Materiales y Métodos, en la página 91), comprobando después mediante PCR que 8 de los 9 presuntos transformantes presentaban el inserto esperado.

Empleando los cebadores ClonPP2A.1F y ClonMIL23.4R (véanse el apartado III.11 de Materiales y Métodos, en la página 89, y la Figura 52), hemos amplificado un producto de 4.457 pb, que incluye la región codificante de los genes *At3g21650* y *At3g21640* las 682 pb que los separan. Procediendo según se indica en el párrafo anterior se obtuvo una construcción empleando el vector pART7, y se comprobó, mediante amplificación por PCR, que sólo 8 de los 44 presuntos transformantes obtenidos contenían un inserto que incluía a *At3g21640* y *At3g21650*. El ADN plasmídico de estos clones fue digerido con *NotI*, y el fragmento 35S:*At3g21650-40:ocs* se insertó en el vector pART27, tal como se indicó en el párrafo anterior. Hemos transformado células DH5 α de *Escherichia coli* con esta construcción y hemos aislado 19 presuntos transformantes, 14 de los cuales contenían el inserto esperado. La integridad de la construcción se confirmó mediante su digestión con *NotI* (Figura 53B), que separa el inserto del vector pART27. A continuación se transformaron células C58C1 de *Agrobacterium tumefaciens* con el ADN plasmídico procedente de estos clones y se aislaron 7 clones de *Agrobacterium tumefaciens* que contenían el inserto de los

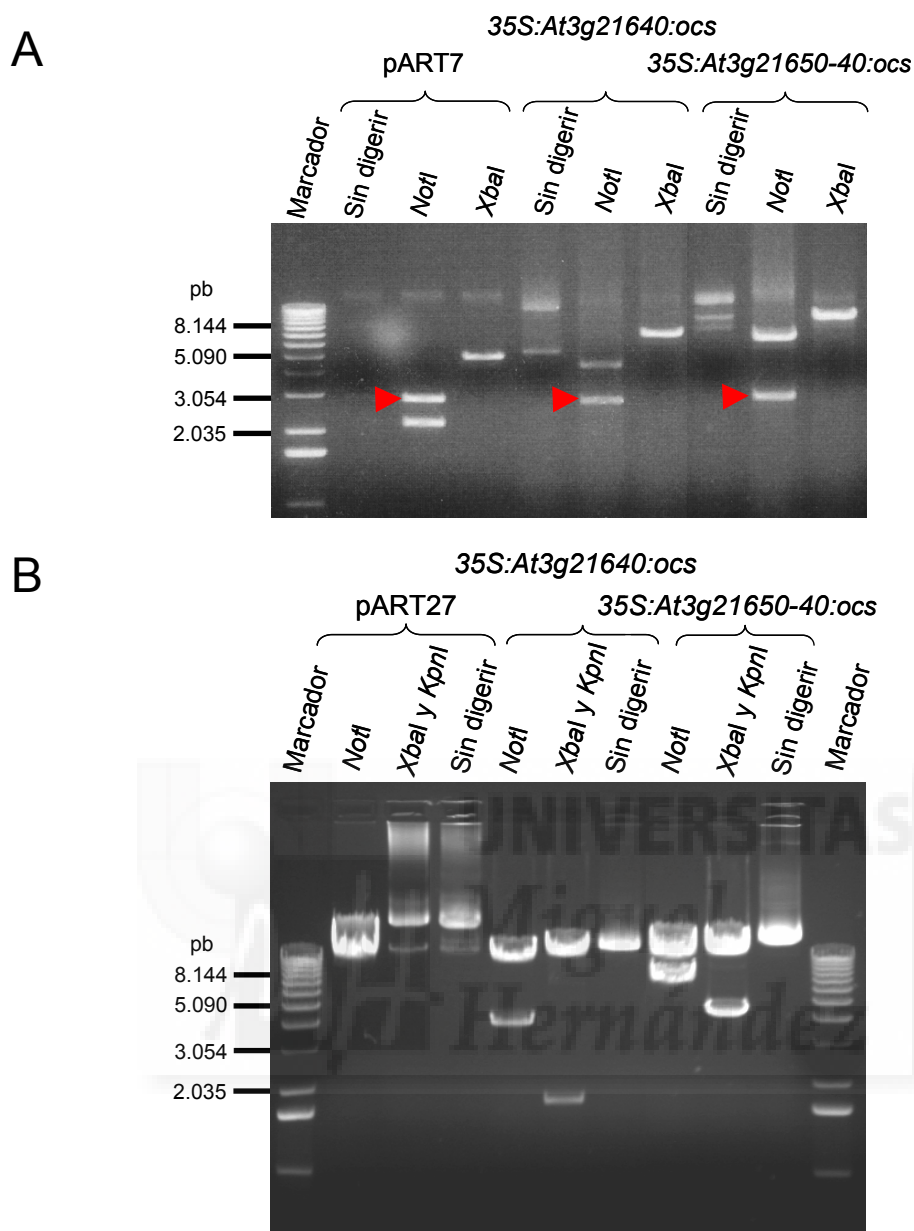


Figura 53.- Comprobación de la integridad de las construcciones diseñadas para el rescate fenotípico de los mutantes *ucu2*. La imagen representa la visualización, en un gel del 1% de agarosa teñido con bromuro de etidio, de los fragmentos obtenidos de la restricción de las construcciones. (A) Estudio de las construcciones obtenidas con el vector pART7. La digestión con *Xba*I lineariza la molécula y con *Not*I se separa el inserto del vector. Las puntas de flecha indican el fragmento de restricción que corresponde al vector. (B) Estudio de las construcciones obtenidas con el vector pART27. En este caso la digestión doble con *Xba*I y *Kpn*I separa el fragmento de ADN genómico clonado previamente en pART7.

9 presuntos transformantes. Hemos utilizado estos clones para la transformación *in planta* de *Arabidopsis thaliana* (véase el apartado III.12.2.1 de Materiales y Métodos, en la página 94). Se transformaron plantas *ucu2-3/ucu2-3* con dos clones de *Agrobacterium tumefaciens*, uno de los cuales contenía la construcción integrada por el vector pART27 y

el inserto *35S:At3g21640:ocs*, y otro que incorporaba el inserto *35S:At3g21650-40:ocs* y el vector pART27.

Tabla 35.- Segregación de la resistencia a kanamicina en plantas transgénicas obtenidas para el rescate fenotípico de los mutantes *ucu2*

| Transgén | T ₂ | T ₃ | | | | | |
|-----------------------------|----------------|-----------------------|------|----------|----------------------|------------------|----------|
| | | Medio sin suplementar | | | Medio con kanamicina | | |
| | | Silvestre | UcuE | χ^2 | Kan ^R | Kan ^S | χ^2 |
| <i>35S:At3g21640:ocs</i> | Silvestre (1) | 77 | 34 | 1,589 | 142 | 63 | 0,063 |
| | Silvestre (2) | 76 | 38 | 3,789 | 100 | 58 | 2,364 |
| | Silvestre (3) | 70 | 32 | 1,882 | 98 | 48 | 4,898 |
| | Silvestre (4) | 140 | 50 | 0,112 | 84 | 47 | 1,528 |
| | Silvestre (5) | 59 | 24 | 0,486 | 63 | 23 | 3,172 |
| | Silvestre (6) | 21 | 8 | 0,011 | 48 | 19 | 0,065 |
| <i>35S:At3g21650-40:ocs</i> | Silvestre (7) | 63 | 21 | 0,016 | 123 | 63 | 0,466 |

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 13, en la página 107. El valor de χ^2 representa el ajuste de los datos de la población T₃ estudiada a una segregación fenotípica 3:1.

Las semillas T₂ procedentes de la autofecundación de las plantas T₁ sometidas a infiltración se sembraron en medio con kanamicina (véase el apartado III.12.2.2 de Materiales y Métodos, en la página 95). Hemos aislado 6 plantas presuntamente transformantes portadoras del transgén *35S:At3g21640:ocs* y de fenotipo silvestre (Figura 54A). La segregación fenotípica observada en su progenie T₃ sugiere que todas ellas eran heterocigotas para el transgén (Tabla 35), cuya presencia fue confirmada mediante amplificación de la región de *At3g21640* de la que carece el mutante *ucu2-3* (Figura 54D).

Hemos obtenido 4 plantas presuntamente portadoras del transgén *35S:At3g21650-40:ocs*. Sólo una de ellas presentaba el fenotipo silvestre (Figura 54B), mientras que las tres restantes (Figura 54C) fueron muy semejantes a los heterocigotos *ucu1-1/UCU1* y *ucu1-2/UCU1* (véase la Figura 18C, en la página 104).

IV.4.2.3.2.- Aislamiento del mutante *ucu2-4*

Las colecciones de noqueos (*knockouts*) constituyen una de las herramientas genéticas desarrolladas por la comunidad de investigadores en *Arabidopsis thaliana*. Una de ellas es la del grupo de J. Ecker, que incluye varios miles de estirpes de dominio público, cada una de las cuales contiene una inserción de ADN-T cuya posición

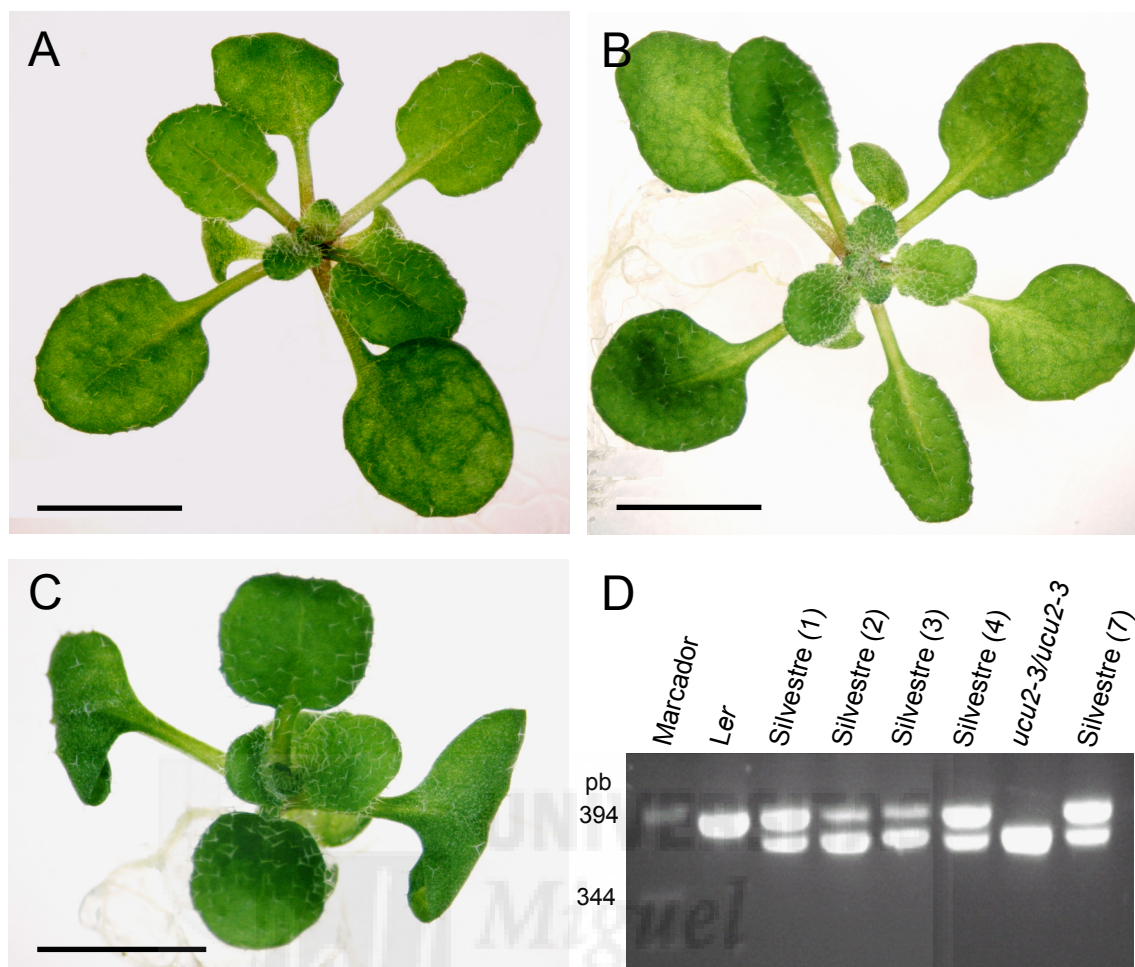


Figura 54.- Rescate fenotípico del mutante *ucu2-3*. Las imágenes corresponden a plantas (A) *ucu2-3/ucu2-3;35S:At3g21640:ocs* y (B) *ucu2-3/ucu2-3;35S:At3g21650-40:ocs*, ambas fenotípicamente silvestres. (C) Una planta *ucu2-3/ucu2-3;35S:At3g21650-40:ocs* cuyo fenotipo es UcuI. Las fotografías se tomaron 23 días después de la siembra. Las barras de escala indican 4 mm. (D) Visualización, en un gel del 1% en agarosa, teñido con bromuro de etidio, de los productos de amplificación obtenidos con ADN genómico de las plantas T₂ que se indican y utilizando los cebadores SeqMIL23.4F y SeqMIL23.4R (véase la Tabla 34, en la página 157), que flanquean la región de *At3g21640* delecionada en el mutante *ucu2-3*.

en el genoma de *Arabidopsis thaliana* ha sido determinada y publicada (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>).

Tras establecer la identidad del gen *UCU2*, procedimos a solicitar uno de los mutantes (SALK_012836) de la colección de J. Ecker, en el que el ADN-T está insertado en el quinto exón de *At3g21640*. Se estudiaron 14 plantas de esta estirpe, sólo una de las cuales mostró un fenotipo indistinguible del de los mutantes *ucu2*. Hemos obtenido familias T₄ a partir de la autofecundación de las 13 plantas restantes, en una de las cuales se encontraron plantas Silvestres y UcuE en una proporción 3:1, lo que indica que

la mutación causante del fenotipo mutante es recesiva. Hemos denominado *ucu2-4* a este nuevo alelo del gen *UCU2*, que no hemos caracterizado. Su naturaleza insercional sugiere su carácter nulo.

IV.5.- Análisis de interacciones genéticas y de los efectos de dosis génicas

Hemos obtenido dobles mutantes cruzando las estirpes *ucu* entre sí y por otras que son portadoras de mutaciones que causan enanismo y perturban el desarrollo de la hoja. Se seleccionaron para este fin alelos mutantes de los genes *DIMINUTO* (*DIM*; Takahashi *et al.*, 1995), *DE-ETIOLATED2* (*DET2*; Li *et al.*, 1996), *BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1* (*BRI1*; Clouse *et al.*, 1996) y *AUXIN RESISTANT2* (*AXR2*; Wilson *et al.*, 1990), que están implicados en la síntesis o la percepción de algunas fitohormonas. También se emplearon alelos mutantes de varios genes *INCURVATA* (*ICU*), *TRANSCURVATA* (*TCU*) y *ASYMMETRIC LEAVES* (*AS*) que habían sido identificados en el laboratorio de J.L. Micol (Berná *et al.*, 1999; Robles y Micol, 2001) y se caracterizan por las deformidades que causan en las hojas vegetativas, que se apartan notablemente de la forma plana de las silvestres.

IV.5.1.- Obtención de triploides

La semidominancia de los alelos *ucu1-1* y *ucu1-2* puede deberse a su naturaleza antimorfa, hipermorfa o neomorfa (Müller, 1932, citado en Wilkins, 1993). Alternativamente, podrían ser hipomorfos o nulos si el locus *UCU1* fuese haploinsuficiente. Con el fin de obtener información sobre la naturaleza funcional de las mutaciones *ucu1*, hemos obtenido plantas triploides *UCU1/UCU1/ucu1* a partir de cruzamientos entre los mutantes y una estirpe tetraploide (*UCU1/UCU1/UCU1/UCU1*).

Del cruzamiento de un tetraploide (♀) por *ucu1-1/ucu1-1* (♂) obtuvimos 59 semillas F_1 que dieron lugar a 34 plantas aparentemente silvestres (Figura 55B) y 19 que resultaron más pequeñas que su parental femenino y cuyas hojas estaban ligeramente recurvadas hacia el envés en su región apical (Figura 55C). Las restantes 6 semillas F_1 no germinaron o dieron lugar a plántulas que murieron inmediatamente después de la expansión de sus cotiledones. Del cruzamiento de un tetraploide (♀) por *ucu1-2/ucu1-2* (♂) obtuvimos 25 semillas F_1 , 12 de las cuales dieron lugar a plantas silvestres y 10 más pequeñas que su parental femenino y con las hojas recurvadas hacia el envés, siendo 3 las que no germinaron o mostraron letalidad temprana. A pesar de que la mutación *ucu1-3* presenta un modo de herencia recesivo, también cruzamos un tetraploide por una planta *ucu1-3/ucu1-3*. De este último cruzamiento se obtuvieron 23 semillas F_1 , que

produjeron 10 plantas silvestres, 10 más pequeñas que su parental femenino y con las hojas recurvadas hacia el envés y 3 que no germinaron o mostraron letalidad temprana.

Para descartar la eventual autofecundación del tetraploide, se analizó el polimorfismo de los marcadores AthACS, AthZFPG, nga361, AthCHIB, AthGAPab y nga1111 de los cromosomas 1, 1, 3, 3 y 4, respectivamente, en 6 plantas F₁, 4 de ellas fenotípicamente silvestres y 2 de las pequeñas y con las hojas recurvadas hacia el envés,

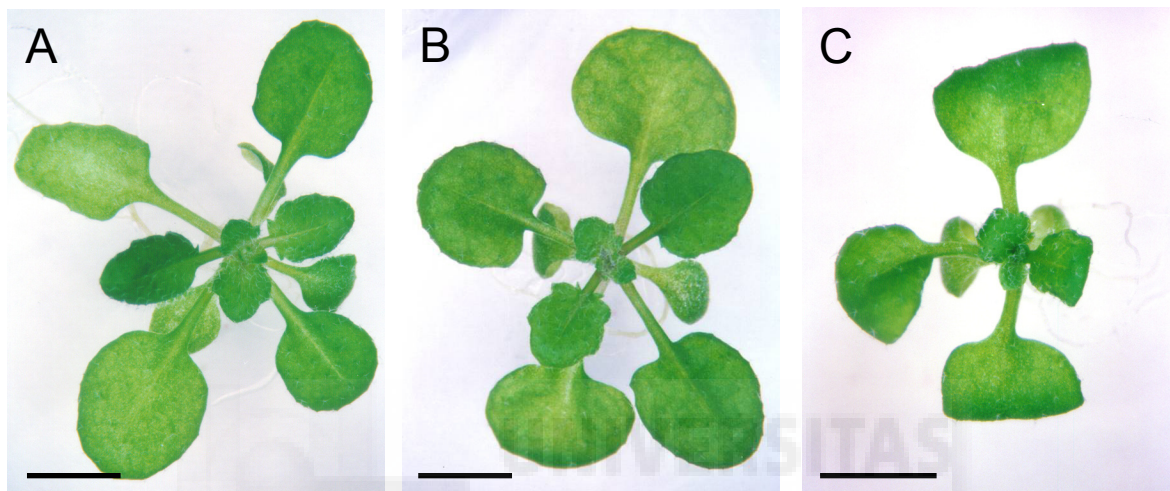


Figura 55.- Fenotipo de los triploides *UCU1/UCU1/ucu1*. Roseta basal de (A) una planta tetraploide y de (B, C) dos descendientes triploides de un cruzamiento *UCU1/UCU1/UCU1/UCU1* × *ucu1-1/ucu1-1*, uno de ellos fenotípicamente silvestre (B) y otro con las hojas ligeramente recurvada hacia el envés (C). Las fotografías fueron tomadas 21 días después de la siembra. Las barras de escala indican 4 mm.

comprobándose la presencia simultánea de los alelos de estos microsatélites de Ler y Col-1. Esto indica que las plantas F₁ tenían, al menos, una copia del genoma de cada parental, lo que permite descartar la posibilidad de que fuesen resultado de la autofecundación del tetraploide.

El fenotipo silvestre de algunos individuos triploides *UCU1/UCU1/ucu1* podría explicarse si asumimos que el alelo recesivo *ucu1-3* es hipomorfo y que los alelos semidominantes *ucu1-1* y *ucu1-2* son antimorfos. Alternativamente, *ucu1-1* y *ucu1-2* podrían ser nulos o extremadamente hipomorfos si el gen *UCU1* fuese haploinsuficiente.

IV.5.2.- Obtención de dobles mutantes

IV.5.2.1.- Análisis de las interacciones entre mutaciones *ucu*

Aunque la morfología foliar de las plantas *ucu1-1/ucu1-1* y *ucu2/ucu2* es prácticamente indistinguible, difieren en otros rasgos de su fenotipo pleiotrópico, como la

rotación helicoidal de los órganos de las segundas (véase el apartado IV.2, en la página 108). Con el propósito de obtener su combinación doble mutante, hemos realizado cruzamientos entre las estirpes *ucu1* y *ucu2*, según se recoge en la Tabla 36.

Tabla 36.- Segregación fenotípica en la progenie F₂ de varios cruzamientos entre los mutantes *ucu1* y *ucu2*

| Cruzamiento (♀ × ♂) | F ₁ | F ₂ | | | | | | χ ² |
|---|----------------|----------------|------|------|-------|------|---------------------------------|--------------------|
| | | Silvestre | Ucul | UcuE | UcuEH | UcuD | Presuntos dobles mutantes | |
| <i>ucu1-1/ucu1-1</i> × <i>ucu2-1/ucu2-1</i> | 38 Ucul | 47 | 111 | 54 | 51 | 13 | 2,135 ^a | |
| <i>ucu1-2/ucu1-2</i> × <i>ucu2-1/ucu2-1</i> | 9 Ucul | 54 | 104 | 60 | 56 | 14 | 1,778 ^a | |
| <i>ucu1-3/ucu1-3</i> × <i>ucu2-1/ucu2-1</i> | 30 Silvestre | 147 | | | 57 | 58 | 11 | 4,001 ^b |

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 12, en la página 106. El valor de χ² representa el ajuste de los datos de la población F₂ estudiada a una segregación fenotípica ^a3:6:3:3:1 (que corresponde a una modificación de la segregación 3:6:3:1:2:1, ya que los individuos *ucu1-1/UCU1;ucu2-1/ucu2-1* y *ucu1-1/ucu1-1;ucu2-1/ucu2-1* son indistinguibles) o ^b9:3:3:1.

En la F₂ del cruzamiento *ucu1-1/ucu1-1* × *ucu2-1/ucu2-1* sólo hemos podido identificar inequívocamente 5 de las 6 clases fenotípicas esperadas (Tabla 36). Una de ellas fue aparentemente silvestre y otra presentaba un fenotipo Ucul, cuyos respectivos genotipos deben ser *UCU1/UCU1;UCU2/-* y *ucu1-1/UCU1;UCU2/-*. Otra clase fenotípica, que resultó ser UcuE, debe corresponder al genotipo *ucu1-1/ucu1-1;UCU2/-*. También aparecieron plantas con un fenotipo UcuE y rotación helicoidal en sus órganos (véase la columna encabezada como UcuEH en la Tabla 36), cuyos genotipos son *UCU1/UCU1;ucu2-1/ucu2-1* y *ucu1-1/UCU1;ucu2-1/ucu2-1*, que son indistinguibles (véase la Figura 18E, en la página 104). La clase presuntamente doble mutante fue identificada por exclusión y presentaba un fenotipo que puede considerarse meramente aditivo, ya que su roseta es muy compacta, de color verde oscuro y de aspecto translúcido, con las hojas vegetativas pequeñas y arrugadas de peciolo muy corto (Figura 56A). Presentan además rotación helicoidal de la raíz y las silicuas, y apenas producen semillas (Figura 56C-D). El fenotipo foliar de estas plantas es muy similar al de los mutantes *bri1/bri1*, en los que el receptor de los brasinosteroides es inactivo (Li y Chory, 1997). La naturaleza doble mutante de estas plantas fue confirmada analizando familias F₃ informativas (Tabla 37).

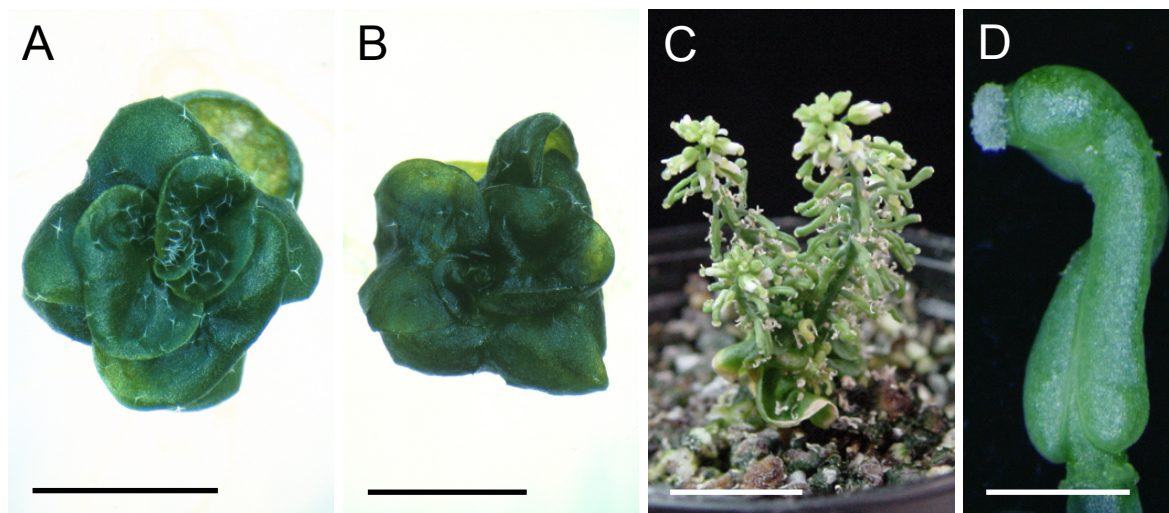


Figura 56.- Fenotipo de los dobles mutantes *ucu1 ucu2*. Las imágenes corresponden a rosetas de plantas (A) *ucu1-1/ucu1-1;ucu2-1/ucu2-1* y (B) *ucu1-3/ucu1-3;ucu2-1/ucu2-1*. (C) Inflorescencia y (D) detalle de un pistilo que manifiesta rotación helicoidal de una planta *ucu1-1/ucu1-1;ucu2-1/ucu2-1*. Las fotografías fueron tomadas 23 (A, B) y 35 (C, D) días después de la siembra. Las barras de escala indican 2 (D), 3 (A, B) y 10 (C) mm.

Tabla 37.- Segregación fenotípica en la progenie F_3 de varios cruzamientos entre los mutantes *ucu1* y *ucu2*

| Cruzamiento (♀ × ♂) | F_2^a | F_3 | | | χ^2 |
|---|----------|-------|------|---------------------------|----------|
| | | UcuD | UcuE | Presuntos dobles mutantes | |
| <i>ucu1-1/ucu1-1</i> × <i>ucu2-1/ucu2-1</i> | UcuE (2) | | 42 | 12 | 0,099 |
| | UcuE (6) | | 45 | 19 | 0,521 |
| <i>ucu1-2/ucu1-2</i> × <i>ucu2-1/ucu2-1</i> | UcuE (1) | | 50 | 12 | 0,774 |
| | UcuE (3) | | 26 | 8 | 0,000 |
| <i>ucu1-3/ucu1-3</i> × <i>ucu2-1/ucu2-1</i> | UcuD (1) | 98 | | 36 | 0,159 |
| | UcuD (5) | 100 | | 40 | 0,771 |

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 12, en la página 106. ^aAparecen en esta columna las plantas F_2 , a las que se asignó el número que aparece entre paréntesis, a partir de las cuales se obtuvo la familia F_3 cuya segregación fenotípica se indica. Se recogen en la tabla sólo aquellas familias F_3 que resultaron informativas, dado que incluyeron plantas que eran presuntos dobles mutantes. El valor de χ^2 representa el ajuste de los datos de la población F_3 estudiada a una segregación fenotípica 3:1.

Hemos analizado también la progenie F_2 y F_3 de los cruzamientos *ucu1-2/ucu1-2* × *ucu2-1/ucu2-1* y *ucu1-3/ucu1-3* × *ucu2-1/ucu2-1* (Tabla 36 y 37). Los fenotipos de los dobles mutantes *ucu1-3/ucu1-3;ucu2-1/ucu2-1*, *ucu1-1/ucu1-1;ucu2-1/ucu2-1* y *ucu1-2/ucu1-2;ucu2-1/ucu2-1* son indistinguibles (Figura 56A-B), a pesar de que *ucu1-3*

es un alelo de *UCU1* mucho más débil que *ucu1-2*. Estos resultados sugieren la aditividad de los efectos fenotípicos de estas mutaciones.

IV.5.2.2.- Análisis de las interacciones con mutaciones que perturban la síntesis o la señalización hormonal

Se ha generalizado el uso del vocablo “señalización” para referirse a la transducción de las señales hormonales y de otros tipos. El enanismo de los mutantes *ucu* (véase el apartado IV.2.2.1, en la página 115) es similar al causado por las mutaciones en los genes implicados en la síntesis de los brasinosteroides, como *DIM* y *DET2*, o en su percepción, como *BR11*, o en la señalización de las auxinas, como *AXR2* (véase el apartado IV.2.2.1, en la página 115). Además, las mutaciones *ucu1* producen insensibilidad a los brasinosteroides e hipersensibilidad a las auxinas (véase el apartado IV.2.3, en la página 119). Hemos intentado establecer las eventuales interacciones entre las mutaciones *ucu* y algunas de las que dañan a genes implicados en la síntesis o la señalización de varias fitohormonas, tal como se describe a continuación.

IV.5.2.2.1.- Los dobles mutantes *ucu dim*

El producto del gen *DIMINUTO* (*DIM*), también llamado *DWARF1* (*DWF1*), es una proteína homóloga a las oxidoreductasas dependientes de FAD (dinucleótido de flavina y adenina), que se ubica en la membrana del retículo endoplásmico y participa en la síntesis de los brasinosteroides (Klahre *et al.*, 1998). Las plantas *dim-1/dim-1* son enanas (véase la Figura 57D) debido a una elongación celular deficiente (Takahashi *et al.*, 1995), un fenotipo que puede normalizarse por completo mediante la administración de brasinosteroides (Klahre *et al.*, 1998). La mutación *dim-1* es recesiva.

Hemos llevado a cabo varios cruzamientos *ucu1/ucu1* × *dim-1/dim-1* (Tabla 38), las segregaciones fenotípicas observadas en su F₂ se ajustaron a lo esperado de las plantas de genotipo *ucu1-1/UCU1;dim-1/dim-1*. Hemos considerado aditivo el fenotipo del doble mutante *ucu1-1/ucu1-1;dim-1/dim-1*, que se caracteriza por una roseta muy compacta de color verde oscuro, con las hojas muy pequeñas, recurvadas hacia el envés y ligeramente arrugadas (véase la Figura 57E, en la página 177). Las proporciones observadas en la F₂ del cruzamiento *ucu1-3/ucu1-3* × *dim-1/dim-1* (Tabla 38) se ajustan a lo esperado de una segregación 9:3:3:1, lo que corrobora la hipótesis de la inexistencia de interacción entre ambas mutaciones. El fenotipo de los dobles mutantes *ucu1-3/ucu1-3;dim-1/dim-1* (Figura 57F) es indistinguible del de los *ucu1-1/ucu1-1;dim-1/dim-1*, lo que confirma la aditividad de las mutaciones *dim* y *ucu1*.

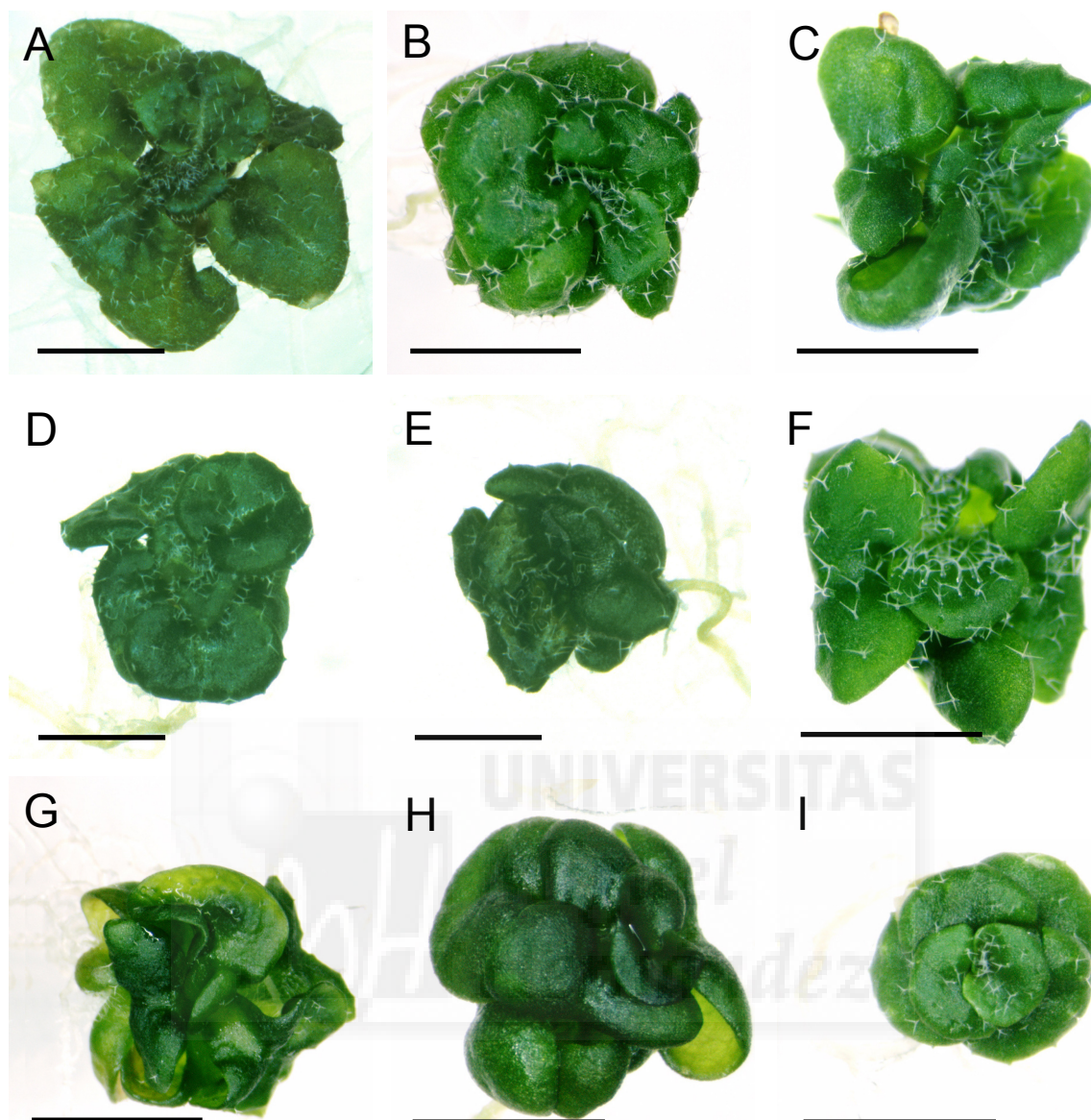


Figura 57.- Fenotipo de los dobles mutantes *ucul det2*, *ucul dim-1* y *ucul bri1*. Las fotografías corresponden a plantas (A) *det2-1/det2-1*, (B) *ucul-3/ucul-3;det2-1/det2-1*, (C) *ucul-2/ucul-2;det2-1/det2-1*, (D) *dim-1/dim-1*, (E) *ucul-1/ucul-1;dim-1/dim-1*, (F) *ucul-3/ucul-3;dim-1/dim-1*, (G) *dim-1 ucu2-1/dim-1 ucu2-1*, (H) *bri1-1/bri1-1*, e (I) *ucul-1/ucul-1;bri1-1/bri1-1*. Las fotografías fueron tomadas 23 días después de la siembra. Las barras de escala indican 3 mm.

El cruzamiento *dim-1/dim-1* × *ucu2-1/ucu2-1* se llevó a cabo inicialmente con el propósito de determinar el eventual alelismo entre las mutaciones *dim-1* y *ucu2-1*, dado que sus posiciones de mapa son vecinas (véase el apartado IV.4.1, en la página 149) y sus fenotipos muy parecidos. Se obtuvieron 54 plantas F₁, todas las cuales presentaron fenotipo silvestre, lo que nos permitió descartar el alelismo entre *ucu2-1* y *dim-1*. Hemos analizado la segregación fenotípica en varias familias de la F₂ de este cruzamiento pero sólo hemos identificado tres de las cuatro clases fenotípicas esperadas. En concreto,

obtuvimos 224 plantas de fenotipo silvestre, 119 UcuEH y 110 Dim, estas últimas idénticas al parental *dim-1/dim-1*. Esta segregación fenotípica se ajusta aceptablemente a la proporción 1:2:1 (UcuEH:Silvestre:Dim; $\chi^2 = 0,413$). La interpretación más verosímil para tales resultados es la existencia de un ligamiento muy íntimo entre los genes *UCU2* y *DIM*, lo que es congruente con la proximidad entre sus posiciones de mapa.

Tabla 38.- Segregación fenotípica en la progenie F₂ de varios cruzamientos *ucu1/ucu1* × *dim-1/dim-1*

| Cruzamiento (♀ × ♂) | F ₁ | F ₂ | | | | | | | χ^2 |
|---|----------------|----------------|------|------|-----|----------|------|---------------------------|--------------------|
| | | Silvestre | Ucul | UcuE | Dim | Ucul Dim | UcuD | Presuntos dobles mutantes | |
| <i>ucu1-1/ucu1-1</i> × <i>dim-1/dim-1</i> | 38 Ucul | 150 | 293 | 136 | 47 | 104 | | 54 | 1,847 ^a |
| <i>ucu1-2/ucu1-2</i> × <i>dim-1/dim-1</i> | 3 Ucul | 19 | 34 | 14 | 5 | 16 | | 6 | 2,567 ^a |
| <i>ucu1-3/ucu1-3</i> × <i>dim-1/dim-1</i> | 18 Silvestre | 157 | | | 57 | | 54 | 10 | 3,656 ^b |

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 37, en la página 175. El valor de χ^2 representa el ajuste de los datos de la población F₂ estudiada a una segregación fenotípica ^a3:6:3:1:2:1 o ^b9:3:3:1.

Tabla 39.- Segregación fenotípica en la progenie F₃ de varios cruzamientos *ucu1/ucu1* × *dim-1/dim-1*

| Cruzamiento (♀ × ♂) | F ₂ | F ₃ | | | χ^2 |
|---|----------------|----------------|------|---------------------------|----------|
| | | UcuD | UcuE | Presuntos dobles mutantes | |
| <i>ucu1-1/ucu1-1</i> × <i>dim-1/dim-1</i> | UcuE (1) | | 43 | 16 | 0,051 |
| <i>ucu1-3/ucu1-3</i> × <i>dim-1/dim-1</i> | UcuD (2) | 54 | | 18 | 0,076 |
| | UcuD (4) | 47 | | 18 | 0,128 |
| | UcuD (5) | 35 | | 11 | 0,000 |
| | UcuD (7) | 36 | | 11 | 0,007 |
| | UcuD (10) | 58 | | 18 | 0,018 |

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 37, en la página 175. El valor de χ^2 representa el ajuste de los datos de la población F₃ estudiada a una segregación fenotípica 3:1.

Para la identificación de los dobles mutantes *ucu2-1 dim-1/ucu2-1 dim-1* hemos seleccionado plantas F₂ de fenotipo Dim, cuyos posibles genotipos eran *UCU2 dim-1/UCU2 dim-1* y *ucu2-1 dim-1/UCU2 dim-1*, a partir de las cuales hemos establecido familias F₃. Una de ellas incluyó 11 plantas Dim y 4 muy similares a éstas pero con las hojas ligeramente recurvadas hacia el envés y con raíces helicoidalmente rotadas (Figura 57G), que deben ser los dobles mutantes ($\chi^2_{3:1} = 0,022$). También en este caso no

cabe otra interpretación que la de la aditividad de los fenotipos mutantes y, en consecuencia, la inexistencia de una relación entre las funciones de los genes *UCU2* y *DIM*.

IV.5.2.2.- Los dobles mutantes *ucu1 det2*

Las plantas homocigóticas para las mutaciones *de-etiolated2 (det2)* son enanas, con una roseta compacta de hojas pequeñas y redondeadas, ligeramente asimétricas y arrugadas y de peciolo corto. Su inflorescencia es pequeña y son estériles (Figura 57A; Li *et al.*, 1996). El producto del gen *DET2*, que radica en el cromosoma 2 de *Arabidopsis thaliana*, es una reductasa de esteroides, homóloga a las de los mamíferos, que cataliza una etapa inicial de la biosíntesis de los brassinosteroides (Li *et al.*, 1996).

Tabla 40.- Segregación fenotípica en la progenie F₂ de varios cruzamientos *ucu1/ucu1* × *det2-1/det2-1*

| Cruzamiento (♀ × ♂) | F ₁ | F ₂ | | | | | | χ ² |
|---|----------------|----------------|------|------|------|-----------|------|--------------------|
| | | Silvestre | Ucul | UcuE | Det2 | Ucul Det2 | UcuD | |
| <i>ucu1-1/ucu1-1</i> × <i>det2-1/det2-1</i> | 34 Ucul | 30 | 65 | 31 | 18 | 30 | 9 | 7,557 ^a |
| <i>ucu1-3/ucu1-3</i> × <i>det2-1/det2-1</i> | 26 Silvestre | 89 | | | 36 | 44 | 11 | 4,751 ^b |

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 37, en la página 175. El valor de χ² representa el ajuste de los datos de la población F₂ estudiada a una segregación fenotípica ^a3:6:3:1:2:1 o ^b9:3:3:1.

Tabla 41.- Segregación fenotípica en la progenie F₃ de varios cruzamientos *ucu1/ucu1* × *det2-1/det2-1*

| Cruzamiento (♀ × ♂) | F ₂ | F ₃ | | χ ² | |
|---|----------------|----------------|------|----------------|---------------------------|
| | | UcuD | UcuE | | Presuntos dobles mutantes |
| <i>ucu1-1/ucu1-1</i> × <i>det2-1/det2-1</i> | UcuE (3) | | 32 | 9 | 0,073 |
| <i>ucu1-3/ucu1-3</i> × <i>det2-1/det2-1</i> | UcuD (1) | 64 | | 26 | 0,533 |
| | UcuD (2) | 73 | | 20 | 0,434 |
| | UcuD (3) | 70 | | 24 | 0,000 |
| | UcuD (6) | 60 | | 29 | 3,341 |

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 37, en la página 175. El valor de χ² representa el ajuste de los datos de la población F₃ estudiada a una segregación fenotípica 3:1.

Hemos realizado cruzamientos entre mutantes *det2-1*, *ucu1-1* y *ucu1-3*. En la progenie F₂ del cruzamiento *ucu1-1/ucu1-1* × *det2-1/det2-1* fue posible distinguir las

clases fenotípicas que se indican en la Tabla 40, lo que sugiere la aditividad de los fenotipos mutantes. En la F_2 del cruzamiento $ucu1-3/ucu1-3 \times det2-1/det2-1$ aparecieron algunos individuos con los fenotipos parentales, otros silvestres, y otros fueron similares a los dobles mutantes $ucu1-1/ucu1-1;det2-1/det2-1$ (Figura 57B). La naturaleza doble mutante de estos últimos se comprobó mediante el análisis de familias F_3 segregantes (Tabla 41).

IV.5.2.2.3.- El doble mutante *ucu1 bri1*

El gen *BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1 (BRI1)*, que se encuentra cerca del telómero inferior del cromosoma 4, cifra el receptor de membrana de los brasinosteroides (Li y Chory, 1997). Las plantas *bri1/bri1* son extremadamente enanas y presentan una expansión reducida de todos sus órganos, una fertilidad escasa y una roseta compacta, integrada por hojas arrugadas (Clouse *et al.*, 1996). Este fenotipo tiene algunos rasgos comunes con el de los mutantes alterados en la síntesis de los brasinosteroides.

Dado que los mutantes *bri1-1/bri1-1* son estériles, hemos utilizado varias plantas de fenotipo silvestre procedentes de la autofecundación de un heterocigoto *BRI1/bri1-1* para cruzarlas por los mutantes *ucu1*. Sólo dos de ellas, las que hemos denominado Silvestre (8) y Silvestre (9), resultaron a su vez heterocigóticas para la mutación *bri1-1*, según pudo comprobarse en la descendencia de su autofecundación, que incluyó plantas de fenotipo Bri1. La Tabla 42 recoge la segregación fenotípica obtenida en aquellas familias F_2 que incluyeron individuos Bri1, que eran por tanto descendientes de una planta F_1 de genotipo $ucu1-1/UCU1;BRI1/bri1-1$. La segregación fenotípica se ajustó a lo esperado para la progenie de un dihíbrido heterocigótico para una mutación recesiva y otra semidominante, asumiendo que no existe ni ligamiento ni interacción entre los genes a estudio (3:6:3:1:2:1). De hecho, aunque las mutaciones *ucu1* y *bri1* se encuentran en el cromosoma 4, están separadas por más de 40 cM (véase el apartado IV.3.1, en la página 125), por lo que puede ignorarse su ligamiento. No hemos logrado distinguir los fenotipos de las plantas $ucu1-1/UCU1;bri1-1/bri1-1$, $ucu1-1/ucu1-1;bri1-1/bri1-1$ y *bri1-1/bri1-1*, por lo que al agrupar estos genotipos en una sola clase, a la que hemos denominado "Similar a Bri1", la segregación fenotípica esperada se transforma en 3:6:3:4.

Dadas las dificultades que se comentan en el párrafo anterior para identificar los dobles mutantes $ucu1-1/ucu1-1;bri1-1/bri1-1$, hemos trasplantado a maceta 5 plantas UcuE y otras 5 similares a Bri1 de dos de las cuatro progenies F_2 en las que apareció esta última clase fenotípica, para obtener familias F_3 . En una de estas últimas, obtenida a partir de una planta UcuE de la F_2 del cruzamiento Silvestre (9) \times $ucu1-1/ucu1-1$,

aparecieron 28 plantas UcuE y 5 similares a Bri1 ($\chi^2 = 1,222$), cuyo genotipo debe ser *ucu1-1/ucu1-1;bri1-1/bri1-1*.

Tabla 42.- Segregación fenotípica en la progenie F₂ de varios cruzamientos *BRI1/bri1-1* × *ucu1-1/ucu1-1*

| Cruzamiento (♀ × ♂) | F ₁ | F ₂ | | | | χ^2 |
|--------------------------------------|----------------|----------------|------|------|----------------|----------|
| | | Silvestre | Ucul | UcuE | Similar a Bri1 | |
| Silvestre (8) × <i>ucu1-1/ucu1-1</i> | Ucul (1) | 14 | 32 | 27 | 30 | 6,359 |
| Silvestre (9) × <i>ucu1-1/ucu1-1</i> | Ucul (1) | 13 | 40 | 21 | 14 | 6,364 |
| | Ucul (2) | 10 | 47 | 19 | 23 | 6,710 |
| | Ucul (6) | 7 | 26 | 18 | 10 | 7,721 |

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 37, en la página 175. El valor de χ^2 representa el ajuste de los datos de la población F₂ estudiada a una segregación fenotípica 3:6:3:4.

Los dobles mutantes *ucu1-1/UCU1;bri1-1/bri1-1* y *ucu1-1/ucu1-1;bri1-1/bri1-1* son muy enanos y presentan una roseta compacta y más pequeña que las de sus parentales, integrada por hojas arrugadas y ligeramente curvadas hacia el envés en su región apical (Figura 57I). La inflorescencia de estos dobles mutantes es indistinguible de la de su parental *bri1-1/bri1-1*. Dado que se trata de un fenotipo muy extremo, es también en este caso muy difícil distinguir entre aditividad, epistasia o sinergia.

IV.5.2.2.4.- Los dobles mutantes *ucu1 axr2*

La mutación dominante *axr2-1* confiere resistencia al tratamiento con las auxinas, el etileno y el ácido abscísico. Los mutantes *axr2-1* son enanos y sus hojas están arrugadas (Figura 58A; Wilson *et al.*, 1990). El gen *AXR2*, cuya expresión es inducible por las auxinas, cifra la proteína IAA7, que está implicada en la respuesta a estas hormonas (Nagpal *et al.*, 2000).

Hemos realizado varios cruzamientos entre plantas *axr2-1/axr2-1* e individuos homocigóticos para los alelos semidominantes *ucu1-1* y *ucu1-2*. En ambos casos todas las plantas F₁ presentaron cotiledones recurvados hacia el haz y una roseta muy compacta, integrada por hojas pequeñas, arrugadas y de peciolo corto (Figura 58B). Estas plantas *ucu1-1/UCU1;axr2-1/AXR2* y *ucu1-2/UCU1;axr2-1/AXR2* son estériles. Del cruzamiento *ucu1-3/ucu1-3* × *axr2-1/axr2-1* se obtuvieron 93 plantas F₁ similares a las *ucu1-1/UCU1;axr2-1/AXR2*, aunque con un fenotipo mutante menos extremo y fértiles (Figura 58C). En la progenie F₂ de estas últimas hemos logrado discriminar cuatro clases fenotípicas. Dos de ellas presentaron los fenotipos parentales UcuD y Axr2, la tercera fue

silvestre, y el resto de los individuos de la F_2 resultaron similares a los $ucu1-3/UCU1;axr2-1/AXR2$, algunos de los cuales presentaron un fenotipo más extremo que los demás. Hemos optado por definir una clase fenotípica única y relativamente heterogénea para todas estas últimas, que hemos denominado Compacta, cuyo genotipo es $axr2-1/-;ucu1-3/-$. Estos resultados se ajustan aceptablemente a una segregación fenotípica 9:3:3:1 (Compacta:Silvestre:Axr2:UcuD) asumiendo la existencia de sinergia entre las mutaciones a estudio y que la intensidad del fenotipo mutante de las plantas de la clase Compacta depende del número de las dosis de los alelos $axr2-1$ y $ucu1-3$ (Figura 59). Las Tabla 43 y 44 recogen los resultados obtenidos en el análisis de las segregaciones fenotípicas observadas en la progenie F_2 y F_3 , respectivamente, del que se dedujo que el genotipo de las plantas Compacta (2) y Compacta (3) debía ser $ucu1-3/UCU1;axr2-1/AXR2$, mientras que la Compacta (4) podía ser $ucu1-3/ucu1-3;axr2-1/AXR2$ o $ucu1-3/ucu1-3;axr2-1/axr2-1$.

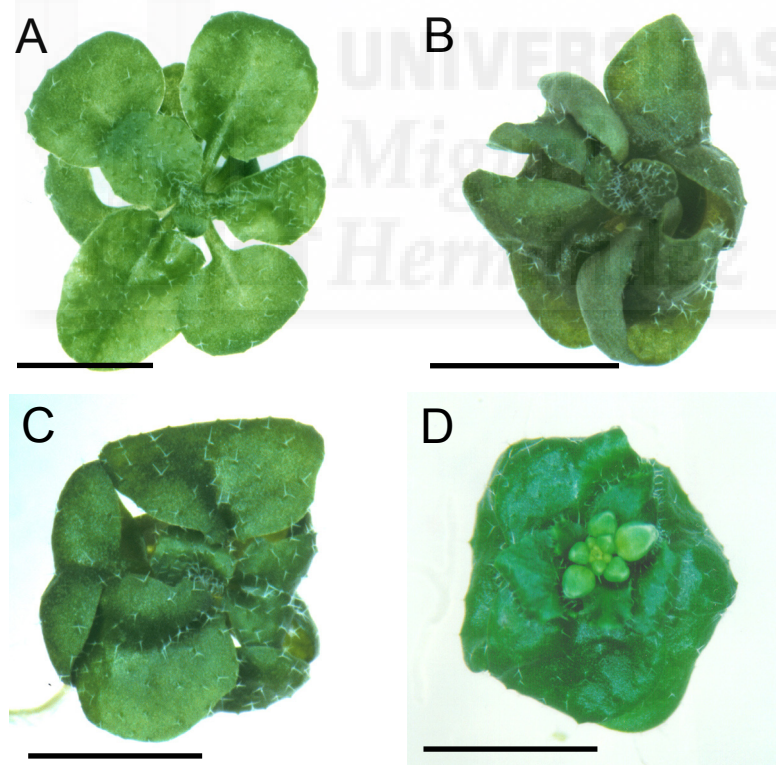


Figura 58.- Fenotipo de los dobles mutantes $ucu1\ axr2$. Las imágenes corresponden a rosetas de plantas (A) $axr2-1/axr2-1$, (B) $ucu1-1/UCU1;axr2-1/AXR2$, (C) $ucu1-3/UCU1;axr2-1/AXR2$, y (D) un presunto doble mutante $ucu1-3/ucu1-3;axr2-1/axr2-1$. Las fotografías fueron tomadas 23 días después de la siembra. Las barras de escala indican 3 mm.

Tabla 43.- Segregación fenotípica en la progenie F₂
de varios cruzamientos entre mutantes *ucu1* y *axr2*

| Cruzamiento (♀ × ♂) | F ₁ | F ₂ | | | | χ ² |
|---|----------------------|----------------|-----------|------|------|----------------|
| | | Compacta | Silvestre | Axr2 | UcuD | |
| <i>ucu1-1/ucu1-1</i> × <i>axr2-1/axr2-1</i> | 40 Compacta, estéril | | | | | |
| <i>ucu1-2/ucu1-2</i> × <i>axr2-1/axr2-1</i> | 36 Compacta, estéril | | | | | |
| <i>ucu1-3/ucu1-3</i> × <i>axr2-1/axr2-1</i> | 54 Compacta | 148 | 47 | 47 | 22 | 2,088 |

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 37, en la página 175. El valor de χ² representa el ajuste de los datos de la población F₂ estudiada a una segregación fenotípica 9:3:3:1.

Tabla 44.- Segregación fenotípica en la progenie F₃
de varios cruzamientos entre mutantes *ucu1* y *axr2*

| Cruzamiento (♀ × ♂) | F ₂ | F ₃ | | | | χ ² |
|---|----------------|----------------|-----------|------|------|--------------------|
| | | Compacta | Silvestre | Axr2 | UcuD | |
| <i>ucu1-3/ucu1-3</i> × <i>axr2-1/axr2-1</i> | Compacta (2) | 49 | 14 | 9 | 3 | 3,530 ^a |
| | Compacta (3) | 50 | 11 | 15 | 4 | 1,822 ^a |
| | Compacta (4) | 84 | | | | |
| | Axr2 (2) | | 18 | 43 | | 0,443 ^b |

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 37, en la página 175. El valor de χ² representa el ajuste de los datos de la población F₂ estudiada a una segregación fenotípica ^a9:3:3:1 y ^b3:1.

| | <i>AXR2;UCU1</i> | <i>axr2-1;UCU1</i> | <i>AXR2;ucu1-3</i> | <i>axr2-1;ucu1-3</i> |
|----------------------|--------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| <i>AXR2;UCU1</i> | <i>AXR2/AXR2;UCU1/UCU1</i> | <i>axr2-1/AXR2;UCU1/UCU1</i> | <i>AXR2/AXR2;ucu1-3/UCU1</i> | <i>axr2-1/AXR2;ucu1-3/UCU1</i> |
| <i>axr2-1;UCU1</i> | <i>axr2-1/AXR2;UCU1/UCU1</i> | <i>axr2-1/axr2-1;UCU1/UCU1</i> | <i>axr2-1/AXR2;ucu1-3/UCU1</i> | <i>axr2-1/axr2-1;ucu1-3/UCU1</i> |
| <i>AXR2;ucu1-3</i> | <i>AXR2/AXR2;ucu1-3/UCU1</i> | <i>axr2-1/AXR2;ucu1-3/UCU1</i> | <i>AXR2/AXR2;ucu1-3/ucu1-3</i> | <i>axr2-1/AXR2;ucu1-3/ucu1-3</i> |
| <i>axr2-1;ucu1-3</i> | <i>axr2-1/AXR2;ucu1-3/UCU1</i> | <i>axr2-1/axr2-1;ucu1-3/UCU1</i> | <i>axr2-1/AXR2;ucu1-3/ucu1-3</i> | <i>axr2-1/axr2-1;ucu1-3/ucu1-3</i> |

Figura 59.- Cuadro de Punnet de la autofecundación de una planta *ucu1-3/UCU1;axr2-1/AXR2-1*. Encabezan las filas los genotipos de los gametos masculinos y las columnas los de los femeninos, todos los cuales son equiprobables. Se destacan en gris los genotipos que corresponden a la clase fenotípicamente silvestre (3/16 del total), en amarillo las plantas Axr2 (3/16) y en azul las UcuD (1/16). Las restantes (9/16) corresponden a la clase fenotípica heterogénea descrita en el texto (Compacta).

Dado que uno de los efectos fenotípicos de la mutación dominante *axr2* es la ausencia de los pelos radicales, hemos estudiado este rasgo en la progenie F₂ del cruzamiento *ucu1-3/ucu1-3* × *axr2-1/axr2-1*. Hemos encontrando 124 plantas sin pelos

radiculares y 45 con ellos ($\chi^2_{12;4} = 0,160$). La progenie obtenida de la autofecundación de estas últimas incluyó plantas silvestres y UcuD, lo que confirma la hipótesis propuesta en la Figura 59.

IV.5.2.3.- Análisis de las interacciones con mutaciones que deforman la hoja

IV.5.2.3.1.- Los dobles mutantes *ucu1 icu*

Los mutantes *incurvata* (*icu*) presentan el margen de las hojas vegetativas recurvado hacia el haz (Berná, 1997; Berná *et al.*, 1999). El análisis de complementación de estos mutantes, realizado en el laboratorio de J.L. Micol, ha permitido establecer que corresponden a 10 genes, algunos de los cuales han sido estudiados también por otros grupos de investigación: *ICU1* [también llamado *CURLY LEAF (CLF)*; Goodrich *et al.* 1997], *ICU2*, *ICU3* [*HASTY (HST)*; Telfer y Poethig, 1998], *ICU4*, *ICU5* [*SUPPRESSOR OF HY2 (SHY2)*; Tian y Reed, 1999; Candela *et al.*, en preparación], *ICU6* (*AXR3*; Rouse *et al.* 1998; Candela *et al.*, en preparación), *ICU7*, *ICU8*, *ICU9* (*AGO1*; Sara Jover, Tesis doctoral en realización) e *ICU15*. Con el objetivo de determinar la eventual existencia de interacciones entre los genes *ICU* y *UCU*, hemos obtenido los correspondientes dobles mutantes.

IV.5.2.3.1.1.- Los dobles mutantes *ucu1 icu2*

Sólo se conoce un alelo mutante del gen *ICU2*, que es recesivo. Los homocigotos *icu2* presentan hojas arrugadas y débilmente recurvadas hacia el haz. Su floración es temprana y en sus flores los sépalos y los pétalos se transforman parcialmente en carpelos. En las hojas de las plantas *icu2/icu2* están desreprimidos los genes de identidad floral *AGAMOUS (AG)*, *APETALA1 (AP1)* y *AP3* (Ponce *et al.*, 2000; Serrano-Cartagena *et al.*, 2000).

Hemos obtenido 11 plantas de fenotipo Ucul en la F₁ del cruzamiento *icu2/icu2* × *ucu1-1/ucu1-1*. La segregación fenotípica observada en su descendencia F₂ (Tabla 45) se ajusta a la proporción 3:6:3:1:2:1, que implica la ausencia de interacción entre los genes *UCU1* e *ICU2* y su segregación independiente. El fenotipo de los presuntos dobles mutantes identificados, Ucul Icu2 (*ucu1-1/UCU1;icu2/icu2*), y UcuE Icu2 (*ucu1-1/ucu1-1;icu2/icu2*), sugiere la aditividad de ambas mutaciones, que implica la ausencia de interacción entre ambos genes. La naturaleza doble mutante de estas plantas fue confirmada mediante el estudio de su descendencia F₃ (Tabla 45 y Figura 60).

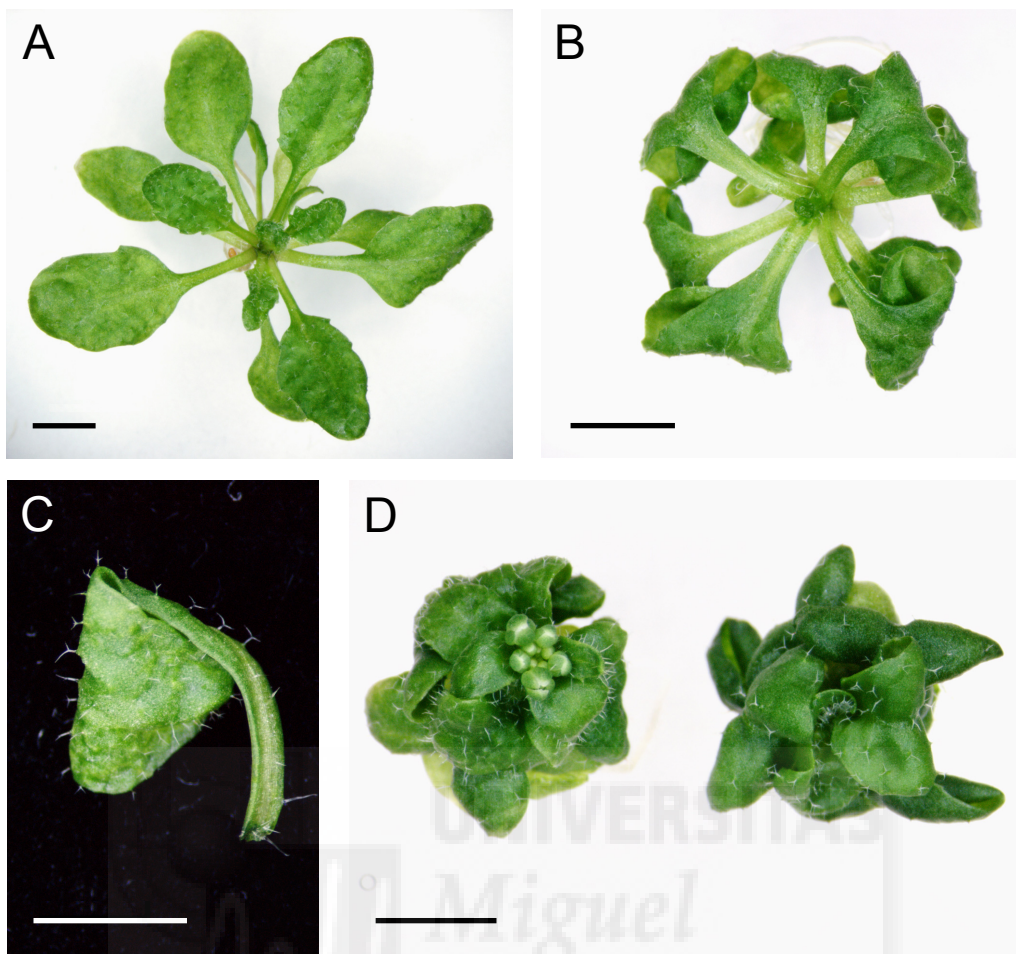


Figura 60.- Fenotipo de los dobles mutantes *ucu1 icu2*. Las imágenes corresponden a una planta *icu2/icu2* (A) y la roseta basal (B) y una hoja del tercer nudo de una planta *ucu1-1/UCU1; icu2/icu2* (C). En D se representa la roseta basal del doble mutante *ucu1-1/ucu1-1; icu2/icu2* (a la izquierda) junto a una planta *ucu1-1/ucu1-1* (a la derecha). Las fotografías fueron tomadas 25 días después de la siembra. Las barras de escala indican 3 mm.

Tabla 45.- Segregación fenotípica en la progenie F_2 y F_3
de varios cruzamientos *icu2/icu2* \times *ucu1-1/ucu1-1*

| Planta que se autofecundó | Clases fenotípicas | | | | | | | | Segregación | |
|---------------------------|--------------------|------|------|------|-----------|-----------|-----------|-------------|-------------|--|
| | Silvestre | Ucul | UcuE | Icu2 | Ucul Icu2 | UcuE Icu2 | UcuE Icu2 | Hipótesis | χ^2 | |
| Ucul (1) F_1 | 14 | 37 | 14 | 9 | 12 | 5 | | 3:6:3:1:2:1 | 3,388 | |
| Ucul Icu2 (1) F_2 | | | | 11 | 20 | 16 | | 1:2:1 | 2,106 | |
| Ucul Icu2 (2) F_2 | | | | 9 | 14 | 10 | | 1:2:1 | 0,818 | |

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 37, en la página 175. En la primera columna de la tabla, la denominación de las plantas indica su pertenencia a la F_1 o la F_2 .

En los individuos *ucu1-1/UCU1; icu2/icu2*, que presentan un fenotipo Ucul Icu2, el limbo está recurvado hacia el envés a lo largo de la vena primaria y su superficie es

arrugada. Su peciolo es también más grueso que el de las plantas *ucu1-1/UCU1* (Figura 60B-C). El doble mutante *ucu1-1/ucu1-1;icu2/icu2* presenta una roseta compacta, con hojas similares a las de las plantas *ucu1-1/ucu1-1*, aunque ligeramente arrugadas, como las del mutante *icu2/icu2*, y su floración es temprana (Figura 60D). Todo ello sugiere la aditividad fenotípica de las mutaciones *ucu1* y *icu2*.

IV.5.2.3.1.2.- Los dobles mutantes *ucu1 hst*

Las hojas vegetativas de las plantas *icu3/icu3* presentan una curvatura extrema del limbo hacia el haz (Figura 61A). El gen *ICU3* ha recibido también la denominación de *HASTY* (*HST*; Telfer y Poethig, 1998). Hemos obtenido 27 plantas de fenotipo Ucul en la progenie F_1 de un cruzamiento *hst-5/hst-5* \times *ucu1-1/ucu1-1*. En la Tabla 46 se muestran los resultados del estudio de su descendencia F_2 y F_3 .

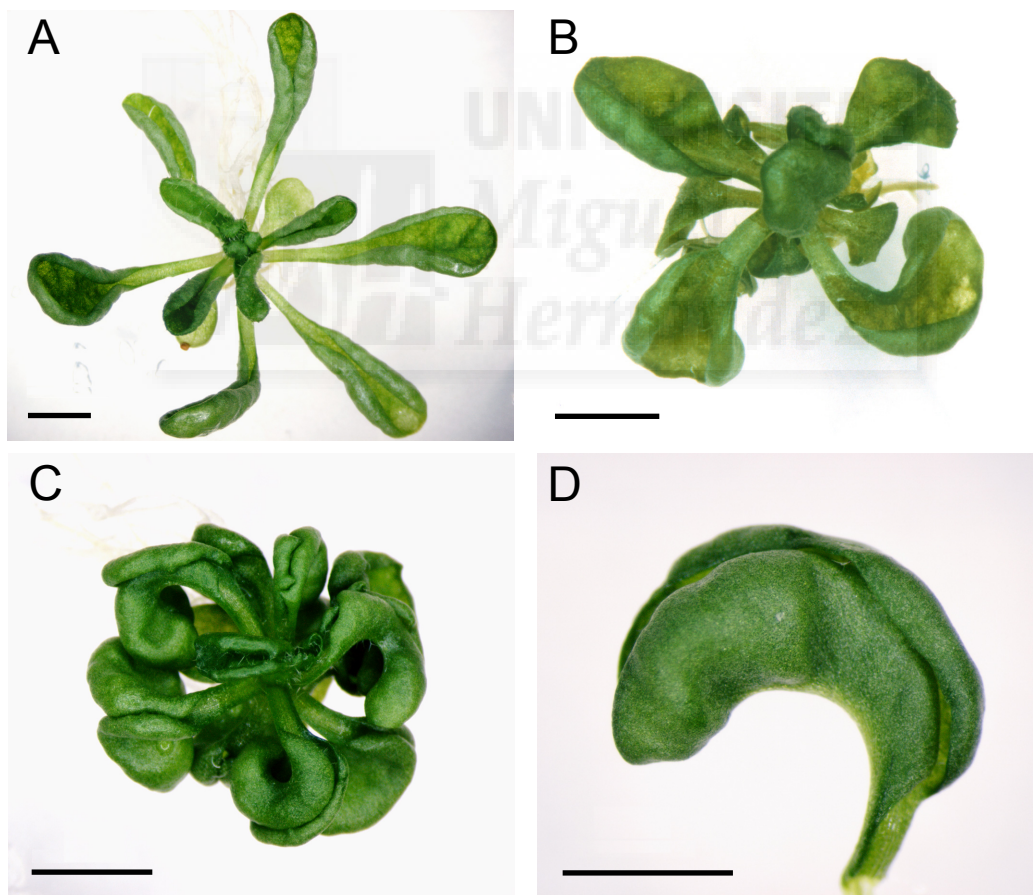


Figura 61.- Fenotipo de los dobles mutantes *ucu1 hst-5*. Las imágenes corresponden a plantas (A) *hst-5/hst-5* y (B) *ucu1-1/UCU1;hst-5/hst-5*. (C) Roseta basal y (D) detalle de una hoja del tercer nudo del doble mutante *ucu1-1/ucu1-1;hst-5/hst-5*. Las fotografías fueron tomadas 25 días después de la siembra. Las barras de escala indican 3 mm.

Tabla 46.- Segregación fenotípica en la progenie F₂ y F₃
de varios cruzamientos *hst-5/hst-5* × *ucu1-1/ucu1-1*

| Planta que se autofecundó | Clases fenotípicas | | | | | | | Segregación | | |
|------------------------------|--------------------|------|------|-----|------|------|------|-------------|-------------|----------|
| | Silvestre | Ucul | UcuE | Hst | Hst3 | Ucul | Icu3 | UcuE | Hipótesis | χ^2 |
| Ucul (1) F ₂ | 16 | 38 | 16 | 2 | 9 | | 6 | | 3:6:3:1:2:1 | 3,452 |
| Ucul (2) F ₂ | 15 | 40 | 21 | 4 | 7 | | 5 | | 3:6:3:1:2:1 | 4,377 |
| Icu3 Ucul (1) F ₃ | | | | 12 | 13 | | 10 | | 1:2:1 | 2,543 |
| Icu3 Ucul (2) F ₃ | | | | 9 | 14 | | 4 | | 1:2:1 | 1,889 |
| UcuE (3) F ₃ | | | 7 | | | | 3 | | 3:1 | 0,000 |

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 45, en la página 185.

Las plantas de fenotipo Hst Ucul, cuyo genotipo es *ucu1-1/UCU1;hst-5/hst-5*, presentan hojas vegetativas con un limbo muy recurvado hacia el haz, como sus ancestros *hst-5/hst-5*, además de una ligera curvatura hacia el envés menos extrema que la de las plantas Ucul (Figura 61B). Los dobles mutantes *ucu1-1/ucu1-1;hst-5/hst-5* presentan un fenotipo Hst UcuE (Figura 61C, D), en el que se manifiestan las características de sus parentales. Aunque el fenotipo de estos dobles mutantes pudiera considerarse aditivo, algunas de sus características recuerdan más al parental *hst-5* que al *ucu1*, lo que sugiere cierto grado de epistasia del gen *HST* sobre *UCU1*.

IV.5.2.3.1.3.- Los dobles mutantes *ucu1 icu5*

La mutación dominante *icu5* produce un fenotipo débil, estando el margen de algunas de sus hojas ligeramente recurvado hacia el haz (Figura 62A). Esta mutación es un alelo del gen *SHY2* (Candela *et al.*, en preparación), cuyo producto es la proteína IAA3, que participa en la modulación de la respuesta a las auxinas (Tian y Reed, 1999; Tian *et al.*, 2002).

Las 21 semillas F₁ obtenidas del cruzamiento *icu5/icu5* × *ucu1-1/ucu1-1* dieron lugar a plantas pequeñas, de roseta compacta, que resultaron estériles. Además, hemos obtenido 39 plantas F₁ a partir del cruzamiento *icu5/icu5* × *ucu1-3/ucu1-3*, que presentaron un fenotipo (Figura 62A) similar al de las plantas *axr2-1/AXR2;ucu1-3/UCU1* (véase el apartado IV.5.2.2.4, en la página 181). La Tabla 47 recoge los resultados del análisis de la progenie F₂ de este cruzamiento. La clase que hemos denominado Compacta incluye plantas de fenotipo foliar heterogéneo, cuyo genotipo es *icu5/-;ucu1-3/-*. La proporción 9:3:3:1 a la que se ajusta la segregación observada implica la existencia de una interacción sinérgica entre los alelos *ucu1-3* e *icu5* y que la



Figura 62.- Fenotipo de los dobles mutantes *ucu1 icu5* y *ucu1 icu6*. Las imágenes corresponden a rosetas de plantas (A) *ucu1-3/ucu1-3* (izquierda), *icu5/icu5* (derecha) e *icu5/ICU5;ucu1-3/UCUI* (centro). (B) Progenie resultante de la autofecundación de una planta *icu5/ICU5;ucu1-3/UCUI* y (C-D) dos de sus miembros, de la clase fenotípica heterogénea que hemos denominado Compacta. (E) Una planta *icu6/ICU6* y (F-G) miembros de una familia F₃ obtenida a partir de la autofecundación de un individuo *icu6/ICU6;ucu1-1/ucu1-1*, cuyos genotipos más verosímiles son (F) *icu6/-;ucu1-1/UCUI* y (G) *icu6/-;ucu1-1/ucu1-1*. Las fotografías fueron tomadas 25 días después de la siembra. Las barras de escala indican 3 (A, C-G) y 19 (B) mm.

severidad del fenotipo mutante depende del número de sus copias, tal como se propuso anteriormente para *axr2-1* (véase el apartado IV.5.2.2.4, en la página 181; Figura 59).

Hemos obtenido familias F₃ a partir de la autofecundación de plantas F₂ *icu5/-;ucu1-3/-*. Algunas de estas familias estuvo exclusivamente integrada por una clase fenotípica, cuyo genotipo debe ser *ucu1-3/ucu1-3;icu5/icu5* (Figura 62C-D).

Tabla 47.- Segregación fenotípica en la progenie F₂
de varios cruzamientos *icu5/icu5* × *ucu1-3/ucu1-3*

| Planta que se autofecundó | Clases fenotípicas | | | | Segregación | |
|-----------------------------|--------------------|------|-----------|------|-------------|----------|
| | Compacta | Icu5 | Silvestre | UcuD | Hipótesis | χ^2 |
| Compacta (1) F ₁ | 40 | 24 | 17 | 6 | 9:3:3:1 | 5,342 |
| Compacta (2) F ₁ | 49 | 18 | 17 | 7 | 9:3:3:1 | 0,448 |

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 45, en la página 185.

IV.5.2.3.1.4.- Los dobles mutantes *ucu1 icu6*

La mutación *icu6* es un alelo del gen *AXR3* (también denominado *IAA17*; Rouse *et al.* 1998; Candela *et al.*, en preparación), que también participa en la señalización de las auxinas. El fenotipo causado por *icu6* produce hojas fuertemente recurvadas hacia el haz (Figura 62E) y sus raíces carecen por completo de pelos absorbentes.

La progenie F₁ del cruzamiento *icu6/AXR3* × *ucu1-1/ucu1-1* estuvo compuesta por 13 plantas Ucul y 8 similares a los parentales *icu6/AXR3*, aunque con algunos rasgos del parental *ucu1-1/ucu1-1* (Figura 62F). La Tabla 47 recoge la segregación observada en la progenie F₂ resultante de la autofecundación de estas últimas, que se ajusta aceptablemente a una proporción 1:2:1:2:4:2:4, la que cabe esperar de la semidominancia de *ucu1-1* y la letalidad recesiva con efecto fenotípico en el heterocigoto de *icu6*.

Tabla 48.- Segregación fenotípica en la progenie F₂
de varios cruzamientos *ICU6/icu6* × *ucu1-1/ucu1-1*

| Planta que se autofecundó | Clases fenotípicas | | | | | | | | Segregación | |
|------------------------------|--------------------|------|------|------|-----------|-----------|---------------|---------------|-------------|--|
| | Silvestre | Ucul | UcuE | Icu6 | Icu6 Ucul | Icu6 UcuE | No germinaron | Hipótesis | χ^2 | |
| Ucul Icu6 (1) F ₁ | 9 | 9 | 8 | 8 | 25 | 9 | 22 | 1:2:1:2:4:2:4 | 5,156 | |

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 45, en la página 185.

Los dobles mutantes *icu6/AXR3;ucu1-1/ucu1-1* presentan una roseta muy compacta integrada por hojas muy recurvadas hacia el haz. Su ápice está además ligeramente recurvado hacia el envés (Figura 62G). El fenotipo de estas plantas, que manifiestan en mayor medida los rasgos de su parental *icu6* que los de *ucu1-1*, como la ausencia de pelos absorbentes en la raíz, sugiere que la primera de estas mutaciones es epistática sobre la segunda.

IV.5.2.3.1.5.- Los dobles mutantes *ucu1 ago1*

Los mutantes *ago1-51* y *ago1-52*, aislados e inicialmente denominados *icu9-1* e *icu9-2* en el laboratorio de J.L. Micol, manifiestan alteraciones de la dorsoventralidad que son patentes en varios de sus órganos, como las hojas vegetativas (Figura 63A). Las mutaciones *ago1-51* y *ago1-52* perturban el procesamiento de los intrones del gen *AGO1* (S. Jover, tesis doctoral en realización). El producto del gen *AGO1* es un elemento de la maquinaria de silenciamiento génico postranscripcional (Fagard *et al.*, 2000; véase el apartado I.4.5.2 de la Introducción, en la página 32).

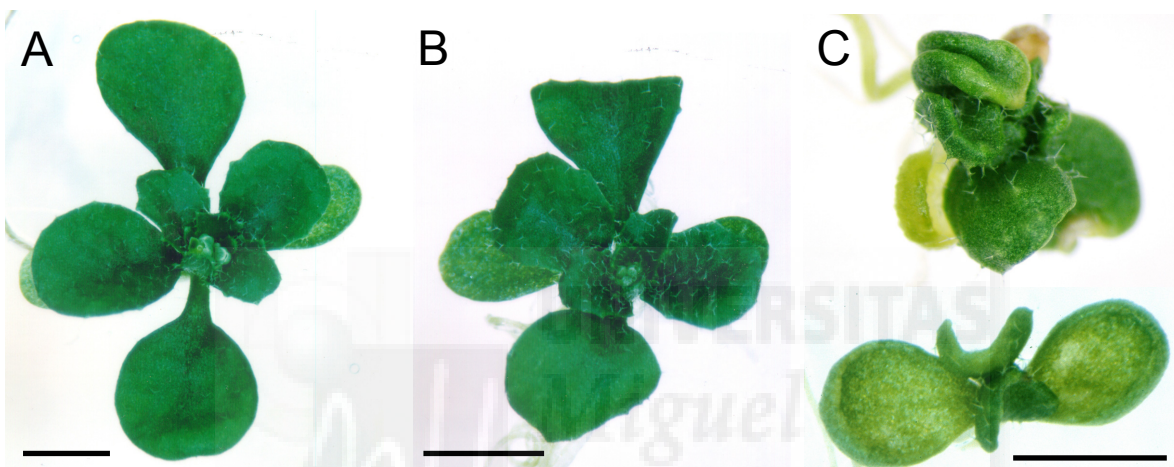


Figura 63.- Fenotipo de los dobles mutantes *ucu1 ago1*. Las imágenes corresponden a rosetas de plantas (A) *ago1-51/ago1-51*, (B) *ucu1-1/UCU1; ago1-51/ago1-51*, y (C) *ucu1-1/ucu1-1; ago1-51/ago1-51*. Las fotografías fueron tomadas 25 días después de la siembra. Las barras de escala indican 3 (A-B) y 2 (C) mm.

Hemos realizado el cruzamiento *ago1-51/ago1-51* × *ucu1-1/ucu1-1*. Las proporciones fenotípicas obtenidas en su F_2 , cuyos resultados se indican en la Tabla 49, se ajustan a lo esperado de la inexistencia de interacción génica entre dos genes no ligados. Sin embargo, los presuntos dobles mutantes *ago1-51/ago1-51; ucu1-1/ucu1-1*, son muy pequeños, con las hojas diminutas, de peciolo corto y ancho, y están ligeramente recurvadas hacia el haz. También presentan algunas hojas caliciformes y otras parcialmente radializadas, como su parental *ago1*. Hemos comprobado su naturaleza doble mutante mediante el estudio de familias F_3 en las que segregó el fenotipo *Ago1* (Tabla 49 y Figura 63E-F).

Tabla 49.- Segregación fenotípica en la progenie F₂ y F₃ de varios cruzamientos *ago1-51/ago1-51* × *ucu1-1/ucu1-1*

| Planta que se autofecundó | Clases fenotípicas | | | | | | | Segregación | |
|---------------------------|--------------------|------|------|------|-----------|-----------|-------------|-------------|--|
| | Silvestre | Ucul | UcuE | Ago1 | Ago1 Ucul | Ago1 UcuE | Hipótesis | χ^2 | |
| Ucul (1) F ₁ | 15 | 25 | 18 | 9 | 15 | 8 | 3:6:3:1:2:1 | 6,830 | |
| Ucul (2) F ₁ | 17 | 31 | 17 | 6 | 13 | 3 | 3:6:3:1:2:1 | 1,705 | |
| UcuE (1) F ₂ | | | 27 | | | 14 | 3:1 | 1,374 | |
| UcuE (2) F ₂ | | | 41 | | | 17 | 3:1 | 0,368 | |

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 45, en la página 185.

IV.5.2.3.2.- Los dobles mutantes *ucu1 tcu* y *ucu1 as2*

Las estirpes mutantes de la clase fenotípica Transcurvata (Berná, 1997; Berná *et al.*, 1999) presentan el margen de sus hojas vegetativas recurvado hacia el envés, de forma oblicua a la vena primaria, y corresponden a cuatro grupos de complementación, a los que hemos denominado *TCU1*, *TCU2*, *TCU3* y *AS2*. Este último agrupa a varios alelos de un gen previamente descrito (Iwakawa *et al.*, 2002; véase el apartado I.4.5.1 de la Introducción, en la página 30).

IV.5.2.3.2.1.- Los dobles mutantes *ucu1 tcu1*

Las hojas vegetativas de las plantas *tcu1-1a/tcu1-1a*, menos numerosas que las silvestres, presentan un peciolo largo y conforman una roseta aparentemente desorganizada. Hemos llevado a cabo un cruzamiento *tcu1-1a/tcu1-1a* × *ucu1-2/ucu1-2*, cuyos descendientes F₁ presentaron fenotipo Ucul y dieron lugar a la F₂ que se detalla en la Tabla 50. Las hojas de los dobles mutantes *ucu1-2/UCU1;tcu1-1a/tcu1-1a* (Figura 64A) presentan el limbo recurvado hacia el envés a lo largo de la vena primaria, como en el parental *ucu1*, y también transversalmente, como en *tcu1*. Sin embargo, los dobles mutantes *ucu1-2/ucu1-2;tcu1-1a/tcu1-1a* son más pequeños que cualquiera de sus parentales (Figura 64B), y presentan un color verde oscuro, siendo su fenotipo similar al de las plantas *bri1/bri1*. Para confirmar la identidad de estos dobles mutantes hemos estudiado varias familias F₃ obtenidas a partir de plantas F₂ cuyo genotipo era *ucu1-2/UCU1;tcu1-1a/tcu1-1a* (Tabla 50).

Los dobles mutantes de la F₂ del cruzamiento *ucu1-3/ucu1-3* × *tcu1-1a/tcu1-1a* presentan un fenotipo más extremo que los de sus parentales. Su roseta es muy compacta y está integrada por hojas pequeñas, arrugadas y recurvadas hacia el envés (Figura 64C-D). Su naturaleza doble mutante fue confirmada mediante el análisis de

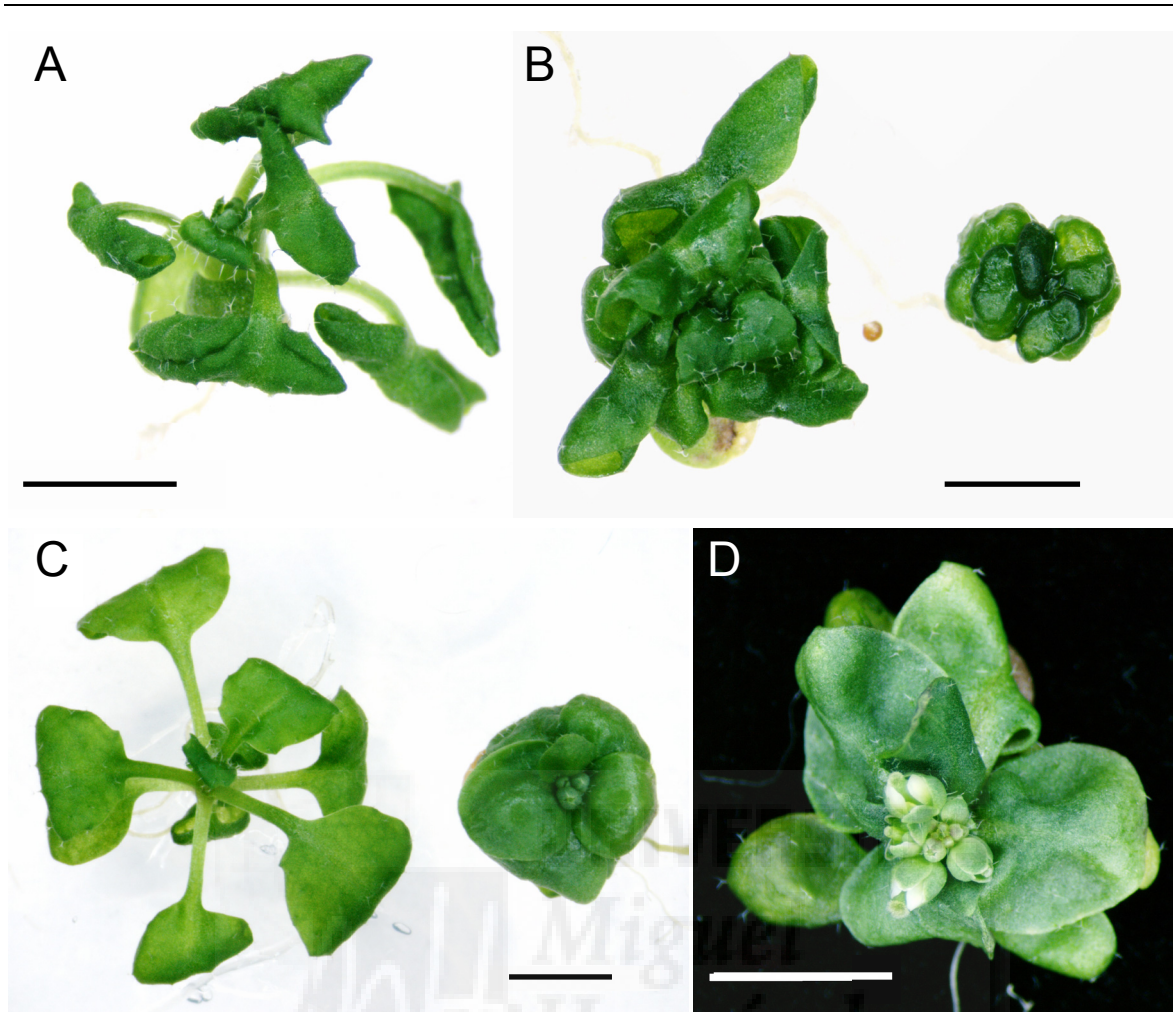


Figura 64.- Fenotipo de los dobles mutantes *ucul tcul*. Las imágenes corresponden a plantas (A) *ucul-1/UCU1;tcul-1a/tcul-1a*, (B) *ucul-2/ucul-2;TCU1/tcul-1a* (a la izquierda) y *ucul-2/ucul-2;tcul-1a/tcul-1a* (a la derecha), (C) *ucul-3/ucul-3;TCU1/tcul-1a* (a la izquierda) y *ucul-3/ucul-3;tcul-1a/tcul-1a* (a la derecha), y (D) *ucul-3/ucul-3;tcul-1a/tcul-1a*. Las fotografías fueron tomadas 25 (A-C) y 30 (D) días después de la siembra. Las barras de escala indican 3 mm.

Tabla 50.- Segregación fenotípica en la progenie F₂ y F₃ de varios cruzamientos *tcul-1a/tcul-1a* × *ucul-2/ucul-2*

| Planta que se autofecundó | Clases fenotípicas | | | | | | | | Segregación | |
|-----------------------------|--------------------|------|------|------|-----------|-----------|-------------|-----------|-------------|--|
| | Silvestre | Ucul | UcuE | Tcu1 | Ucul Tcu1 | UcuE Tcu1 | Tcu1 | Hipótesis | χ^2 | |
| Ucul (1) F ₁ | 20 | 51 | 30 | 11 | 13 | 6 | 3:6:3:1:2:1 | 4,369 | | |
| Ucul (2) F ₁ | 22 | 53 | 30 | 12 | 12 | 6 | 3:6:3:1:2:1 | 5,030 | | |
| Ucul Tcu (4) F ₂ | | | | 28 | 61 | 25 | 1:2:1 | 0,719 | | |

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 45, en la página 185.

familias F_3 (Tabla 51). Los dobles mutantes $ucu1-2/ucu1-2;tcu1-1a/tcu1-1a$ y $ucu1-3/ucu1-3;tcu1-1a/tcu1-1a$ se parecen a los $ucu1-3/ucu1-3;axr2-1/axr2-1$ (véase el apartado IV.5.2.2.4, en la página 181). Hemos considerado sinérgico el fenotipo de estos dobles mutantes, lo que sugiere alguna relación entre *TCU1* y la señalización de la auxina.

Tabla 51.- Segregación fenotípica en la progenie F_2 y F_3 de varios cruzamientos $ucu1-3/ucu1-3 \times tcu1-1a/tcu1-1a$

| Planta que se autofecundó | Clases fenotípicas | | | | Segregación | |
|---------------------------|--------------------|------|------|-----------|-------------|----------|
| | Silvestre | UcuD | Tcu1 | UcuD Tcu1 | Hipótesis | χ^2 |
| Silvestre (1) F_1 | 67 | 36 | 25 | 6 | 9:3:3:1 | 6,312 |
| Silvestre (2) F_1 | 57 | 26 | 33 | 7 | 9:3:3:1 | 6,864 |
| UcuD (1) F_2 | | 67 | | 20 | 3:1 | 0,096 |

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 45, en la página 185.

IV.5.2.3.2.2.- Los dobles mutantes *ucu1 tcu2*

Las hojas vegetativas de las plantas $tcu2-1b/tcu2-1b$ están dobladas transversalmente hacia el envés, su venación presenta una pigmentación verde más intensa que la de los tejidos intervenales, y sus peciolo son más gruesos que los silvestres (Figura 65A).

Hemos realizado un cruzamiento $tcu2-1b/tcu2-1b \times ucu1-1/ucu1-1$, en cuya F_2 esperábamos obtener una segregación 3:6:3:1:2:1, dada la recesividad de *tcu2-1b*, la semidominancia de *ucu1-1*, la inexistencia de ligamiento entre estas mutaciones y asumiendo que no interaccionan. Sin embargo, los fenotipos de las plantas $ucu1-1/UCU1;tcu2-1b/tcu2-1b$ (Figura 65C) y $ucu1-1/UCU1$ son prácticamente indistinguibles, al igual los de los individuos $ucu1-1/ucu1-1;tcu2-1b/tcu2-1b$ (Figura 65B) y $ucu1-1/ucu1-1$. Al reducir estas cuatro clases genotípicas a dos fenotípicas, la segregación fenotípica observada se ajusta a una proporción 3:8:4:1, según se detalla en la Tabla 52. Por su parte, la segregación fenotípica de la progenie F_2 del cruzamiento $ucu1-3/ucu1-3 \times tcu2-1b/tcu2-1b$ se ajustó a una proporción 9:3:3:1 ($\chi^2 = 5,273$). El genotipo de los dobles mutantes $ucu1-3/ucu1-3;tcu2-1b/tcu2-1b$ fue confirmado en familias F_3 . También en este caso hemos llegado a la conclusión de que las mutaciones *ucu1* y *tcu2* no interaccionan.



Figura 65.- Fenotipo de los dobles mutantes *ucu1 tcu2*. Las imágenes corresponden a plantas (A) *tucu2-1b/tucu2-1b*, (B) *ucu1-1/ucu1-1;tucu2-1b/tucu2-1b* (a la izquierda) y *ucu1-1/ucu1-1;TCU2/tucu2-1b* (a la derecha), (C, D) *ucu1-1/UCU1;tucu2-1b/tucu2-1b*, y (E) *ucu1-3/ucu1-3;tucu2-1b/tucu2-1b*. Las fotografías fueron tomadas 25 días después de la siembra. Las barras de escala indican 3 mm.

Tabla 52.- Segregación fenotípica en la progenie F₂ y F₃ de varios cruzamientos *tucu2-1b/tucu2-1b* × *ucu1-1/ucu1-1*

| Planta que se autofecundó | Clases fenotípicas | | | | Segregación | |
|---------------------------|--------------------|------|------|------|-------------|----------|
| | Silvestre | Ucul | UcuE | Tcu2 | Hipótesis | χ^2 |
| Ucul (1) F ₂ | 26 | 56 | 38 | 11 | 3:8:4:1 | 3,270 |
| Ucul (2) F ₂ | 10 | 40 | 29 | 8 | 3:8:4:1 | 6,349 |
| Ucul (3) F ₃ | 15 | 21 | 17 | 5 | 3:8:4:1 | 4,724 |

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 45, en la página 185.

IV.5.2.3.2.3.- Los dobles mutantes *ucu1 tcu3*

Las plantas *tcu3-1a/tcu3-1a* presentan un fenotipo Transcurvata más debil que el de los restantes miembros de su clase (Figura 66A). La segregación fenotípica en la F₂ de un cruzamiento *tcu3-1a/tcu3-1a* × *ucu1-2/ucu1-2* se ajustó aceptablemente a una

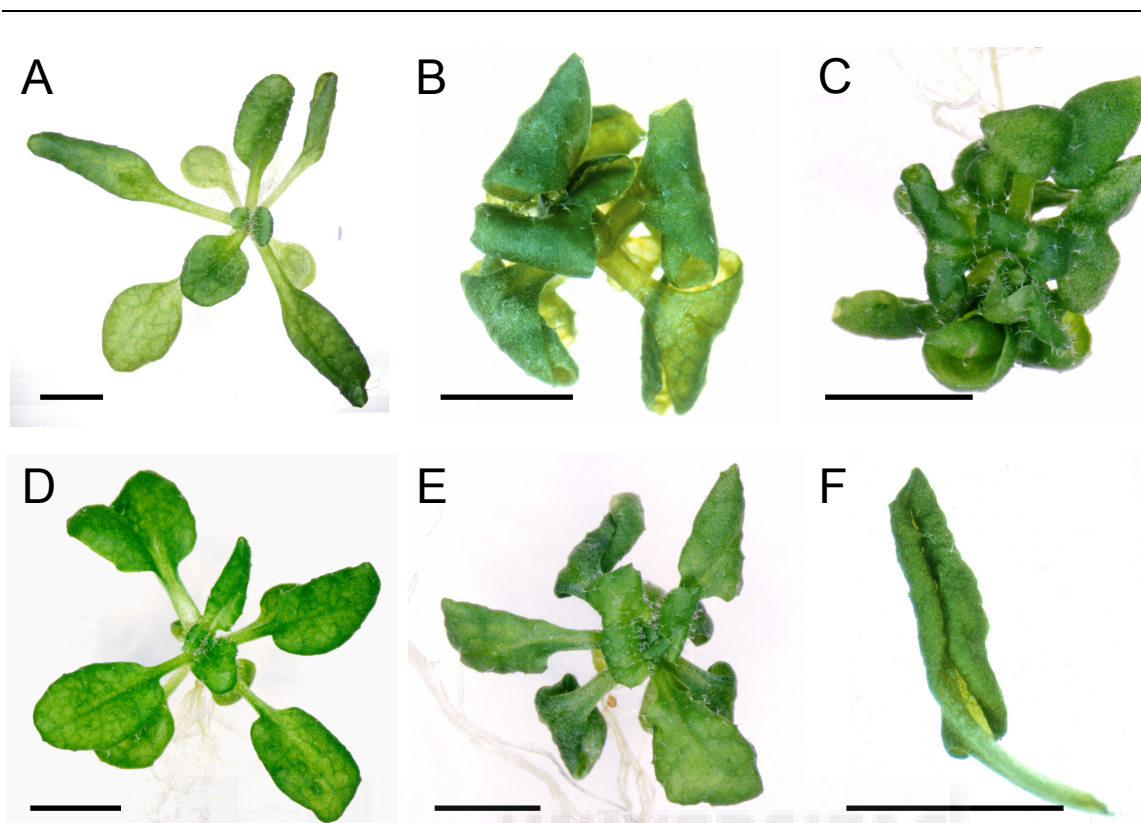


Figura 66.- Fenotipo de los dobles mutantes *ucu1 tuc3* y *ucu1 as2*. Las imágenes corresponden a plantas (A) *tuc3-1a/tuc3-1a*, (B) *ucu1-2/UCU1;tuc3-1a/tuc3-1a*, (C) *ucu1-2/ucu1-2;tuc3-1a/tuc3-1a*, (D) *as2-11/as2-11*, y (E, F) *ucu1-3/ucu1-3;as2-11/as2-11*. Las fotografías fueron tomadas 25 días después de la siembra. Las barras de escala indican 3 mm.

segregación 3:6:3:1:2:1 (Tabla 53), la que cabe esperar de la inexistencia de interacción génica entre ambos loci. También en este caso fue necesario confirmar la identidad de los presuntos dobles mutantes F_2 mediante el análisis de familias F_3 segregantes.

Tabla 53.- Segregación fenotípica en la progenie F_2 y F_3
de varios cruzamientos *tuc3-1a/tuc3-1a* \times *ucu1-2/ucu1-2*

| Planta que se autofecundó | Clases fenotípicas | | | | | | | | Segregación | |
|---------------------------|--------------------|------|------|------|-----------|-----------|-----------|-------------|-------------|--|
| | Silvestre | Ucul | UcuE | Tcu3 | Ucul Tcu3 | UcuE Tcu3 | UcuE Tcu3 | Hipótesis | χ^2 | |
| Ucul (1) F_2 | 24 | 45 | 27 | 12 | 18 | 9 | | 3:6:3:1:2:1 | 2,422 | |
| Ucul (2) F_2 | 23 | 43 | 30 | 11 | 23 | 10 | | 3:6:3:1:2:1 | 5,143 | |
| Ucul Tcu (2) F_3 | | | | 36 | 61 | 39 | | 1:2:1 | 1,574 | |
| Ucul Tcu (7) F_3 | | | | 24 | 30 | 18 | | 1:2:1 | 3,000 | |

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 45, en la página 185.

IV.5.2.3.2.4.- El doble mutante *ucu1 as2*

Las hojas vegetativas de las plantas *as2-11/as2-11* presentan el limbo recurvado hacia el envés transversalmente a la vena primaria (Figura 66D). Esta estirpe es portadora de una mutación en el gen *AS2* (Berná, 1997; Berná *et al.* 1999), cuyo producto es una proteína con cremalleras de leucina implicada en la especificación temprana de los primordios (véase el apartado I.4.5.1 de la Introducción, en la página 30).

Hemos realizado un cruzamiento *ucu1-3/ucu1-3* × *as2-11/as2-11*, en cuya F_2 no fue posible la asignación inequívoca de todos los individuos a clases fenotípicas, por lo que se recurrió a elegir varias plantas muy semejantes a sus parentales *ucu1-3/ucu1-3* y estudiar su progenie F_3 . Tal como cabía esperar, algunas de dichas plantas F_2 resultaron ser *ucu1-3/ucu1-3;as2-11/-*, y la cuarta parte de su descendencia F_3 manifestó un fenotipo meramente aditivo, que presuntamente corresponde a los dobles mutantes (Figura 66E-F).





V.- DISCUSIÓN

V.- DISCUSIÓN

V.1.- Justificación de la metodología empleada en esta Tesis

Tal como ha sucedido en las comunidades de investigadores que concentran su atención en sistemas modelo animales como *Drosophila melanogaster* o *Caenorhabditis elegans*, el análisis causal de cualquier proceso biológico suele tener como punto de partida en *Arabidopsis thaliana* la inducción y aislamiento de mutantes, cuya caracterización morfológica y fisiológica se lleva a cabo paralelamente a la identificación del gen correspondiente (Page y Grossniklaus, 2002). Esta última se consigue en algunos casos a partir de mutaciones insercionales y en la mayoría empleando alelos no señalizados, lo que obliga a seguir abordajes posicionales, en los que se acorta progresivamente la longitud de la región candidata mediante etapas sucesivas de análisis del ligamiento de la mutación a estudio a marcadores moleculares de diferentes tipos (Lukowitz *et al.*, 2000). Aunque es muy laborioso, el análisis posicional permite casi invariablemente identificar el gen dañado por la mutación, especialmente si se cuenta con varios de sus alelos. La disponibilidad de la secuencia del genoma de *Arabidopsis thaliana* supone una gran ayuda en este terreno, dado que permite el desarrollo de nuevos marcadores moleculares y la elección de genes candidatos para su secuenciación con el objetivo de identificar las mutaciones que eventualmente puedan contener.

En esta Tesis se ha intentado contribuir a la comprensión del desarrollo vegetal en general y la organogénesis de la hoja en particular, tomando como material de partida varios alelos mutantes de dos genes a los que hemos denominado *ULTRACURVATA1* (*UCU1*) y *UCU2*. Hemos considerado a los genes *UCU* candidatos a estar implicados en la especificación y/o el mantenimiento de la dorsoventralidad foliar, dado que sus alelos mutantes *ucu* deforman las hojas vegetativas, confiriéndoles un aspecto circinado, por su enrollamiento en espiral hacia el envés, a diferencia de las silvestres, que son aplanadas. Hemos caracterizado la morfología y algunos aspectos de la fisiología de los mutantes *ucu*, establecido sus interacciones genéticas entre sí y con mutaciones en otros genes, y determinado la naturaleza molecular de los genes *UCU*, según se discute en los apartados que siguen.

V.2.- Aislamiento de los mutantes *ucu*

Las hojas de las plantas son órganos laterales que emergen de los flancos del meristemo apical del tallo. A su forma y tamaño finales contribuyen la división, la

expansión y la diferenciación celular (revisado en Poethig, 1997; Tsiantis y Langdale, 1998; Scanlon, 2000b; Byrne *et al.*, 2001; Micol y Hake, 2003; véase el apartado I.4, en la página 15). Para que las hojas de *Arabidopsis thaliana* adquieran la bilateralidad que las caracteriza y las distingue de otros órganos vegetales, cuya simetría es radial, los tejidos dorsales (adaxiales) y ventrales (abaxiales) deben coordinar su crecimiento, mediante mecanismos que probablemente operan desde las primeras fases del desarrollo del órgano y se mantienen activos hasta que alcanza la madurez. Se deriva de lo anterior que los mutantes que muestran desviaciones de la forma plana de la hoja silvestre pueden estar alterados en la iniciación o el mantenimiento de los procesos que controlan el crecimiento de los tejidos adaxiales y abaxiales, o en su coordinación.

Los mutantes *ucu1-1/ucu1-1*, *ucu1-2/ucu1-2* y *ucu1-3/ucu1-3* fueron aislados tras una mutagénesis con EMS, llevada a cabo en el laboratorio de J.L. Micol con anterioridad a esta Tesis (Berná, 1997; Berná *et al.*, 1999). Otro tanto ocurrió con la mutación *ucu2-1*, que fue inducida mediante bombardeo con neutrones rápidos (Robles, 1999). El espectro de las mutaciones *ucu* se ha ampliado en esta Tesis mediante la identificación de tres nuevos alelos del gen *UCU2*. Uno de ellos, *ucu2-2*, fue inducido mediante rayos X y formaba parte de una colección de mutantes de dominio público. Los dos restantes, *ucu2-3* y *ucu2-4*, fueron inducidos mediante el ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens*. Mientras que *ucu2-3* fue aislado en una búsqueda de mutantes llevada a cabo en el laboratorio de J.L. Micol, *ucu2-4* se obtuvo de una colección de noqueos (véase el apartado IV.4.2.3.2, en la página 170).

V.3.- Interpretación del fenotipo de los mutantes *ucu*

Nuestros resultados sugieren que para la adquisición de la morfología foliar aplanada que caracteriza a las hojas silvestres de *Arabidopsis thaliana* se requieren, entre otras, las funciones de los genes *UCU1* y *UCU2*. La actividad del primero de ellos parece más necesaria para las células abaxiales que para las adaxiales, así como requerirse en mayor medida en las células apicales que en las basales del órgano. Estos genes también están implicados en otros aspectos del desarrollo y parecen intervenir en la señalización hormonal de las auxinas y los brasinosteroides, tal como se discute más adelante.

La forma circinada de las hojas de los mutantes *ucu* puede deberse a la descoordinación del crecimiento entre sus tejidos adaxiales y abaxiales. Esta descoordinación se manifiesta a lo largo del eje longitudinal del órgano, dado que las hojas de los mutantes *ucu* son apreciablemente más cortas que las silvestres, mientras

que su expansión lateral parece no estar alterada (véanse los apartados IV.2.1 y IV.2.2.1, en las páginas 108 y 115, respectivamente).

V.3.1.- El fenotipo de los mutantes *ucu1*

Una causa verosímil de la deformidad de las hojas de los mutantes *ucu1* es el tamaño de sus células epidérmicas abaxiales, que son considerablemente menores que las silvestres, mientras que las adaxiales no parecen manifiestamente alteradas (véase el apartado IV.2.1.5, en la página 113; Pérez-Pérez *et al.*, 2002), lo que rinde una superficie abaxial menor que la adaxial y conlleva el enrollamiento de la hoja hacia el envés. La severa reducción del tamaño de las células del envés que manifiestan los mutantes *ucu1* sugiere que la actividad del gen *UCU1* es más necesaria para las células abaxiales, como las epidérmicas y las vasculares, que para las adaxiales. También parece requerirse diferencialmente la función de *UCU1* a lo largo del eje longitudinal de la hoja. En efecto (véase el apartado IV.1.3, en la página 107), las distintas combinaciones de los alelos *ucu1* pueden ordenarse de menor a mayor severidad de su fenotipo mutante, observándose en los primeros que se deforma únicamente la región apical de la hoja, mientras que en los últimos lo hace todo el limbo y se acorta el peciolo. Es razonable proponer, a la vista de estos resultados, que la función de *UCU1* se requiere diferencialmente a lo largo de los ejes proximodistal y dorsoventral de la hoja, de forma análoga a lo que ocurre con la proteína Wingless en el establecimiento de la polaridad del disco imaginal del ala de *Drosophila melanogaster* (Neumann y Cohen, 1997).

Los brasinosteroides, análogos estructurales de las hormonas esteroides de los animales, son reguladores del crecimiento vegetal que controlan procesos de desarrollo como la expansión celular, la diferenciación vascular, la etiolación, el desarrollo reproductivo y las respuestas al estrés (revisado en Clouse, 1996b; Sakurai y Fujioka, 1997; Bishop y Yokota, 2001; Bishop y Koncz, 2002). Tal como se comenta en otros apartados de esta Tesis, se han descrito numerosos mutantes enanos de *Arabidopsis thaliana*, la mayoría de los cuales son deficitarios en brasinosteroides, como *de-etiolated2* (*det2*) o *diminuto* (*dim*) (véase el apartado IV.5.2.2, en la página 176). Muchos de ellos presentan una arquitectura corporal similar a la de las plantas *ucu*, lo que nos indujo a estudiar los efectos de la administración de brasinosteroides sobre los mutantes *ucu* (véase el apartado IV.2.3.3, en la página 123). Una característica diferencial entre los mutantes alterados en la biosíntesis de los brasinosteroides y los *ucu* es la forma circinada de las hojas vegetativas, que es exclusiva de estos últimos. Las hojas de los mutantes deficitarios en brasinosteroides están arrugadas y son pequeñas, como

consecuencia de una reducción significativa tanto del tamaño como del número de sus células (Nakaya *et al.*, 2002), mientras que sólo el tamaño de las células abaxiales parece afectado en los mutantes *ucu1*.

La adición de brasinosteroides al medio de cultivo no restaura el fenotipo silvestre en los mutantes *ucu*, lo que permite excluir la posibilidad de que padezcan alteraciones en la síntesis de estas fitohormonas. Las plantas *ucu1-3/ucu1-3* son poco sensibles, y las *ucu1-1/ucu1-1* y *ucu1-2/ucu1-2*, casi totalmente insensibles, a los efectos del 24-epibrasinólido, un brasinosteroides que inhibe el crecimiento radicular de su ancestro silvestre (véase el apartado IV.2.3.3, en la página 123). En consecuencia, los mutantes *ucu1* no están alterados en la síntesis de los brasinosteroides, aunque sí en su percepción.

El enanismo de los mutantes *ucu* se debe al acortamiento de sus órganos (véase el apartado IV.2.2.1, en la página 115). Hemos comprobado en la epidermis del hipocotilo de los mutantes *ucu1* que su acortamiento con respecto al tipo silvestre no se debe a una disminución del número de sus células sino, por el contrario, a una reducción de la longitud de éstas (véase el apartado IV.2.2.2, en la página 116; Pérez-Pérez *et al.*, 2002). Esta reducción de la expansión celular a lo largo del eje longitudinal podría ser una consecuencia de la insensibilidad de los mutantes *ucu1* a los brasinosteroides (véase el apartado IV.2.3.3, en la página 123). En efecto, estas fitohormonas inducen en el tipo silvestre la expresión de algunos genes, como *MERISTEM-5* (*MERI-5*; Medford *et al.*, 1991) y *TOUCH4* (*TCH4*; Xu *et al.*, 1995b), que cifran endotransglucosilasas de xiloglucano que son necesarias para la expansión celular (Campbell y Braam, 1999). Los brasinosteroides también intervienen, junto con las auxinas, en la orientación correcta de los microtúbulos corticales durante la expansión celular (Mayumi y Shibaoka, 1995). De hecho, la administración de brasinosteroides restaura la organización de los microtúbulos corticales que se encuentra alterada en los mutantes *boule1* (*bul1*; Catterou *et al.*, 2001a) de *Arabidopsis thaliana*, a los que también se ha denominado *dwarf7* (*dwf7*; Choe *et al.*, 1999), y *sterol1* (*ste1*; Gachotte *et al.*, 1995), todos los cuales son deficitarios en estas hormonas (Catterou *et al.*, 2001b). Por otra parte, el mutante enano *de-etiolated3* (*det3*) presenta una expansión celular reducida y una sensibilidad a los brasinosteroides menor que la del tipo silvestre (Schumacher *et al.*, 1999). *DET3* cifra la subunidad C de una ATP sintetasa ubicada en la membrana vacuolar (denominada también ATPasa vacuolar o ATPasa-V), que contribuye a la expansión celular controlando la incorporación de iones a la vacuola, con lo que modula la turgencia de la célula (Schumacher y Chory, 2000). Se ha propuesto que los brasinosteroides controlan la expansión celular mediante la

regulación de la actividad de la ATPasa-V. Se ha demostrado *in vitro*, además, que esta ATPasa es activada por fosforilación por BRI1, el receptor de los brasinosteroides (Schumacher *et al.*, 1999).

Las hojas de los mutantes *ucu1* presentan un número de capas celulares internas superior al silvestre, lo que pudiera deberse a que su enrollamiento en espiral dificulta el acceso de la luz a los tejidos internos, que proliferan para compensar el déficit lumínico que padecen. Además, no es fácil distinguir inequívocamente en las hojas de los mutantes *ucu1* los límites del mesófilo en empalizada, un tejido adaxial, y el mesófilo lagunar, que es abaxial. Este rasgo fenotípico podría deberse a un cambio en la identidad de las células abaxiales, que se transforman en adaxiales. En los tejidos internos engrosados de las hojas de los mutantes *ucu1* se observan numerosas células de pequeño tamaño, un rasgo que también presentan las plantas transgénicas en las que se expresa constitutivamente el gen *CycD3;1*, cuyas hojas están recurvadas hacia el envés (Dewitte *et al.*, 2003). El alelo silvestre de este gen, cuya actividad es inducida por los brasinosteroides (Hu *et al.*, 2000; Müssig *et al.*, 2002), promueve la división celular en los primordios foliares, aunque también se expresa en los tejidos adaxiales de las hojas adultas (Dewitte *et al.*, 2003). Esto sugiere que la actividad del gen *CycD3;1* podría encontrarse incrementada en las hojas de los mutantes *ucu1*, lo que causaría la hipertrofia de sus tejidos internos.

A los antedichos indicios de que los mutantes *ucu1* padecen alguna perturbación de la señalización de los brasinosteroides, proceso en el que el gen *UCU1* debe estar implicado, cabe añadir que las plantas *ucu1/ucu1* muestran fotomorfogénesis constitutiva (véase el apartado IV.2.2.3, en la página 116), del mismo modo que los mutantes que están alterados en la síntesis de los brasinosteroides, como *det2* y *dim*, o en su percepción, como *bri1* y *det3* (Li *et al.*, 1996; Klahre *et al.*, 1998; Li y Chory, 1997; Cabrera y Poch *et al.*, 1993). Este comportamiento de los mutantes *det2*, *dim*, *bri1* y *det3* se ha interpretado en el sentido de que los brasinosteroides intervienen en el crecimiento etiolado de las plántulas en la oscuridad (Li *et al.*, 1996).

Es destacable, por último, que tanto el fenotipo de los mutantes *ucu1* como sus respuestas a la administración de auxinas sugieren anomalías en la señalización de estas fitohormonas. En efecto, las raíces de los mutantes *ucu1* son más cortas y gruesas que las silvestres y muestran una gran densidad de pelos absorbentes (véase el apartado IV.2.2.4, en la página 118). Esta morfología de la raíz es similar a la de las plantas transgénicas en las que el nivel endógeno de las auxinas es superior al silvestre, como consecuencia de la expresión constitutiva de los genes de su biosíntesis (Boerjan *et al.*,

1994; Romano *et al.*, 1995; Delarue *et al.*, 1998), y puede fenocopiarse administrando auxinas al tipo silvestre (véase el apartado IV.2.3.2, en la página 121). También hemos observado una hipersensibilidad moderada de los mutantes *ucu1* a la administración de auxinas (véase el apartado IV.2.3.2, en la página 121). Esta respuesta ante las auxinas exógenas podría deberse a que su concentración endógena es mayor en los mutantes *ucu1* que en su ancestro silvestre. Alternativamente, puede considerarse posible que los mecanismos de transducción de esta señal hormonal sean más activos en estos mutantes que en el tipo silvestre.

V.3.2.- El fenotipo de los mutantes *ucu2*

A pesar de su gran parecido a primera vista, los mutantes *ucu2* y *ucu1* presentan rasgos que les distinguen. Cabe destacar en primer lugar que no hemos encontrado diferencias netas entre la forma o el tamaño de las células epidérmicas foliares de los mutantes *ucu2* y las de sus ancestros silvestres, ni tampoco en las de los tejidos internos de la hoja (véase el apartado IV.2.1.5, en la página 113). Sin embargo, la longitud de la vena primaria es menor en las hojas de los mutantes *ucu2* que en las silvestres, lo que podría explicar su morfología circinada, dado que este conducto vascular es enteramente abaxial y, debido a su lignificación y la consecuente rigidez, puede contribuir notablemente a la morfología final del órgano. También se aprecia este acortamiento de la vena primaria en las hojas de los mutantes *ucu1*.

Los mutantes *ucu2* son menos sensibles que el tipo silvestre a la inhibición del crecimiento radicular causada por la adición de brasinosteroides al medio de cultivo (véase el apartado IV.2.3.3, en la página 123). Aunque este resultado sugiere que el gen *UCU2* podría participar, junto con *UCU1*, en la señalización de los brasinosteroides, la insensibilidad de los mutantes *ucu2* al brasinólido no es tan acusada como en los *ucu1* y las plantas *ucu2/ucu2* germinan en la oscuridad tal como lo hace su ancestro silvestre (véase el apartado IV.2.2.3, en la página 116). Además, los mutantes *ucu2* son enanos, pero a diferencia de los *ucu1*, sus células no presentan una reducción obvia en su expansión longitudinal. A su menor tamaño contribuye, aunque es dudoso que sea el único factor determinante, la rotación helicoidal de sus órganos.

La respuesta fisiológica más notable de los mutantes *ucu2* es su sensibilidad al NPA y el TIBA, dos inhibidores del flujo de auxinas (véase el apartado IV.2.3.2, en la página 121), que es mayor que la de sus ancestros silvestres. La auxina es efluída de las células de *Arabidopsis thaliana* por los transportadores de la familia PIN (Friml y Palme, 2002), que están ubicados en la región basal de la membrana celular. El transporte de

auxina en sentido contrario, su influjo, es llevado a cabo por la permeasa AUX1 (Bennett *et al.*, 1996; Marchant *et al.*, 1999). Además de estas proteínas, contribuyen también a modular la concentración intracelular de auxinas los transportadores del tipo ABC (*ATP-binding cassette*), que son similares a las proteínas de transporte de la familia MDR (*multidrug resistance proteins*) animales, también llamadas glicoproteínas P (Gaedeke *et al.*, 2001; Noh *et al.*, 2001; Luschnig, 2002). Uno de los genes de *Arabidopsis thaliana* cuyo producto es un transportador ABC es *AtMDR1*, cuyos alelos mutantes deforman los cotiledones, recurvándolos hacia el envés, y arrugan las hojas vegetativas, a la vez que perturban el transporte de las auxinas (Noh *et al.*, 2001). Además, los dobles mutantes para el gen *AtMDR1* y su parálogo *P-glycoprotein1* (*AtPGP1*; Noh *et al.*, 2001) son fenotípicamente indistinguibles de las plantas *ucu2/ucu2*, manifestando enanismo, hojas circinadas y rotación helicoidal de sus órganos. Se ha propuesto que las proteínas *AtMDR1* y *AtPGP1* intervienen en el eflujo de la auxina y contribuyen a evitar la acumulación intracelular de esta hormona (Luschnig, 2002). A este respecto, cabe considerar la posibilidad de que la proteína UCU2 esté implicada en el transporte de la auxina regulando a *AtMDR1* y *AtPGP1*. Para contrastar esta hipótesis sería conveniente cuantificar la concentración intracelular y el transporte de auxina en los mutantes *ucu2*, así como la obtención de triples mutantes *ucu2/ucu2;atpgp1/atpgp1;atmdr1/atmdr1*.

Se han identificado recientemente algunos de los genes implicados en el establecimiento de los patrones de crecimiento radial de los órganos vegetales (Hashimoto, 2002). Se conocen varios mutantes de *Arabidopsis thaliana* que muestran rotación helicoidal de los órganos que presentan simetría radial en el tipo silvestre, como *lefty1* y *lefty2*, portadores de mutaciones dominantes en dos genes parálogos que cifran las tubulinas α TUA6 y TUA4, respectivamente, que contribuyen a la correcta disposición de los microtúbulos corticales (Thitamadee *et al.*, 2002). La orientación de los microtúbulos corticales también se encuentra alterada en los mutantes *spiral1* (*spr1*) y *spr2*, que presentan rotación helicoidal de sus órganos (Furutani *et al.*, 2000). Tal como hemos comentado en la página 200, algunas fitohormonas, como las auxinas y los brasinosteroides, participan en el control de la orientación de los microtúbulos corticales (Catterou *et al.*, 2001b). Sin embargo, la rotación helicoidal que manifiestan los mutantes *ucu2* (véase el apartado IV.2.2.6, en la página 119) no se ha observado en ninguno de los mutantes alterados en la síntesis o la percepción de los brasinosteroides (Catterou *et al.*, 2001b), ni tampoco en las plantas *ucu1*.

La rotación helicoidal de los mutantes *ucu2* podría relacionarse con la causada por los alelos mutantes del gen *LOPPED1* (*LOP1*; Carland y McHale, 1996), también llamado

TORNADO1 (*TRN1*; Cnops *et al.*, 2000). Estos mutantes manifiestan un fenotipo muy pleiotrópico, que incluye anomalías en los patrones de expansión celular, que causan la rotación helicoidal de varios órganos (Carland y McHale, 1996). Las aberraciones morfológicas de los mutantes *lop1* están causadas por un eflujo insuficiente de auxinas (Carland y McHale, 1996). Esta observación también sugiere que la rotación helicoidal de los órganos de los mutantes *ucu2* puede deberse a la acumulación intracelular de auxina, como consecuencia de un eflujo insuficiente, tal como se ha comentado en el párrafo anterior.

V.4.- Naturaleza molecular del gen *UCU1*

Hemos clonado posicionalmente el gen *UCU1* (véase el apartado IV.3.2.3.3, en la página 144; Pérez-Pérez *et al.*, 2002), demostrando que su producto es una quinasa muy similar a las proteínas SHAGGY (SGG) de *Drosophila melanogaster* (Siegfried *et al.*, 1990) y GLYCOGEN SHYNTASE KINASE3- β (GSK3) de *Homo sapiens* (Woodgett, 1990). En los metazoos, las quinasas SGG y GSK3 participan en diversos procesos de desarrollo, tales como el establecimiento de la polaridad de los segmentos en *Drosophila melanogaster*, la especificación de los ejes embrionarios en *Xenopus laevis*, o la determinación de destinos celulares y la formación de tumores en los mamíferos (revisado en Ferkey y Kimelman, 2000; Kim y Kimmel, 2000; Cohen y Frame, 2001).

SGG es un elemento de la ruta de señalización de Wingless (Wg; denominada Wnt en otros metazoos) en *Drosophila melanogaster*. En ausencia de Wg, SGG permanece activa y fosforila a la proteína Armadillo, a la que se denomina β -catenina en otras especies animales. La forma fosforilada de Armadillo es marcada por la ubiquitina, lo que conduce a su degradación por el proteosoma. Por el contrario, la unión de Wg al receptor de membrana Frizzled tiene como consecuencia la inhibición de SGG, que no fosforila a Armadillo, la cual, a su vez, se acumula en el citoplasma y se transloca al núcleo, en donde interactúa con los genes que constituyen las dianas de la ruta de Wg (revisado en Wodarz y Nusse, 1998; Bejsovec, 1999; Dierick y Bejsovec, 1999; Smalley y Dale, 1999; Sakanaka *et al.*, 2000; Sharpe *et al.*, 2001; Moon *et al.*, 2002).

La familia *AtSK* (*Arabidopsis thaliana* SHAGGY-like) incluye 10 genes homólogos de SGG y GSK3 (Jonak *et al.*, 1995; Dornelas *et al.*, 1998; 1999; Tichtinsky *et al.*, 1998; Charrier *et al.*, 2002; revisado en Jonak y Hirt, 2002). Aunque se han descrito los patrones de expresión espaciales y temporales de estos genes de *Arabidopsis thaliana* (Tichtinsky *et al.*, 1998; Dornelas *et al.*, 1999; 2000; Charrier *et al.*, 2002), la inexistencia de mutaciones ha dificultado la comprensión de sus funciones en el desarrollo vegetal.

Parece razonable asumir la existencia de un gen ancestral similar a *SGG* y *GSK3* en un eucariota unicelular anterior a la divergencia entre las plantas y los animales, que experimentó sucesivas duplicaciones en el reino vegetal, que han dado lugar a la familia *AtSK* (Dornelas *et al.*, 1998).

El producto del gen *UCU1* es la quinasa de proteínas SHAGGY-like *etha* (EC 2.7.1.-), también llamada *AtSK21* (Dornelas *et al.*, 1997; 1999; Charrier *et al.*, 2002). *AtSK21 (UCU1)* se expresa en todos los tejidos estudiados, aunque a bajo nivel (Charrier *et al.*, 2002). Los alelos mutantes *ucu1-1* y *ucu1-2* son idénticos y causan una sustitución de un residuo de glutamato (E) por otro de lisina (K), lo que cambia la secuencia consenso TREEIR por TREKIR en el subdominio X de la proteína (véase el apartado IV.3.2.3.3, en la página 144; Pérez-Pérez *et al.*, 2002). Este subdominio parece implicado en la interacción de *SGG* y *GSK3* con proteínas reguladoras (Ferkey y Kimelman, 2002; Fraser *et al.*, 2002). De hecho, la actividad quinasa de *SGG* y *GSK3* es modulada por su unión alternativa a dos proteínas, la axina, que la estimula, y la GBP (*GSK3 binding protein*, también llamada FRAT en los mamíferos), que la inhibe (Ferkey y Kimelman, 2002). La obtención de un modelo tridimensional de la proteína *UCU1* empleando recursos bioinformáticos convencionales sugiere que las mutaciones *ucu1* alteran la estructura secundaria de este subdominio (véase el apartado IV.3.2.3.3, en la página 144). Debe tenerse en cuenta, no obstante, que no hemos encontrado en el genoma de *Arabidopsis thaliana* ortólogos de la axina y la GBP (FRAT). Por su parte, el alelo mutante *ucu1-3* causa el cambio de serina por prolina en una región muy conservada en todos los miembros de la subfamilia de *SGG* y *GSK3* (véase el apartado IV.3.2.3.3, en la página 144; Pérez-Pérez *et al.*, 2002), cuya función se desconoce. Estos resultados sugieren que las mutaciones *ucu1* podrían dificultar la regulación de la actividad quinasa de la proteína *UCU1 (AtSK21)*.

El análisis genético y molecular de algunos mutantes enanos de *Arabidopsis thaliana* ha permitido desentrañar la ruta biosintética del brasinólido, el brasinosteroide endógeno más activo (revisado en Clouse 1996a; 1996b; Altmann 1998a; 1998b; 1999; Li y Chory, 1999; Clouse, 2001; Bishop y Yokota, 2001). La disección de la ruta de transducción de la señal de los brasinosteroides, sin embargo, se ha iniciado mucho después, con posterioridad al inicio de esta Tesis (revisado en Schumacher y Chory, 2000; Altmann, 2001; Bishop y Yokota, 2001; Friedrichsen y Chory, 2001; Müssig y Altmann, 2001; Bishop y Koncz, 2002; Clouse, 2002a; 2002b; 2002c; Marcinkowska y Wiedlocha, 2002). Se han identificado unos 20 mutantes insensibles a la adición del brasinólido en *Arabidopsis thaliana*, el arroz, el guisante y el tomate, todos los cuales son

portadores de mutaciones en el gen *BRI1*, que cifra un receptor de membrana con actividad quinasa de serina y treonina, que pertenece a la subfamilia de los receptores con repeticiones ricas en leucina (*leucine-rich repeat*; LRR) (Li y Chory, 1997; Yamamuro *et al.*, 2000; Montoya *et al.*, 2002). La unión del brasinólido al dominio extracelular rico en leucinas de *BRI1* da comienzo a una cascada de fosforilaciones de proteínas intracelulares (Friedrichsen *et al.*, 2000; He *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001), que incide finalmente en la modulación de la actividad de los genes regulados por los brasinosteroides (Goda *et al.*, 2002; Müssig *et al.*, 2002). La subfamilia de los receptores LRR está integrada por más de 170 genes en *Arabidopsis thaliana*, de los que se sabe relativamente poco, excepción hecha de los que participan en la ruta de señalización de CLAVATA (CLV; revisado en Fletcher y Meyerowitz, 2000; Clark, 2001; véase el apartado I.4.2, en la página 18).

Dada la semejanza estructural entre los receptores CLV1 y *BRI1*, se ha apuntado la posibilidad de que los elementos de sus respectivas rutas de señalización estén conservados. Uno de los indicios que apoyan esta idea es la observación de que las plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* en las que se expresa constitutivamente una forma activa de la proteína Rop2, una GTPasa de la subfamilia Rop de *Arabidopsis thaliana*, algunas de las cuales participan en la ruta de CLV1, presentan las hojas pequeñas y redondeadas y son ligeramente insensibles a la administración de brasinólido (Li *et al.*, 2001a). Este resultado sugiere que la GTPasa Rop2 participa en la ruta de señalización de los brasinosteroides.

Existen otras observaciones que pueden interpretarse como indicaciones de la existencia de cierto grado de conservación evolutiva entre los elementos de las rutas de señalización en las que participan CLV1 y *BRI1*. Una de ellas se ha hecho tras la obtención de una construcción antisentido que incluye a dos parálogos de *UCU1*, *AtSK11* (*ASK α*) y *AtSK12* (*ASK γ*). Las plantas transgénicas en las que estos transgenes se expresan constitutivamente presentan flores con número de órganos superior al silvestre, como consecuencia de un aumento de tamaño del meristemo reproductivo (Dornelas *et al.*, 2000), un rasgo fenotípico que también presentan los mutantes *clv*.

El enanismo y la insensibilidad a los brasinosteroides que manifiestan los mutantes *ucu1* (véanse los apartados IV.2.2.1 y IV.2.3.3, en las páginas 115 y 123, respectivamente), así como la presumible naturaleza intracelular de las proteínas *AtSK*, sugiere que *UCU1* participa en la ruta de señalización de los brasinosteroides, y que lo hace en una etapa posterior a aquélla en la que actúa el receptor *BRI1* (Pérez-Pérez *et al.*, 2002). Esta hipótesis, basada en las analogías que pueden establecerse entre la

presunta función de UCU1 y las demostradas de sus homólogas animales, es congruente con la aparente epistasia de las mutaciones *bri1* sobre las *ucu1*, que hemos constatado al obtener y analizar dobles mutantes *ucu1 bri1* (véase el apartado IV.5.2.2.3, en la página 180).

Además del nuestro, otros dos grupos de investigación han aislado mutantes semidominantes insensibles al brasinólido y los han utilizado como material de partida para la clonación del gen *UCU1*, al que han denominado *BRASSINOSTEROID INSENSITIVE2* (*BIN2*; Li *et al.*, 2001c; Li y Nam, 2002), y *DWARF12* (*DWF12*; Choe *et al.*, 2002). Los seis alelos semidominantes del gen *UCU1* aislados por estos investigadores son, como los nuestros, mutaciones semidominantes que dañan el motivo TREEIR de la proteína (véase el apartado IV.3.2.3.3, en la página 144). El fenotipo mutante de las plantas homocigóticas para estos alelos es indistinguible del de los individuos *ucu1-1/ucu1-1* y *ucu1-2/ucu1-2*. Resulta obvio que este dominio es esencial para la actividad de la proteína *UCU1* y especialmente llamativo el hecho de que no se hayan identificado mutaciones en otras partes del gen, lo que sugiere que estas últimas son letales o, alternativamente, que carecen de efectos fenotípicos.

Tras el aislamiento de mutantes resistentes al brasinazol, un inhibidor específico de la biosíntesis de los brasinosteroides (Asami *et al.*, 2000), se han identificado mutaciones dominantes en el gen *BRASSINAZOLE RESISTANT1* (*BZR1*; Wang *et al.*, 2002) y su parálogo *BRI1-EMS-SUPPRESSOR1* (*BES1*), también llamado *BZR2* (Yin *et al.*, 2002), que suprimen el fenotipo de los mutantes *bri1*. *BZR1* y *BES1* son reguladores positivos de la parte intracelular de la ruta de señalización de los brasinosteroides, y cifran proteínas de una familia de factores de transcripción específicos de las plantas, que contienen 25 residuos de serina y treonina que podrían ser fosforilados por las quinasas GSK3 (Wang *et al.*, 2002; Yin *et al.*, 2002). La señal de los brasinosteroides induce la defosforilación de *BZR1* y su translocación al núcleo, en donde actúa como factor de transcripción (Wang *et al.*, 2002). La quinasa *BIN2* (*UCU1*) es un regulador negativo de la señalización de los brasinosteroides, que interacciona con *BZR1* y fosforila e inestabiliza el complejo formado por *BZR1* y *BES1* (He *et al.*, 2002; Yin *et al.*, 2002). La fosforilación de *BZR1*, y probablemente también la de *BES1*, es llevada a cabo por *BIN2* (*UCU1*) e induce su marcaje por la ubiquitina y su degradación por el proteosoma (He *et al.*, 2002). En consecuencia, la función de *UCU1* en las plantas sería análoga a la de *SGG* y *GSK3* en los animales en lo que se refiere a la inactivación de las proteínas Armadillo y β -catenina en la ruta de señalización de Wingless y Wnt, respectivamente (He *et al.*, 2002).

Se ha descrito recientemente que la unión del brasinólido a su receptor BRI1 desencadena la interacción de este último con BAK1 (*BRI1-associated kinase1*), un receptor que cuenta con un dominio extracelular de la subfamilia LRR (Li *et al.*, 2002; Nam y Li, 2002). Esta observación indica que existen algunas semejanzas entre la ruta de señalización de los brasinosteroides en las plantas y la del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) en los metazoos, ya que la unión de este último a su receptor de tipo II (T β RII), que es una quinasa de serina y treonina, desencadena su interacción con el receptor de tipo I (T β RI), lo que induce su activación y la transducción de la señal al interior de la célula, mediante una cascada de fosforilaciones de proteínas (Li *et al.*, 2002; Nam y Li, 2002).

V.5.- Naturaleza molecular del gen *UCU2*

El producto del gen *UCU2* es similar a las isomerasas de prolina, también llamadas PPlasas o rotamasas, de la subfamilia de las inmunofilinas que se unen a la droga inmunosupresora FK506 (FKBP, *FK506-binding proteins*; véase el apartado IV.4.2.3, en la página 163; revisado en Schiene-Fischer y Yu, 2001). Se han encontrado miembros de esta subfamilia entre los procariotas y los eucariotas, que parecen estar implicados en la modificación postraducciona de numerosas proteínas. Las FKBP contribuyen al plegamiento de las proteínas a las que se unen y facilitan su interacción con otras que las procesan, como las chaperonas (Galat, 2000).

Las FKBP se clasifican en dos grupos, según su tamaño. Las pequeñas presentan un único dominio con actividad isomerasa, y participan en la regulación de algunas rutas de señalización intracelulares, interaccionando con receptores transmembrana o con canales iónicos. La FKBP12 de los mamíferos se une a los receptores de tipo II del TGF- β (T β RII), al que activa (Schiene-Fischer y Yu, 2001). Las FKBP grandes, a diferencia de las anteriores, presentan varios dominios isomerasa, habitualmente tres, así como un dominio carboxiterminal de gran tamaño que muestra una gran afinidad por la calmodulina, una proteína fijadora de Ca^{2+} . Estas FKPB también pueden interaccionar con los complejos multienzimáticos de las chaperonas y las proteínas del choque térmico (Hsp; *heat shock proteins*) (Schiene-Fischer y Yu, 2001). Se ha comprobado en algunos mamíferos que las repeticiones del tetratricopéptido del dominio carboxiterminal de la FKBP de 52 kDa (FKBP52) se unen a la Hsp90 para formar un complejo proteico que activa al receptor intracelular de los glucocorticoides y facilita su migración hacia el núcleo, en donde regula la expresión de determinados genes (Galigniana *et al.*, 2001; Pratt *et al.*, 2001). Se ha demostrado recientemente que las plantas también cuentan con

la maquinaria enzimática necesaria para la formación de este complejo (Harrell *et al.*, 2002).

La proteína UCU2, de 42 kDa, contiene una región carboxiterminal de gran tamaño, que incluye tres dominios del tetratricopéptido. Su región aminoterminal contiene sólo un dominio con presunta actividad isomerasa. En consecuencia, UCU2 comparte características con los dos grupos mencionados de FKBP. Además del nuestro, otro grupo de investigación ha clonado el gen *UCU2* a partir de sus alelos mutantes, denominándolo *TWISTED DWARF (TWD)*; Schulz *et al.*, sin publicar; citado en Kamphausen *et al.*, 2002). Este grupo ha publicado recientemente que la proteína AtFKBP42 radica en las membranas plasmática y vacuolar y que su extremo carboxilo interacciona con la proteína Hsp90 (Kamphausen *et al.*, 2002).

Se han descrito otras estirpes de *Arabidopsis thaliana* portadoras de mutaciones en genes cuyos productos son FKBP. Uno de ellos es *pasticcino1 (pas1)*, que presenta alteraciones de su desarrollo generalizadas y muy severas (Faure *et al.*, 1998). El gen *PAS1* cifra la proteína AtFKBP71 (Vittorioso *et al.*, 1998). Se ha propuesto que la descoordinación entre la división y la elongación celular que muestran los mutantes *pas1* se debe a una alteración en la señalización de las citoquininas (Faure *et al.*, 1998). Por otra parte, las plantas transgénicas de *Triticum aestivum* en las que se expresa de forma constitutiva el gen de una FKBP de 77 kDa (wFKBP77) son estériles, más pequeñas que su ancestro silvestre y presentan hojas deformes (Harrar *et al.*, 2001).

Todos los alelos del gen *UCU2* que hemos estudiado en esta Tesis son recesivos y determinan una arquitectura corporal muy similar a la de los homocigotos para los alelos semidominantes *ucu1*. Al menos tres de estas mutaciones son inequívocamente nulas, ya que *ucu2-1* y *ucu2-2* son deleciones del gen *UCU2* y alguno de sus vecinos, y la otra, *ucu2-4*, es una inserción de ADN-T. El fenotipo del cuarto alelo, *ucu2-3*, es indistinguible del de los otros tres, lo que sugiere que también es nulo, como consecuencia del reordenamiento de 40 pb que sufre (véase el apartado IV.4.2.2.4, en la página 162), que causa presuntamente la pérdida del tercer dominio del tetratricopéptido y la región transmembrana de la proteína. Se deriva de lo anterior que la integridad de la región carboxiterminal de la proteína UCU2 es esencial para su actividad.

V.6.- Relación entre las rutas de señalización de las auxinas y los brasinosteroides

Se sabe poco acerca de las moléculas implicadas en las interacciones entre las rutas de señalización hormonal que controlan el desarrollo de las plantas (Moller y Chua,

1999). Sin embargo, son numerosos los estudios fisiológicos que demuestran la sinergia, el antagonismo o alguna otra relación funcional entre distintas hormonas vegetales (Chory y Wu, 2001). Además, las búsquedas de mutaciones en genes implicados en la percepción de alguna hormona concreta suelen tener como resultado el aislamiento de mutantes con fenotipos muy pleiotrópicos y que también manifiestan alteraciones en su respuesta a otras hormonas (Chory y Wu, 2001). Se asume, en consecuencia, que debe existir flujo de información entre distintas rutas de señalización hormonal, mediado por proteínas de naturaleza aún desconocida (Lu y Fedoroff, 2000; Weng *et al.*, 1999; Weston y Davis, 2001).

Ejemplos de lo anterior son algunos genes cuya expresión es inducida por la auxina en el tipo silvestre, como los de la familia *Aux/IAA* y los *AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF)*, cuya actividad está incrementada en los mutantes deficitarios en brasinosteroides. Este es el caso de los genes *ARF7*, *AXR3 (IAA17)*, *SHY2 (IAA3)*, *IAA2*, *IAA7* e *IAA22* (Goda *et al.*, 2002; Müssig *et al.*, 2002). Además, algunos de estos genes, como *IAA3* e *IAA19*, son inducibles tanto por las auxinas como por los brasinosteroides (Goda *et al.*, 2002; Müssig *et al.*, 2002). Por otra parte, algunos mutantes de *Arabidopsis thaliana* deficitarios en brasinosteroides, como *sax1 (hypersensitive to abscisic acid and auxin)* presentan también alteraciones en su respuesta a las auxinas, y dejan de ser hipersensibles al 2,4-D si se les administra brasinólido (Ephritikhine *et al.*, 1999a; 1999b). Cabe mencionar, por último, que la mutación *curl-3 (cu-3)* del tomate, que daña al ortólogo de *BR11* (Montoya *et al.*, 2002), es hipersensible al 2,4-D (Koka *et al.*, 2000), tal como le ocurre a los mutantes *ucu1* (véase el apartado IV.2.3.2, en la página 121; Pérez-Pérez *et al.*, 2002).

Son numerosos los indicios de que las plantas y los animales tuvieron un ancestro unicelular común (Alberts *et al.*, 1994; Meyerowitz, 1994b). Sin embargo, las rutas de señalización que contribuyen al desarrollo de las plantas parecen exclusivas del reino vegetal, según indica el análisis comparativo de los genomas de *Arabidopsis thaliana*, *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster* (McCarty y Chory, 2000). De hecho, no se han encontrado en el genoma de *Arabidopsis thaliana* ortólogos de la mayoría de los genes que cifran algunos de los elementos importantes de las rutas de señalización más conservadas entre los metazoos, como las de Wingless/Wnt, Hedgehog, Notch/lin12, JAK/STAT, TGF- β /SMAD, los receptores con actividad quinasa de tirosina/Ras o los receptores nucleares de los esteroides (McCarty y Chory, 2000; The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000; Wigge y Weigel, 2001).

Las quinasas de la subfamilia de SGG y GSK3 interconectan en los metazoos varias rutas de desarrollo, ya que participan tanto en la ruta de Wingless/Wnt, que contribuye a la especificación de destinos celulares durante la embriogénesis, como en la de la insulina durante el crecimiento (Cohen y Frame, 2001; Weston y Davis, 2001). Si estas quinasas son capaces de transducir en las células animales la señal procedente de al menos dos receptores, el de Wingless y el de la insulina, es verosímil que su ortólogo vegetal *UCU1* pueda actuar de forma semejante, participando tanto en la transducción de la señal de los brasinosteroides como en la de las auxinas.

V.7.- Interpretación de las interacciones genéticas

V.7.1.- Relaciones entre las mutaciones *ucu*

Los efectos fenotípicos de los alelos semidominantes *ucu1-1* y *ucu1-2* son más extremos que los del recesivo *ucu1-3*, todos los cuales muestran aditividad en los heterocigotos que hemos obtenido, lo que sugiere que la naturaleza funcional del daño que padece el gen *UCU1* en cada uno de ellos difiere cuantitativamente, pero no cualitativamente (véase el apartado IV.1.3, en la página 107). La mayoría de las plantas triploides *UCU1/UCU1/ucu1* que hemos obtenido manifestaron un fenotipo silvestre y las restantes una reducción considerable de los rasgos mutantes del parental diploide. Estos resultados no son de fácil interpretación, dada la aparente existencia de dos clases fenotípicas distintas entre los triploides. Por un lado, la obtención de triploides fenotípicamente silvestres sugiere que las mutaciones *ucu1-1* y *ucu1-2* son nulas o extremadamente hipomorfas, y que su semidominancia en las plantas diploides se debe a que el gen *UCU1* es haploinsuficiente. Por el contrario, los triploides que manifiestan un fenotipo mutante más débil que el de sus parentales sólo pueden ser interpretados asumiendo que las mutaciones *ucu1* son antimorfas o neomorfas, ya que sus efectos fenotípicos son parcialmente contrarrestados por un incremento de las dosis de los alelos silvestres de *UCU1* y otros genes con los que éste pudiera interactuar (véase el apartado IV.5.1, en la página 172). Otros autores han propuesto que los alelos semidominantes del gen *BIN2* (*UCU1*) son de ganancia de función (Li *et al.*, 2001c; Li y Nam, 2002; Choe *et al.*, 2002).

Las plantas homocigóticas para los alelos semidominantes de *UCU1* y las que lo son para los recesivos de *UCU2* presentan una arquitectura corporal muy similar y, aunque en diferente grado, sus respuestas a las auxinas y su sensibilidad a los brasinosteroides son anormales (véanse los apartados IV.2.3.2 y IV.2.3.3, en las páginas 121 y 123, respectivamente). Los dobles mutantes *ucu1/ucu1;ucu2/ucu2* manifiestan un

fenotipo aditivo y muy similar al de los mutantes *bri1/bri1* (véase el apartado IV.5.2.2.3, en la página 180). La interpretación más simple de dicha aditividad es que los genes *UCU1* y *UCU2* participan en procesos independientes. Sin embargo, ambos parecen estar implicados en la señalización de las auxinas y los brasinosteroides.

V.7.2.- Interacciones con genes implicados en la señalización de los brasinosteroides

Los mutantes enanos deficitarios en brasinosteroides (revisado en Altmann, 1999; Li y Chory, 1999; Bishop y Yokota, 2001), como *det2* y *dim*, presentan rasgos fenotípicos muy similares a los de los mutantes *ucu* (véase el apartado IV.2, en la página 108). Los dobles mutantes *ucu1 dim* (véase el apartado IV.5.2.2.1, en la página 176) y *ucu1 det2* (véase el apartado IV.5.2.2.2, en la página 179) son muy semejantes. Hemos considerado aditivo su fenotipo, lo que es congruente con la independencia de las funciones de los genes dañados en estos dobles mutantes.

En los mutantes *bri1/bri1* no se transduce la señal de los brasinosteroides, como consecuencia de la inactividad del receptor BRI1 (Clouse *et al.*, 1996; Li y Chory, 1997). Dado el carácter extremo de su fenotipo, es difícil distinguir entre aditividad y epistasia en el doble mutante *ucu1-1/ucu1-1;bri1-1/bri1-1* (véase el apartado IV.5.2.2.3, en la página 180). No obstante, estos dobles mutantes son más similares a sus parentales *bri1/bri1* que a los *ucu1/ucu1*, lo que sugiere la epistasia de *BRI1* sobre *UCU1*, lo que es congruente con la función que se ha propuesto para *UCU1*, presuntamente situado aguas abajo de *BRI1* en la ruta de transducción de la señal de los brasinosteroides.

V.7.3.- Interacciones con genes implicados en la señalización de las auxinas

Hemos obtenido también dobles mutantes en los que participan las mutaciones *ucu1* y otras que perturban la señalización de las auxinas, como *auxin-resistant2 (axr2)*, *incurvata5 [icu5; también llamado supressor of hy2 (shy2)]* e *icu6 (axr3)*, todas las cuales causan insensibilidad a la administración de estas fitohormonas. Estas estirpes mutantes son respectivamente portadoras de mutaciones en los genes *IAA7* (Nagpal *et al.*, 2000), *IAA3* (Tian y Reed, 1999; Candela *et al.*, en preparación) e *IAA17* (Rouse *et al.* 1998; Candela *et al.*, en preparación), que pertenecen a la familia *Aux/IAA*, cuyos productos están implicados en la respuesta a las auxinas (revisado en Reed, 2001; Liscum y Reed, 2002). Las proteínas *Aux/IAA* forman homodímeros o heterodímeros que interaccionan con los factores de transcripción del tipo ARF (*Auxin Response Factors*), los cuales, a su vez, actúan sobre los genes regulados por las auxinas.

La mutación dominante *axr2-1* es de ganancia de función y produce insensibilidad a la administración de varias fitohormonas (Wilson *et al.*, 1990; Timpte *et al.*, 1994; Nagpal *et al.*, 2000). Los dobles heterocigotos *ucu1-1/UCU1;axr2-1/AXR2* y *ucu1-3/UCU1;axr2-1/AXR2* presentan un fenotipo claramente sinérgico (véase el apartado IV.5.2.2.4, en la página 181), que recuerda al de los mutantes deficitarios en brasinosteroides. Mientras que los primeros resultaron estériles, los segundos produjeron algunas semillas F₂, cuyo estudio indica que la severidad del fenotipo mutante es dependiente del número de dosis de los alelos mutantes *axr2* y *ucu1-3*. En consecuencia, la mutación *axr2-1* parece extremar los efectos fenotípicos de *ucu1-1*, e incluso los de *ucu1-3*, a pesar de la recesividad de este último. Parece razonable proponer que esta interacción se debe al incremento que *axr2-1* causa en la concentración de auxina endógena, hormona a la que los mutantes *ucu1* presentan una sensibilidad mayor que la del tipo silvestre.

El fenotipo de los dobles heterocigotos *ucu1-1/UCU1;icu5/ICU5* y *ucu1-3/UCU1;icu5/ICU5* es prácticamente indistinguible del de *ucu1-1/UCU1;axr2-1/AXR2* y el de *ucu1-3/UCU1;axr2-1/AXR2*, respectivamente. La mutación dominante *icu5* (*shy2*) produce un cambio del aminoácido glicina a glutamato en la proteína IAA3, en la misma región dañada por la mutación *axr2-1* en la proteína IAA7 (Candela *et al.*, en preparación). Se ha propuesto que la proteína AXR2 (IAA7) podría actuar de forma parcialmente redundante con otros miembros de la familia Aux/IAA, como SHY2 (IAA3) o AXR3 (IAA17) (Nagpal *et al.*, 2000). AXR2 (IAA7) y SHY2 (IAA3) presentan un patrón de expresión espacial muy similar (Abel *et al.*, 1995), por lo que es probable que actúen de forma redundante, lo que explicaría el parecido entre los fenotipos de los dobles heterocigotos de *ucu1* con *axr2* e *icu5*.

El mutante *icu6* presenta una mutación puntual en el gen *AXR3*, que cifra la proteína IAA17 (Rouse *et al.*, 1998), que determina un cambio de aminoácido en una posición muy cercana a las dañadas por las mutaciones *icu5* y *axr2-1* (Candela *et al.*, en preparación). El fenotipo de los mutantes *icu6* es más extremo que el de otros alelos *axr3*, todos los cuales son semidominantes e hipermorfos y probablemente aumentan la estabilidad y la vida media de la proteína AXR3 (Rouse *et al.*, 1998). A diferencia de lo que hemos comprobado con *axr2* e *icu5*, el fenotipo del doble heterocigoto *ucu1-1/UCU1;icu6/ICU6* resultó aditivo (véase el apartado IV.5.2.3.1.4, en la página 189), lo que indica que la función de *AXR3* no está relacionada con la de *UCU1*.

Las proteínas Aux/IAA son nucleares y tienen una vida media muy corta, ya que son rápidamente fosforiladas por las quinasas de serina y treonina que, como PINOID

(PID; Christensen *et al.*, 2000; Reed, 2001), inducen su marcaje con la molécula ubiquitina. Este marcaje de las proteínas Aux/IAA facilita su incorporación al complejo del proteosoma, que las degrada (revisado en del Pozo y Estelle, 1999; Kepinski y Leyser 2002). Se ha propuesto que el dominio II de las proteínas Aux/IAA, el que dañan las mutaciones *axr2-1*, *icu5* e *icu6*, es esencial para la regulación de su actividad. Se ha demostrado que las mutaciones *axr2-1* y *shy2-3* aumentan la estabilidad de las proteínas IAA7 e IAA3, respectivamente, ya que probablemente dificultan su degradación por el proteosoma (Ouellet *et al.*, 2001).

Los productos de los genes *TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1* (*TIR1*; Rueger *et al.*, 1998) y *AUXIN RESISTANT1* (*AXR1*; Leyser *et al.*, 1993), cuyas mutaciones también producen insensibilidad a las auxinas, son algunos de los elementos constituyentes de la ruta de degradación de proteínas mencionada en el párrafo anterior (Walker y Estelle, 1998; Bachmair *et al.*, 2001). Este proceso implica la actuación sucesiva de tres complejos enzimáticos: la enzima activadora de la ubiquitina (E1), la enzima conjugadora de la ubiquitina (E2) y la ligasa de la ubiquitina (E3). El gen *TIR1* cifra una proteína con un dominio F-box (Ruegger *et al.*, 1998), que forma parte del complejo denominado SCF^{TIR1}, en el que radica la actividad ligasa de la ubiquitina (E3) de *Arabidopsis thaliana*.

Algunos indicios experimentales adicionales permiten relacionar las mutaciones *ucu1* con las alteraciones de la ruta de degradación de proteínas de la ubiquitina, lo que constituiría una función adicional de *UCU1*. El gen *AXR1* cifra una proteína homóloga a la enzima E1 (Leyser *et al.*, 1993), que regula la actividad de SCF^{TIR1}. Las mutaciones recesivas *axr1* confieren resistencia a la auxina y determinan que las hojas se arruguen y se recurven hacia el envés (Lincoln *et al.*, 1990), tal como ocurre en las plantas *ucu1-3/ucu1-3*. Adicionalmente, las plantas de *Nicotiana tabacum* en las que se expresa de forma constitutiva un gen que cifra una variante de la ubiquitina que inhibe la degradación de las proteínas a las que se une, muestran sus hojas recurvadas hacia el envés (Bachmair *et al.*, 1990), como las de los mutantes *ucu1*. *UCU1* podría participar por lo tanto en el complejo de quinasas que, como PID, fosforilan de forma específica alguna de las proteínas Aux/IAA contribuyendo a su degradación, lo que permitiría explicar el fenotipo sinérgico de los dobles mutantes *ucu1 axr2* e *ucu1 icu5*, en base a la relativa incapacidad de *UCU1* para modificar a *AXR2* e *ICU5*.

V.8.- Interacciones con otros genes

Hemos obtenido otros dobles mutantes cruzando plantas portadoras de mutaciones *ucu1* con otras que perturban el desarrollo foliar, la mayoría de ellas de naturaleza molecular aún por determinar (véase el apartado IV.5.2.2, en la página 176). La aditividad fenotípica observada en estos dobles mutantes indica que la función del gen *UCU1* no se relaciona con la de *INCURVATA2 (ICU2)*, que reprime en la hoja a varios genes de identidad floral (Serrano-Cartagena *et al.*, 2000). Tampoco parece existir relación entre *UCU1* y *HASTY (HST; también llamado ICU3)*, que cifra una exportina presuntamente implicada en el transporte de moléculas entre el núcleo y el citoplasma, necesaria para el establecimiento de la identidad adaxial en los primordios (Bollman *et al.*, 2003).

Hemos considerado sinérgico el fenotipo de los dobles mutantes *ucu1/ucu1;tcu1-1a/tcu1-1a* (véase el apartado IV.5.2.3.2.1, en la página 191). El fenotipo de las plantas adultas *ucu1-3/ucu1-3;tcu1-1a/tcu1-1a* es muy similar al de los dobles mutantes *ucu1-3 axr2* y *ucu1-3 icu5*, por lo que también en este caso puede especularse sugiriendo que el gen *TRANSCURVATA1 (TCU1)* participe en la señalización de las auxinas (véase el apartado IV.5.2.3.2.1, en la página 191). La clonación del gen *TCU1* y la caracterización de los mutantes *tcu1*, que están en curso, permitirán contrastar esta hipótesis.

Hemos considerado aditivo el fenotipo foliar de los dobles mutantes *ucu1-1/UCU1;tcu2-1/tcu2-1* y *ucu1-3/ucu1-3;tcu2-1/tcu2-1*, aunque el doble mutante *ucu1-1/ucu1-1;tcu2-1/tcu2-1* presenta un tamaño de la roseta mucho menor que la de sus parentales, por lo que podría considerarse sinérgico, y abrir la posibilidad de que el gen *TCU2* estuviese implicado en la señalización de las auxinas (véase el apartado IV.5.2.3.2.2, en la página 193).

También hemos encontrado aditividad fenotípica entre las mutaciones *ucu1* y las *tcu3* y *asymmetric2 (as2)* (véanse los apartados IV.5.2.3.2.3 y IV.5.2.3.2.4, en las páginas 194 y 196, respectivamente). El gen *AS2* cifra una proteína con cremalleras de leucina de la familia *LOB* (Iwakawa *et al.*, 2002; Shuai *et al.*, 2002), que reprime la expresión de algunos genes *KNOX* en los primordios foliares (véase el apartado I.4.5.1, en la página 30). Nuestros resultados sugieren que los mutantes *ucu1* no presentan alteraciones en la expresión de los genes *KNOX* en la hoja.

Los mutantes *ucu1-1/UCU1;ago1-51/ago1-51* y el doble mutante *ucu1-1/ucu1-1; ago1-51/ago1-51* presenta un fenotipo similar al de las plantas *ago1-51/ago1-51*, por lo que hemos considerado que la mutación *ago1-51 (icu9-1)* es epistática sobre las *ucu1*

(véase el apartado IV.5.2.3.1.5, en la página 190). El gen *ARGONAUTE1* (*AGO1*) cifra una proteína muy conservada entre las plantas y los animales, que está implicada en el silenciamiento génico postranscripcional (Fagard *et al.*, 2000). La pérdida de dorsoventralidad que causa la mutación *ago1-51* se manifiesta también en los dobles mutantes *ucu1 ago1-51*. La epistasia de *ago1-51* sobre las mutaciones *ucu1* puede deberse a que el gen *AGO1* está implicado en un proceso de desarrollo anterior a aquéllos en los que participa *UCU1*, como la especificación de la identidad adaxial en los primordios.





VI.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

VI.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se sabe relativamente poco acerca de la naturaleza y las funciones de los genes responsables de la dorsoventralidad de las hojas de las plantas, una característica que las distingue de otros órganos vegetales, cuya simetría es radial. En esta Tesis se han caracterizado 7 estirpes mutantes de *Arabidopsis thaliana*, cuyas hojas vegetativas están enrolladas hacia el envés, a diferencia de las de sus ancestros silvestres, que son aplanadas. Hemos denominado *ultracurvata* (*ucu*) a estos mutantes, a los que hemos considerado candidatos a ser portadores de mutaciones en genes relacionados con la dorsoventralidad foliar.

El análisis de complementación de los mutantes *ucu* nos ha permitido asignarlos a dos genes, *UCU1* y *UCU2*. Al grupo de complementación *UCU1* pertenecen tres alelos inducidos mediante metanosulfonato de etilo, dos de ellos semidominantes e indistinguibles en sus efectos fenotípicos (*ucu1-1* y *ucu1-2*), y el tercero recesivo y más débil (*ucu1-3*). Los alelos de *UCU2* son recesivos y fueron inducidos mediante bombardeo con neutrones rápidos (*ucu2-1*), rayos X (*ucu2-2*) y mutagénesis insercional con el ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens* (*ucu2-3* y *ucu2-4*). Los mutantes *ucu1-1*, *ucu1-2*, *ucu1-3*, *ucu2-1* y *ucu2-3* fueron aislados en el laboratorio de J.L. Micol, mientras que *ucu2-2* y *ucu2-4* formaban parte de colecciones de dominio público obtenidas por otros investigadores.

Hemos estudiado la morfología de los mutantes *ucu*. Los alelos semidominantes *ucu1-1* y *ucu1-2* y todos los *ucu2* causan enanismo, dado que reducen el crecimiento de todos los órganos a lo largo de su eje proximodistal. Este rasgo se manifiesta claramente en las hojas de los mutantes, que son similares en anchura a las silvestres pero apreciablemente más cortas. Las células de los mutantes *ucu1* muestran una expansión longitudinal insuficiente. Todos los órganos de morfología radial de los mutantes *ucu2* presentan además rotación helicoidal. La reducción del tamaño de las células de los mutantes *ucu1* con respecto a las silvestres es mucho mayor en la epidermis abaxial que en otros tejidos foliares, lo que explica la forma circinada de sus hojas.

También hemos analizado algunos aspectos de la fisiología de estos mutantes, comprobando que su gravitropismo no está alterado. Los mutantes *ucu1* manifiestan fotomorfogénesis constitutiva, generando hojas tras su germinación y cultivo en la oscuridad, a diferencia de los *ucu2*, que se comportan en este aspecto como sus ancestros silvestres. Hemos analizado los efectos de la administración de citoquininas, giberelinas, brasinosteroides, auxinas y algunos inhibidores del transporte de estas

últimas sobre el crecimiento de los mutantes *ucu*. La adición de estas sustancias al medio de cultivo no restauró el fenotipo silvestre en ningún caso. Los homocigotos *ucu1-1/ucu1-1* y *ucu1-2/ucu1-2* son muy insensibles a la inhibición del crecimiento radicular causada por el 24-epibrasinólido, un brasinosteroide, e hipersensibles al 2,4-D, una auxina sintética. Los mutantes *ucu2* presentan una respuesta de hipersensibilidad a la adición al medio de cultivo de los inhibidores del transporte de auxinas.

Hemos identificado los genes *UCU1* y *UCU2* siguiendo un abordaje posicional. Su cartografía de baja resolución se llevó a cabo mediante análisis del ligamiento a microsatélites polimórficos y la de alta resolución tras desarrollar nuevos marcadores moleculares a fin de estrechar las regiones candidatas y finalmente secuenciar varios genes de estas últimas. El producto del gen *UCU1* pertenece a la subfamilia de las quinasas de serina y treonina representada por SHAGGY en *Drosophila melanogaster* y por GSK3 en los vertebrados, que participan en la ruta de transducción de señales de Wingless y Wnt, respectivamente. Las mutaciones *ucu1* son cambios de base que causan la sustitución de aminoácidos muy conservados entre los miembros de la subfamilia y alteran un dominio proteico cuya función se desconoce.

El producto del gen *UCU2* es una peptidil prolil *cis/trans* isomerasa, similar a las inmunofilinas de tipo FKBP (*FK506-binding protein*), cuyos homólogos en los animales participan en la modificación postraduccional de los receptores de los esteroides, entre otros procesos. Las mutaciones *ucu2-1* y *ucu2-2* son deleciones que eliminan a *UCU2* y a varios genes vecinos. Por su parte, *ucu2-3* es una reorganización que altera un segmento de 40 pb del último exón del gen y trunca su producto proteico. No hemos determinado la naturaleza molecular de *ucu2-4*, una mutación presuntamente insercional.

Los rasgos mutantes de los homocigotos para los alelos semidominantes *ucu1* se manifiestan también en las plantas transgénicas *ucu1/ucu1* portadoras de un transgén que contiene el alelo silvestre *UCU1*. En consecuencia, las mutaciones *ucu1* son antimorfos o neomorfos. La naturaleza estructural de las mutaciones *ucu2*, dos de las cuales son deleciones, indica su carácter nulo.

Con el propósito de establecer la eventual existencia de interacciones genéticas, hemos cruzado los mutantes *ucu* entre sí y con otros previamente descritos, que fueron elegidos por sus alteraciones en la ontogenia foliar o en la síntesis o la señalización de fitohormonas. Los dobles mutantes *ucu1 ucu2* muestran un fenotipo aditivo y son semejantes a los mutantes *bri1*, en los que no se transduce la señal hormonal de los brasinosteroides. Casi todos los demás dobles mutantes manifestaron aditividad

fenotípica. Se constató sinergia en los dobles mutantes en los que participaban mutaciones en genes relacionados con la señalización de las auxinas.

Considerados en conjunto, nuestros resultados sugieren que los genes *UCU1* y *UCU2* están implicados en la señalización de las auxinas y los brasinosteroides. Aunque la actividad de estos dos genes es necesaria para el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*, la de *UCU1* se requiere en mayor medida en la epidermis abaxial de la hoja que en otros histotipos de este órgano.





VII.- BIBLIOGRAFÍA

VII.- BIBLIOGRAFÍA

- Aarts, M.G.M., Corzaan, P., Stiekema, W.J., y Pereira, A. (1995). A two-element *Enhancer-Inhibitor* transposon system in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* **247**, 555-564.
- Abel, S., Nguyen, M.D., y Theologis, A. (1995). The *PS-IAA4/5*-like family of early auxin-inducible mRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *J. Mol. Biol.* **251**, 533-549.
- Adam, D. (2000). *Arabidopsis thaliana* genome. Now for the hard ones. *Nature* **408**, 792-793.
- Adams, M.D., *et al.* (2000). The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**, 2185-2195.
- 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.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., y Watson, J.D. (1994). *Molecular Biology of the Cell*. Third edition. Garland Publishing.
- Allsopp, A. (1965). Land and water forms: physiological aspects. *Handb. fl. Physiol.* **15**, 1236-1255.
- Alonso-Blanco, C., y Koornneef, M. (2000). Naturally occurring variation in *Arabidopsis*: an underexploited resource for plant genetics. *Trends Plant Sci.* **5**, 22-29.
- Altmann, T. (1998a). A tale of dwarfs and drugs: brassinosteroids to the rescue. *Trends Genet.* **14**, 490-495.
- Altmann, T. (1998b). Recent advances in brassinosteroid molecular genetics. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 378-383.
- Altmann, T. (1999). Molecular physiology of brassinosteroids revealed by the analysis of mutants. *Planta* **208**, 1-11.
- Altmann, T. (2001). Brassinosteroid signaling in plants. *Trends Endocrinol. Metab.* **12**, 398-402.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J.Z., Miller, W., y Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids. Res.* **25**, 3389-3402.
- Arioli, T., Peng, L., Betzner, A.S., Burn, J., Wittke, W., Herth, W., Camilleri, C., Hofte, H., Plazinski, J., Birch, R., Cork, A., Glover, J., Redmond, J., y Williamson, R.E. (1998). Molecular analysis of cellulose biosynthesis in *Arabidopsis*. *Science* **279**, 717-720.
- Asai, K., Satoh, N., Sasaki, H., Satoh, H., y Nagato, Y. (2002). A rice heterochronic mutant, *mor1*, is defective in the juvenile-adult phase change. *Development* **129**, 265-273.
- Asami, T., Min, Y.K., Nagata, N., Yamagishi, K., Takatsuto, S., Fujioka, S., Murofushi, N., Yamaguchi, I., y Yoshida S. (2000). Characterization of brassinazole, a triazole-type brassinosteroid biosynthesis inhibitor. *Plant Physiol.* **123**, 93-100.
- Autran, D., Jonak, C., Belcram, K., Beemster, G.T., Kronenberger, J., Grandjean, O., Inze, D., y Traas, J. (2002). Cell numbers and leaf development in *Arabidopsis*: a functional analysis of the *STRUWELPETER* gene. *EMBO J.* **21**, 6036-6049.
- Avery, G.S. (1933). Structure and development of the tobacco leaf. *Am. J. Bot.* **20**, 565-592.
- Avsian-Kretchmer, O., Cheng, J.C., Chen, L., Moctezuma, E., y Sung, Z.R. (2002). Indole acetic acid distribution coincides with vascular differentiation pattern during *Arabidopsis* leaf ontogeny. *Plant Physiol.* **130**, 199-209.
- Azpiroz-Leehan, R., y Feldmann, K.A. (1997). T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: going back and forth. *Trends Genet.* **13**, 152-156.
- Bachmair, A., Becker, F., Masterson, R.V., y Schell, J. (1990). Perturbation of the ubiquitin system causes leaf curling, vascular tissue alterations and necrotic lesions in a higher plant. *EMBO J.* **9**, 4543-4549.

- Bachmair, A., Novatchkova, M., Potuschak, T., y Eisenhaber, F. (2001). Ubiquitylation in plants: a post-genomic look at a post-translational modification. *Trends Plant Sci.* **6**, 463-470.
- Baima, S., Nobili, F., Sessa, G., Lucchetti, S., Ruberti, I., y Morelli, G. (1995). The expression of the *Athb-8* homeobox gene is restricted to provascular cells in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **121**, 4171-4182.
- Baima, S., Possenti, M., Matteucci, A., Wisman, E., Altamura, M.M., Ruberti, I., y Morelli, G. (2001). The arabidopsis ATHB-8 HD-zip protein acts as a differentiation-promoting transcription factor of the vascular meristems. *Plant Physiol.* **126**, 643-655.
- Bancroft, I., Bhatt, A.M., Sjodin, C., Scofield, S., Jones, J.D.G., y Dean, C. (1992). Development of an efficient two-element transposon tagging system in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* **233**, 449-461.
- Bancroft, I., Jones, J.D., y Dean C. (1993). Heterologous transposon tagging of the *DRL1* locus in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **5**, 631-638.
- Barton, M.K. (1998). Cell type specification and self renewal in the vegetative shoot apical meristem. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 37-42.
- Barton, M.K. (2001). Leaving the meristem behind: regulation of *KNOX* genes. *Genome Biol.* **2**, R1002.1-R1002.3.
- 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.
- 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.
- Bechtold, N., y Pelletier, G. (1998). *In planta Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. *Methods Mol. Biol.* **82**, 259-266.
- Becraft, P.W. (1999). Development of the leaf epidermis. *Curr. Top. Dev. Biol.* **45**, 1-40.
- Becraft, P.W., Bornard-Pierce, D.K., Sylvester, A.W., Poethig, P.S., y Freeling, M. (1990). The *liguleless-1* gene acts tissue specifically in maize leaf development. *Dev. Biol.* **141**, 220-232.
- Becraft, P.W., Stinard, P.S., y McCarty, D.R. (1996). CRINKLY4: A TNFR-like receptor kinase involved in maize epidermal differentiation. *Science* **273**, 1406-1409.
- Bejsovec, A. (1999). Wnt signalling shows its versatility. *Curr. Biol.* **9**, R684-R687.
- Bell, C.J., y Ecker, J.R. (1994). Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. *Genomics* **19**, 137-144.
- Bennett, M.J., Marchant, A., Green, H.G., May, S.T., Ward, S.P., Millner, P.A., Walker, A.R., Schulz, B. y Feldmann, K.A. (1996). *Arabidopsis AUX1* gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science* **273**, 948-950.
- Bennetzen, J. (2002). The rice genome. Opening the door to comparative plant biology. *Science*. **296**, 60-63.
- Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Rapp, B.A., y Wheeler, D.L. (2002). GenBank. *Nucleic Acids Res.* **30**, 17-20.
- Bent, A.F. (2000). *Arabidopsis* in planta transformation. Uses, mechanisms, and prospects for transformation of other species. *Plant Physiol.* **124**, 1540-1547.
- Berardini, T.Z., Bollman, K., Sun, H., y Poethig, R.S. (2001). Regulation of vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana* by cyclophilin 40. *Science* **291**, 2405-2407.
- Berná Amorós, G. (1997). Diseccción genética del desarrollo de la hoja en *Arabidopsis thaliana*: Aislamiento y caracterización de mutantes inducidos mediante metanosulfonato de etilo. Tesis Doctoral. Universidad de Alicante.
- Berná, G., Robles, P., y Micol, J.L. (1999). A mutational analysis of leaf morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **152**, 729-742.
- Bertrand-García, R., y Freeling, M. (1991). Hairy-sheath frayed1-O: A systemic, heterochronic mutant of maize that specifies slow developmental stage transitions. *Am. J. Bot.* **78**, 747-765.

- Bevan, M., Mayer, K., White, O., Eisen, J.A., Preuss, D., Bureau, T., Salzberg, S.L., y Mewes, H. (2001). Sequence and analysis of the *Arabidopsis* genome. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**, 105-110.
- Bharathan, G., Goliber, T.E., Moore, C., Kessler, S., Pham, T., y Sinha, N.R. (2002). Homologies in leaf form inferred from *KNOXI* gene expression during development. *Science* **296**, 1858-1860.
- Bharathan, G., y Sinha, N.R. (2001). The regulation of compound leaf development. *Plant Physiol.* **127**, 1533-1538.
- Bichet, A., Desnos, T., Turner, S., Grandjean, O., y Hofte, H. (2001). *BOTEROI* is required for normal orientation of cortical microtubules and anisotropic cell expansion in *Arabidopsis*. *Plant J.* **25**, 137-148.
- Bishop, G.J., y Koncz, C. (2002). Brassinosteroids and plant steroid hormone signaling. *Plant Cell* **14**, S97-S110.
- Bishop, G.J., y Yokota, T. (2001). Plants steroid hormones, brassinosteroids: current highlights of molecular aspects on their synthesis/metabolism, transport, perception and response. *Plant Cell Physiol.* **42**, 114-120.
- Blatch, G.L., y Lassel, M. (1999). The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays* **21**, 932-939.
- Boerjan, W., Bauw, G., Van Montagu, M., y Inze, D. (1994). Distinct phenotypes generated by overexpression and suppression of S-adenosyl-L-methionine synthetase reveal developmental patterns of gene silencing in tobacco. *Plant Cell* **6**, 1401-1414.
- Bohmert, K., Camus, I., Bellini, C., Bouchez, D., Caboche, M., y Benning, C. (1998). *AGO1* defines a novel locus of *Arabidopsis* controlling leaf development. *EMBO J.* **17**, 170-180.
- Bolker, J.A. (1995). Model systems in developmental biology. *Bioessays* **17**, 451-455.
- Bollman, K.M., Aukerman, M.J., Park, M.Y., Hunter, C., Berardini, T.Z., y Poethig, R.S. (2003). *HASTY*, the *Arabidopsis* ortholog of exportin 5/MSN5, regulates phase change and morphogenesis. *Development* **130**, 1493-1504.
- Bongard-Pierce, D.K., Evans, M.M.S., y Poethig, R.S. (1996). Heteroblastic features of leaf anatomy in maize and their genetic regulation. *Int. J. Plant Sci.* **157**, 331-340.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., y Davis, R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* **32**, 314-331.
- Bower, F.O. (1935). *Primitive land plants*. Macmillan.
- Bowman, J.L. (1994). *Arabidopsis: An atlas of morphology and development*. Springer-Verlag.
- Bowman, J.L. (2000). The *YABBY* gene family and abaxial cell fate. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**, 17-22.
- Bowman, J.L., Eshed, Y., y Baum, S.F. (2002). Establishment of polarity in angiosperm lateral organs. *Trends Genet.* **18**, 134-141.
- Bowman, J.L., y Eshed, Y. (2000). Formation and maintenance of the shoot apical meristem. *Trends Plant Sci.* **5**, 110-115.
- Brand, U., Fletcher, J.C., Hobe, M., Meyerowitz, E.M., y Simon, R. (2000). Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by *CLV3* activity. *Science* **289**, 617-619.
- Brown, J.W., Smith, P., y Simpson, C.G. (1996). *Arabidopsis* consensus intron sequences. *Plant Mol. Biol.* **32**, 531-535.
- Bruggemann, E., Handwerger, K., Essex, C., y Storz, G. (1996). Analysis of fast neutron-generated mutants at the *Arabidopsis thaliana* *HY4* locus. *Plant J.* **10**, 755-760.
- 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, einschließlic der mutanten mit abweichender samenfarbe. *Arabid. Inf. Serv.* **7**, 36-42.
- Burk, D.H., Liu, B., Zhong, R., Morrison, W.H., y Ye, Z.H. (2001). A katanin-like protein regulates normal cell wall biosynthesis and cell elongation. *Plant Cell* **13**, 807-827.

- Byrne, M., Timmermans, M., Kidner, C., y Martienssen, R. (2001). Development of leaf shape. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**, 38-43.
- Byrne, M.E., Barley, R., Curtis, M., Arroyo, J.M., Dunham, M., Hudson, A., y Martienssen, R.A. (2000). *Asymmetric leaves1* mediates leaf patterning and stem cell function in *Arabidopsis*. *Nature* **408**, 967-971.
- Byrne, M.E., Simorowski, J., y Martienssen, R.A. (2002). *ASYMMETRIC LEAVES1* reveals *knox* gene redundancy in *Arabidopsis*. *Development* **129**, 1957-1965.
- Cabrera y Poch, H., Peto, C., y Chory, J. (1993). A mutation in the *Arabidopsis* *DET3* gene uncouples photoregulated leaf development from gene expression and chloroplast biogenesis. *Plant J.* **4**, 6671-6682.
- Camilleri, C., Azimzadeh, J., Pastuglia, M., Bellini, C., Grandjean, O., y Bouchez, D. (2002). The *Arabidopsis* *TONNEAU2* gene encodes a putative novel protein phosphatase 2A regulatory subunit essential for the control of the cortical cytoskeleton. *Plant Cell* **14**, 833-845.
- Campbell, P., y Braam, J. (1999). Xyloglucan endotransglycosylases: diversity of genes, enzymes and potential wall-modifying functions. *Trends Plant Sci.* **9**, 361-366.
- Campos-Ortega, J.A. (1994). Evolución histórica de la Biología del desarrollo. En *Descifrar la vida*, pp. 221-241. Casadesús, J., y Ruiz Berraquero, F. (eds.). Universidad de Sevilla.
- Candela Antón, H. (2001). Análisis genético de la formación del patrón de venación en la hoja de *Arabidopsis thaliana*. Tesis Doctoral. Universidad Miguel Hernández.
- Candela, H., Martínez-Laborda, A., y Micol, J.L. (1999). Venation pattern formation in *Arabidopsis thaliana* vegetative leaves. *Dev. Biol.* **205**, 205-216.
- Caño-Delgado, A.I., Metzlauff, K., y Bevan, M.W. (2000). The *eli1* mutation reveals a link between cell expansion and secondary cell wall formation in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **127**, 3395-3405.
- Capdevila, J., e Izpisúa-Belmonte, J.C. (2001). Patterning mechanisms controlling vertebrate limb development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **17**, 87-132.
- Carland, F.M., Berg, B.L., FitzGerald, J.N., Jinamornphongs, S., Nelson, T., y Keith, B. (1999). Genetic regulation of vascular tissue patterning in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **11**, 2123-2137.
- Carland, F.M., Fujioka, S., Takatsuto, S., Yoshida, S., y Nelson, T. (2002). The identification of *CVPI* reveals a role for sterols in vascular patterning. *Plant Cell* **14**, 2045-2058.
- Carland, F.M., y McHale, N.A. (1996). *LOPI*: a gene involved in auxin transport and vascular patterning in *Arabidopsis*. *Development* **122**, 1811-1819.
- Cary, A.J., Liu, W., y Howell, S.H. (1995). Cytokinin action is coupled to ethylene in its effects on the inhibition of root and hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Physiol.* **107**, 1075-1082.
- Catterou, M., Dubois, F., Schaller, H., Aubanelle, L., Vilcot, B., Sangwan-Norreel, B.S., y Sangwan, R.S. (2001a). Brassinosteroids, microtubules and cell elongation in *Arabidopsis thaliana*. Brassinosteroids, microtubules and cell elongation in *Arabidopsis thaliana*. I. Molecular, cellular and physiological characterization of the *Arabidopsis* *bull* mutant, defective in the delta 7-sterol-C5-desaturation step leading to brassinosteroid biosynthesis. *Planta* **212**, 659-672.
- Catterou, M., Dubois, F., Schaller, H., Aubanelle, L., Vilcot, B., Sangwan-Norreel, B.S., y Sangwan, R.S. (2001b). Brassinosteroids, microtubules and cell elongation in *Arabidopsis thaliana*. II. Effects of brassinosteroids on microtubules and cell elongation in the *bull* mutant. *Planta* **212**, 673-683.
- Charrier, B., Champion, A., Henry, Y., y Kreis, M. (2002). Expression profiling of the whole *Arabidopsis* *shaggy-like kinase* multigene family by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Plant Physiol.* **130**, 577-590.

- Chien, J.C., y Sussex, I.M. (1996). Differential regulation of trichome formation on the adaxial and abaxial leaf surfaces by gibberellins and photoperiod in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiol.* **111**, 1321-1328.
- Cho, H.T., y Cosgrove, D.J. (2000). Altered expression of expansin modulates leaf growth and pedicel abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 9783-9788.
- Cho, R.J., Mindrinos, M., Richards, D.R., Sapolsky, R.J., Anderson, M., Drenkard, E., Dewdney, J., Reuber, T.L., Stammers, M., Federspiel, N., Theologis, A., Yang, W-H., Hubbell, E., Au, M., Chung, E.Y., Lashkari, D., Lemieux, B., Dean, C., Lipshutz, R.J., Ausubel, F.M., Davis, R.W., y Oefner, P.J. (1999). Genome-wide mapping with biallelic markers in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genet.* **23**, 203-207.
- Choe, S., Noguchi, T., Fujioka, S., Takatsuto, S., Tissier, C.P., Gregory, B.D., Ross, A.S., Tanaka, A., Yoshida, S., Tax, F.E., y Feldmann, K.A. (1999). The *Arabidopsis dwf7/ste1* mutant is defective in the delta7 sterol C-5 desaturation step leading to brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell* **11**, 207-221.
- Choe, S., Schmitz, R.J., Fujioka, S., Takatsuto, S., Lee, M.O., Yoshida, S., Feldmann, K.A., y Tax, F.E. (2002). *Arabidopsis brassinosteroid-insensitive dwarf12* mutants are semidominant and defective in a glycogen synthase kinase 3 β -like kinase.
- Choi, S., Creelman, R.A., Mullet, J., y Wing, R.A. (1995) Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of *Arabidopsis thaliana*. *Weeds World* **2**, 17-20.
- Chory, J. (1993). Out of darkness: mutants reveal pathways controlling light-regulated development in plants. *Trends Genet.* **9**, 167-172.
- Chory, J., y Wu, D. (2001). Weaving the complex web of signal transduction. *Plant Physiol.* **125**, 77-80.
- Christensen, S.K., Dagenais, N., Chory, J., y Weigel, D. (2000). Regulation of auxin response by the protein kinase PINOID. *Cell* **100**, 469-478.
- Chuck, G., Lincoln, C., y Hake, S. (1996). *KNATI* induces lobed leaves with ectopic meristems when overexpressed in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **8**, 1277-1289.
- Clark, S.E. (1997). Organ formation at the vegetative shoot meristem. *Plant Cell* **9**, 1067-1076.
- Clark, S.E. (2001). Meristems: start your signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**, 28-32.
- 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., 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., Tack, D., Findlay, K., Van Montagu, M., y Van Lijsebettens, M. (1999). The *SERRATE* locus controls the formation of the early juvenile leaves and phase length in *Arabidopsis*. *Plant J.* **20**, 493-501.
- Clay, N.K., y Nelson, T. (2002). VH1, a provascular cell-specific receptor kinase that influences leaf cell patterns in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**, 2707-2722.
- Cleary, A.L., y Smith, L.G. (1998). The *Tangled1* gene is required for spatial control of cytoskeletal arrays associated with cell division during maize leaf development. *Plant Cell* **10**, 1875-1888.
- Clough, S.J., y Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**, 735-743.
- Clouse, S.D. (1996a). Molecular genetic studies confirm the role of brassinosteroids in plant growth and development. *Plant J.* **10**, 1-8.
- Clouse, S.D. (1996b). Plant hormones: brassinosteroids in the spotlight. *Curr. Biol.* **6**, 658-661.
- Clouse, S.D. (2001). Brassinosteroids. *Curr. Biol.* **11**, R904.

- Clouse, S.D. (2002a). Brassinosteroid signal transduction: clarifying the pathway from ligand perception to gene expression. *Mol. Cell.* **10**, 973-982.
- Clouse, S.D. (2002b). Brassinosteroid signaling: novel downstream components emerge. *Curr. Biol.* **12**, R485-R487.
- Clouse, S.D. (2002c). Brassinosteroids. Plant counterparts to animal steroid hormones? *Vitam. Horm* **65**, 195-223.
- 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.
- Cnops, G., Wang, X., Linstead, P., Van Montagu, M., Van Lijsebettens, M., y Dolan, L. (2000). *Tornadol* and *tornado2* are required for the specification of radial and circumferential pattern in the *Arabidopsis* root. *Development* **127**, 3385-3394.
- Cockcroft, C.E., den Boer, B.G., Healy, J.M., y Murray, J.A. (2000). Cyclin D control of growth rate in plants. *Nature* **405**, 575-579.
- Coen, E.S., Romero, J.M., Doyle, S., Elliott, R., Murphy, G., y Carpenter, R. (1990). *floricaula*: a homeotic gene required for flower development in *Antirrhinum majus*. *Cell* **63**, 1311-1322.
- Cohen, P., y Frame, S. (2001). The renaissance of GSK3. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 769-776.
- Colasanti, J., Yuan, Z., y Sundaresan, V. (1998). The *indeterminate* gene encodes a zinc finger protein and regulates a leaf-generated signal required for the transition to flowering in maize. *Cell* **93**, 593-603.
- Conner, J., y Liu, Z. (2000). LEUNIG, a putative transcriptional corepressor that regulates *AGAMOUS* expression during flower development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 12902-12907.
- Conway, L.J., y Poethig, R.S. (1993). Heterocrony in plant development. *Dev. Biol.* **4**, 65-72.
- Conway, L.J., y Poethig, R.S. (1997). Mutations of *Arabidopsis thaliana* that transform leaves into cotyledons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 10209-10214.
- Cosgrove, D.J. (2000a). Expansive growth of plant cell walls. *Plant Physiol Biochem.* **38**, 109-124.
- Cosgrove, D.J. (2000b). Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature* **407**, 321-326.
- Cunninghame, M.E., y Lyndon, R.F. (1986). The relationship between the distribution of periclinal cell divisions in the shoot apex and leaf initiation. *Ann. Bot.* **57**, 737-746.
- Dale, J.E. (1988). The control of leaf expansion. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **39**, 267-295.
- Day, S.J., y Lawrence, P.A. (2000). Measuring dimensions: the regulation of size and shape. *Development* **127**, 2977-2987.
- De Veylder, L., Beeckman, T., Beemster, G.T., Krols, L., Terras, F., Landrieu, I., van der Schueren, E., Maes, S., Naudts, M., y Inze, D. (2001). Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**, 1653-1668.
- Dean, C. (1993). Advantages of *Arabidopsis* for cloning plant genes. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **342**, 189-195.
- del Pozo, J.C., y Estelle, M. (1999). Function of the ubiquitin-proteasome pathway in auxin response. *Trends Plant Sci.* **4**, 107-112.
- Delarue, M., Prinsen, E., Onckelen, H.V., Caboche, M., y Bellini, C. (1998). *Sur2* mutations of *Arabidopsis thaliana* define a new locus involved in the control of auxin homeostasis. *Plant J.* **14**, 603-611.
- Dellaporta, S.L., Wood, J., y Hicks, J.B. (1983). A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* **4**, 19-21.
- Desfeux, C., Clough, S.J., y Bent, A.F. (2000). Female reproductive tissues are the primary target of *Agrobacterium*-mediated transformation by the *Arabidopsis* floral-dip method. *Plant Physiol.* **123**, 895-904.

- Dewitte, W., Riou-Khamlichi, C., Scofield, S., Healy, J.M., Jacquard, A., Kilby, N.J., y Murray, J.A. (2003). Altered cell cycle distribution, hyperplasia, and inhibited differentiation in *Arabidopsis* caused by the D-type cyclin CYCD3. *Plant Cell* **15**, 79-92.
- Deyholos, M.K., Corder, G., Beebe, D., y Sieburth, L.E. (2000). The *SCARFACE* gene is required for cotyledon and leaf vein patterning. *Development* **127**, 3205-3213.
- Dierick, H., y Bejsovec, A. (1999). Cellular mechanisms of wingless/Wnt signal transduction. *Curr. Top. Dev. Biol.* **43**, 153-190.
- Dietrich, W., Katz, H., Lincoln, S.E., Shin, H.S., Friedman, J., Dracopoli, N.C., y Lander, E.S. (1992). A genetic map of the mouse suitable for typing intraspecific crosses. *Genetics* **13**, 423-447.
- Dolan, L., y Poethig, R.S. (1991). Genetic analysis of leaf development in cotton. *Development Suppl.* **1**, 39-46.
- Donnelly, P.M., Bonetta, D., Tsukaya, H., Dengler, R.E., y Dengler, N.G. (1999). Cell cycling and cell enlargement in developing leaves of *Arabidopsis*. *Dev. Biol.* **215**, 407-419.
- Dornelas, M.C., Lejeune, B., Dron, M., y Kreis, M. (1998). The *Arabidopsis SHAGGY-related protein kinase (ASK)* gene family: structure, organization and evolution. *Gene* **212**, 249-257.
- Dornelas, M.C., Schwebel-Dugue, N., Thomas, M., Lecharny, A., y Kreis, M. (1997). Three new cDNAs related to *SGG/GSK-3 (SHAGGY/Glycogen Synthase Kinase-3)* from *Arabidopsis thaliana* (Accession No. X94938, X94939 and X99696) (PGR97-008). *Plant Physiol.* **113**, 306.
- Dornelas, M.C., Van Lammeren, A.A., y Kreis, M. (2000). *Arabidopsis thaliana* SHAGGY-related protein kinases (AtSK11 and 12) function in perianth and gynoecium development. *Plant J.* **21**, 419-429.
- Dornelas, M.C., Wittich, P., von Recklinghausen, I., van Lammeren, A., y Kreis, M. (1999). Characterization of three novel members of the *Arabidopsis SHAGGY-related protein kinase (ASK)* multigene family. *Plant Mol. Biol.* **39**, 137-147.
- Doyle, J.A. (1998). Phylogeny of vascular plants. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **29**, 567-599.
- Driesch, H. (1898). Über rein-mütterliche Charaktere and Bastardlarven von Echiniden. *Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org.* **7**, 65-102.
- Earnes, A.J. (1961). *Morphology of Angiosperms*. McGraw Hill.
- Edwards, A., Civitello, A., Hammond, H. A., y Caskey, C. T. (1991). DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am. J. Hum. Genet.* **49**, 746-756.
- Elliott, R.C., Betzner, A.S., Huttner, E., Oakes, M.P., Tucker, W.Q., Gerentes, D., Perez, 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.
- Ephritikhine, G., Fellner, M., Vannini, C., Lapous, D., y Barbier-Brygoo, H. (1999a). The *sax1* dwarf mutant of *Arabidopsis thaliana* shows altered sensitivity of growth responses to abscisic acid, auxin, gibberellins and ethylene and is partially rescued by exogenous brassinosteroid. *Plant J.* **18**, 303-314
- Ephritikhine, G., Pagant, S., Fujioka, S., Takatsuto, S., Lapous, D., Caboche, M., Kendrick, R.E., y Barbier-Brygoo, H. (1999b). The *sax1* mutation defines a new locus involved in the brassinosteroid biosynthesis pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **18**, 315-320.
- Eshed, Y., Baum, S.F., Perea, J.V., y Bowman, J.L. (2001). Establishment of polarity in lateral organs of plants. *Curr. Biol.* **11**, 1251-1260.
- Eshed, Y., Baum, S.F., y Bowman, J.L. (1999). Distinct mechanisms promote polarity establishment in carpels of *Arabidopsis*. *Cell* **99**, 199-209.
- Estelle, M.A., y Somerville, C.R. (1986). The mutants of *Arabidopsis*. *Trends Genet.* **2**, 89-93.
- 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.
- Evans, M.M., y Poethig, R.S. (1997). The *viviparous8* mutation delays vegetative phase change and accelerates the rate of seedling growth in maize. *Plant J.* **12**, 769-779.
- Evans, M.M.S., y Barton, M.K. (1997). Genetics of angiosperm shoot apical meristem development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 673-701.
- Fagard, M., Boutet, S., Morel, J.B., Bellini, C., y Vaucheret, H. (2000). AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 11650-11654.
- Falquet, L., Pagni, M., Bucher, P., Hulo, N., Sigrist, C.J., Hofmann, K., y Bairoch, A. (2002). The PROSITE database, its status in 2002. *Nucleic Acids Res.* **30**, 235-238.
- Fankhauser, C., y Chory, J. (1997). Light control of plant development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**, 203-229.
- Faure, J.D., Vittorioso, P., Santoni, V., Fraiser, V., Prinsen, E., Barlier, I., Van Onckelen, H., Caboche, M., y Bellini, C. (1998). The *PASTICCINO* genes of *Arabidopsis thaliana* are involved in the control of cell division and differentiation. *Development* **125**, 909-918.
- Feldmann, K.A., Malmberg, L.R., 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.
- 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.
- Felsenstein, J. (1988). Phylogenies from molecular sequences: inference and reliability. *Annu. Rev. Genet.* **22**, 521-565.
- Ferkey, D.M., y Kimelman, D. (2000). GSK-3: new thoughts on an old enzyme. *Dev. Biol.* **225**, 471-479.
- Ferkey, D.M., y Kimelman, D. (2002). Glycogen synthase kinase-3 beta mutagenesis identifies a common binding domain for GBP and Axin. *J. Biol. Chem.* **277**, 16147-16152.
- Finkelstein, R.R., Wang, M.L., Lynch, T.J., Rao, S., y Goodman, H.M. (1998). The *Arabidopsis* abscisic acid response locus *ABI4* encodes an APETALA 2 domain protein. *Plant Cell* **10**, 1043-1054.
- Flavell, R. (1980). The molecular characterization and organization of plant chromosomal DNA sequences. *Annu. Rev. Plant Phys.* **31**, 569-596.
- Fleming, A.J. (2002). The mechanism of leaf morphogenesis. *Planta* **216**, 17-22.
- Fletcher, J.C. (2002). Shoot and floral meristem maintenance in *Arabidopsis*. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**, 45-66.
- Fletcher, J.C., Brand, U., Running, M.P., Simon, R., y Meyerowitz, E.M. (1999). Signaling of cell fate decisions by CLAVATA3 in *Arabidopsis* shoot meristems. *Science* **283**, 1911-1914.
- Fletcher, J.C., y Meyerowitz, E.M. (2000). Cell signaling within the shoot meristem. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**, 23-30.
- Foard, D.E. (1971). The initial protrusion of a leaf primordium can form without current periclinal cell divisions. *Can. J. Bot.* **49**, 1601-1603.
- Fosket, D.E. (1994). *Plant growth and development: a molecular approach*. Academic Press.
- Fowler, J.E., y Freeling, M. (1996). Genetic analysis of mutations that alter cell fates in maize leaves: dominant *Liguleless* mutations. *Dev. Genet.* **18**, 198-222.
- Fraser, E., Young, N., Dajani, R., Franca-Koh, J., Ryves, J., Williams, R.S., Yeo, M., Webster, M.T., Richardson, C., Smalley, M.J., Pearl, L.H., Harwood, A., y Dale, T.C. (2002). Identification of the Axin and Frat binding region of glycogen synthase kinase-3. *J. Biol. Chem.* **277**, 2176-2185.
- Freeling, M., y Lane, B. (1994). The maize leaf. En *The maize handbook*, pp. 17-28. Freeling, M. y Walbot, V. (eds.). Springer-Verlag.

- Friedrichsen, D. M., Joazeiro, C. A., Li, J., Hunter, T., y Chory, J. (2000). Brassinosteroid-insensitive-1 is a ubiquitously expressed leucine-rich repeat receptor serine/threonine kinase. *Plant Physiol.* **123**, 1247-1256.
- Friedrichsen, D., y Chory J. (2001). Steroid signaling in plants: from the cell surface to the nucleus. *Bioessays* **23**, 1028-1036.
- Friml, J., y Palme, K. (2002). Polar auxin transport-old questions and new concepts?. *Plant Mol. Biol.* **49**, 273-284
- Fujita, H., y Syono, K. (1996). Genetic analysis of the effects of polar auxin transport inhibitors on root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **37**, 1094-1101.
- Furner, I.J., y Pumfrey, J.E. (1992). Cell fate in the shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **115**, 755-764.
- Furutani, I., Watanabe, Y., Prieto, R., Masukawa, M., Suzuki, K., Naoi, K., Thitamadee, S., Shikanai, T., y Hashimoto, T. (2000). The *SPIRAL* genes are required for directional control of cell elongation in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **127**, 4443-4453.
- Gachotte, D., Meens, R., y Benveniste, P. (1995). An *Arabidopsis* mutant deficient in sterol biosynthesis: heterologous complementation by *ERG 3* encoding a delta 7-sterol-C-5-desaturase from yeast. *Plant J* **8**, 407-416.
- Gaedeke, N., Klein, M., Kolukisaoglu, U., Forestier, C., Muller, A., Ansoerge, M., Becker, D., Mamnun, Y., Kuchler, K., Schulz, B., Mueller-Roeber, B., y Martinoia, E. (2001). The *Arabidopsis thaliana* ABC transporter AtMRP5 controls root development and stomata movement. *EMBO J.* **20**, 1875-1887.
- Galat, A. (2000). Sequence diversification of the FK506-binding proteins in several different genomes. *Eur. J. Biochem.* **267**, 4945-4959.
- Galigniana, M.D., Radanyi, C., Renoir, J.M., Housley, P.R., y Pratt, W.B. (2001). Evidence that the peptidylprolyl isomerase domain of the hsp90-binding immunophilin FKBP52 is involved in both dynein interaction and glucocorticoid receptor movement to the nucleus. *J. Biol. Chem.* **276**, 14884-14889.
- García-Bellido, A. (1986). Genetic analysis of morphogenesis. En *Genetics, development and evolution*. Gustafson, J.P., Stebbins, G.L., y Ayala, F.J. (eds.). Plenum Publishing Corporation.
- 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.
- García-Hernández, M., Berardini, T.Z., Chen, G., Crist, D., Doyle, A., Huala, E., Knee, E., Lambrecht, M., Miller, N., Mueller, L.A., Mundodi, S., Reiser, L., Rhee, S.Y., Scholl, R., Tacklind, J., Weems, D.C., Wu, Y., Xu, I., Yoo, D., Yoon, J., y Zhang, P. (2002). TAIR: a resource for integrated *Arabidopsis* data. *Funct. Integr. Genomics* **2**. 239-253.
- Gilbert, S.F. (2000). *Developmental Biology*. Sinauer Associates.
- Gleave, A.P. (1992). A versatile binary vector system with a T-DNA organisational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome. *Plant Mol. Biol.* **20**, 1203-1207.
- Goda, H., Shimada, Y., Asami, T., Fujioka, S., y Yoshida, S. (2002). Microarray analysis of brassinosteroid-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **130**, 1319-1334.
- Goethe, J.W. von (1790). Versuch die Metamorphose der Pflanzen zu Erklären. Gotha: C. W. Ettinger.
- Goff, S.A., et al., (2002). A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science* **296**, 92-100.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., y Oliver, S.G. (1996). Life with 6000 genes. *Science* **274**, 546, 563-567.
- Goliber, T., Kessler, S., Chen, J.J., Bharathan, G., y Sinha, N. (1999). Genetic, molecular, and morphological analysis of compound leaf development. *Curr. Top Dev. Biol.* **43**, 259-290.

- Golz, J.F., y Hudson, A. (2002). Signalling in plant lateral organ development. *Plant Cell* **14 Suppl**, S277-S288.
- Gómez-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.
- Gourlay, C.W., Hofer, J.M., y Ellis, T.H. (2000). Pea compound leaf architecture is regulated by interactions among the genes *UNIFOLIATA*, *cochleata*, *afila*, and *tendrill-less*. *Plant Cell* **12**, 1279-1294.
- 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.
- Grunwald, D. J., y Eisen, J. S. (2002). Headwaters of the zebrafish - emergence of a new model vertebrate. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 717-724.
- Ha, C.M., Kim, G.T., Kim, B.C., Jun, J.H., Soh, M.S., Ueno, Y., Machida, Y., Tsukaya, H., y Nam, H.G. (2003). The *BLADE-ON-PETIOLE 1* gene controls leaf pattern formation through the modulation of meristematic activity in *Arabidopsis*. *Development* **130**, 161-172.
- 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.
- Hagemann, W. (1984). Morphological aspects in leaf development in ferns and angiosperms. En *Contemporary Problems in Plant Anatomy*, pp. 301-349. White, R.A., y Dickison, W.C. (eds). Academic Press.
- Hake, S., y Ori, N. (2002). Plant morphogenesis and *KNOX* genes. *Nat. Genet.* **31**, 121-122.
- Hake, S., y Sinha, N. (1991). Genetic analysis of leaf development. En *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology*, pp. 187-222. Mifflin, B.J. (ed.). Oxford University Press.
- Haldane, J.B.S., y Smith, C.A.B. (1947). A new estimate for the linkage between the genes for colour-blindness and haemophilia in man. *Ann. Eugen.* **14**, 10-31.
- Hall, A.E., Fiebig, A., y Preuss, D. (2002). Beyond the *Arabidopsis* genome: opportunities for comparative genomics. *Plant Physiol.* **129**, 1439-1447.
- Hall, L.N., y Langdale, J.A. (1996). Molecular genetics of cellular differentiation in leaves. *New Phytol.* **132**, 533-553.
- Hamada, S., Onouchi, H., Tanaka, H., Kudo, M., Liu, Y.G., Shibata, D., MacHida, C., y Machida, Y. (2000). Mutations in the *WUSCHEL* gene of *Arabidopsis thaliana* result in the development of shoots without juvenile leaves. *Plant J.* **24**, 91-101.
- Hanks, S.K. (1991). Eukaryotic protein kinases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1**, 369-383.
- 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.
- Harper, L., y Freeling, M. (1996). Interactions of *liguleless1* and *liguleless2* function during ligule induction in maize. *Genetics* **144**, 1871-1882.
- Harrar, Y., Bellini, C., y Faure, J.D. (2001). FKBP: at the crossroads of folding and transduction. *Trends Plant Sci.* **6**, 426-431.
- Harrell, J.M., Kurek, I., Breiman, A., Radanyi, C., Renoir, J.M., Pratt, W.B., y Galigniana, M.D. (2002). All of the protein interactions that link steroid receptor-hsp90-immunophilin heterocomplexes to cytoplasmic dynein are common to plant and animal cells. *Biochemistry* **41**, 5581-5587.
- Hashimoto, T. (2002). Molecular genetic analysis of left-right handedness in plants. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **357**, 799-808.

- Hazan, J., Dubay, C., Pankowiak, M.P., Becuwe, N., y Weissenbach, J. (1992). A genetic linkage map of human chromosome 20 composed entirely of microsatellite markers. *Genomics* **12**, 183-189.
- He, J.X., Gendron, J.M., Yang, Y., Li, J., y Wang, Z.Y. (2002). The GSK3-like kinase BIN2 phosphorylates and destabilizes BZR1, a positive regulator of the brassinosteroid signaling pathway in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 10185-10190.
- He, Z., Wang, Z.Y., Li, J., Zhu, Q., Lamb, C., Ronald, P., y Chory, J. (2000). Perception of brassinosteroids by the extracellular domain of the receptor kinase BRI1. *Science* **288**, 2360-2363.
- Hearne, C.M., Ghosh, S., y Todd, J.A. (1992). Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. *Trends Genet.* **8**, 288-293.
- Hemenway, C.S. y Heitman, J. (1996). Immunosuppressant target protein FKBP12 is required for P-glycoprotein function in yeast. *J. Biol. Chem.* **271**, 18527-18534.
- Henikoff, S., y Henikoff, J.G. (1992). Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 10915-10519.
- Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas P.J., y Schilperoort R.A. (1983). A binary plant vector strategy based on separation of vir and T-region of the *A. tumefaciens* Ti plasmid. *Nature* **303**, 179-180.
- Hofer, J., Turner, L., Hellens, R., Ambrose, M., Matthews, P., Michael, A., y Ellis, N. (1997). *UNIFOLIATA* regulates leaf and flower morphogenesis in pea. *Curr. Biol.* **7**, 581-587.
- Hofer, J.M.I., y Ellis, T.H.N. (1998). The genetic control of patterning in pea leaves. *Trends Plant Sci.* **3**, 439-444.
- Howell, S.H. (1998a). *Molecular Genetics of Plant Development*. Cambridge University Press.
- Howell, S.H. (1998b). Leaf development. En *Molecular Genetics of Plant Development* pp. 136-168. Howell, S.H. (ed.) Cambridge University Press.
- Hu, Y., Bao, F., y Li, J. (2000). Promotive effect of brassinosteroids on cell division involves a distinct CycD3-induction pathway in *Arabidopsis*. *Plant J.* **24**, 693-701.
- Hudson, A., y Goodrich, J. (1997). Plant meristems: cell signalling keeps the balance. *Curr. Biol.* **7**, R427-429.
- Hülkamp, M., Miséra, S., y Jürgens, G. (1994). Genetic dissection of trichome cell development in *Arabidopsis*. *Cell* **76**, 555-566.
- Innan, H., Terauchi, R., y Miyashita, N.T. (1997). Microsatellite polymorphism in natural populations of the wild plant *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **146**, 1441-1452.
- International Human Genome Sequencing Consortium (2001). Initial Sequencing and Analysis of the Human Genome. *Nature* **409**, 860-921.
- Irish, V.F., y Sussex, I.M. (1992). A fate map of the *Arabidopsis* embryonic shoot apical meristem. *Development* **115**, 745-753.
- Ishida, T., Aida, M., Takada, S., y Tasaka, M. (2000). Involvement of *CUP-SHAPED COTYLEDON* genes in gynoecium and ovule development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **41**, 60-67.
- Iwakawa, H., Ueno, Y., Semiarti, E., Onouchi, H., Kojima, S., Tsukaya, H., Hasebe, M., Soma, T., Ikezaki, M., Machida, C., y Machida, Y. (2002). The *ASYMMETRIC LEAVES2* gene of *Arabidopsis thaliana*, required for formation of a symmetric flat leaf lamina, encodes a member of a novel family of proteins characterized by cysteine repeats and a leucine zipper. *Plant Cell Physiol.* **43**, 467-478.
- Jack, T. (2001). Plant development going MADS. *Plant Mol. Biol.* **46**, 515-520.
- 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.
- Jander, G., Norris, S.R., Rounsley, S.D., Bush, D.F., Levin, I.M., y Last, R.L. (2002). *Arabidopsis* map-based cloning in the post-genome era. *Plant Physiol.* **129**, 440-450.
- Janssen, B.J., Lund, L., y Sinha, N. (1998). Overexpression of a homeobox gene, *LeT6*, reveals indeterminate features in the tomato compound leaf. *Plant Physiol.* **117**, 771-786.
- Jeanmougin, F., Thompson, J.D., Gouy, M., Higgins, D.G., y Gibson, T.J. (1998). Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 403-405.
- Jeong, S., Trotochaud, A.E., y Clark, S.E. (1999). The *Arabidopsis* *CLAVATA2* gene encodes a receptor-like protein required for the stability of the *CLAVATA1* receptor-like kinase. *Plant Cell* **11**, 1925-1934.
- Jin, P., Guo, T., y Becraft, P.W. (2000). The maize *CR4* receptor-like kinase mediates a growth factor-like differentiation response. *Genesis* **27**, 104-116.
- Johnson, H.B. (1975). Plant Pubescence: An ecological perspective. *Bot. Rev.* **41**, 233-258.
- Jonak, C., Heberle-Bors, E., y Hirt, H. (1995). Inflorescence-specific expression of *AtK-1*, a novel *Arabidopsis thaliana* homologue of *shaggy/glycogen synthase kinase-3*. *Plant Mol. Biol.* **27**, 217-221.
- Jonak, C., y Hirt, H. (2002). Glycogen synthase kinase 3/SHAGGY-like kinases in plants: an emerging family with novel functions. *Trends Plant Sci.* **7**, 457-461.
- Jorgensen, E.M., y Mango, S.E. (2002). The art and design of genetic screens: *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 356-369.
- Jürgens, G., y Mayer, U. (1994). *Arabidopsis*. En *Embryos*, pp. 7-21. Bard, J. (ed.). Wolfe Publishing, London.
- Kahn, R.A., Der, C.J., y Bokoch, G.M. (1992). The ras superfamily of GTP-binding proteins: guidelines on nomenclature. *FASEB J.* **6**, 2512-2513.
- Kamalay, J.C., y Goldberg, R.B. (1980). Regulation of structural gene expression in tobacco. *Cell* **19**, 935-946.
- Kamphausen, T., Fanghanel, J., Neumann, D., Schulz, B., y Rahfeld, J.U. (2002). Characterization of *Arabidopsis thaliana* AtFKBP42 that is membrane-bound and interacts with Hsp90. *Plant J.* **32**, 263-276.
- Kang, J.G., Yun, J., Kim, D.H., Chung, K.S., Fujioka, S., Kim, J.I., Dae, H.W., Yoshida, S., Takatsuto, S., Song, P.S., y Park, C.M. (2001). Light and brassinosteroid signals are integrated via a dark-induced small G protein in etiolated seedling growth. *Cell* **105**, 625-636.
- Kaplan, D.R., y Hagemann, W. (1991). The relationship of cell and organism in vascular plants. *BioScience* **41**, 693-703.
- Kaya, H., Shibahara, K.I., Taoka, K.I., Iwabuchi, M., Stillman, B., y Araki, T. (2001). *FASCIATA* genes for chromatin assembly factor-1 in *Arabidopsis* maintain the cellular organization of apical meristems. *Cell* **104**, 131-142.
- Keddie, J.S., Carroll, B., Jones, J.D.G., y Grissem, W. (1996). The *DCL* gene of tomato is required for chloroplast development and palisade cell morphogenesis in leaves. *EMBO J.* **15**, 4208-4217.
- Kepinski, S., y Leyser, O. (2002). Ubiquitination and auxin signaling: a degrading story. *Plant Cell* **14**, S81-S95.
- 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., Bollman, K., Taylor, R.A., Bomblied, K., y Poethig, R.S. (2001). *KANADI* regulates organ polarity in *Arabidopsis*. *Nature* **411**, 706-709.
- Kerstetter, R.A., y Hake, S. (1997). Shoot meristem formation in vegetative development. *Plant Cell* **9**, 1001-1010.

- Kerstetter, R.A., y Poethig, R.S. (1998). The specification of leaf identity during shoot development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**, 373-398.
- Kidner, C. (1999). *YABBY* genes in plants. *Trends Genet.* **15**, 260.
- Kim, C., Jeong, D.H., y An, G. (2000). Molecular cloning and characterization of OsLRK1 encoding a putative receptor-like protein kinase from *Oryza sativa*. *Plant Sci.* **12**, 17-26.
- Kim, G., Tsukaya, H., y Uchimiya, H. (1998). The *ROTUNDIFOLIA3* gene of *Arabidopsis thaliana* encodes a new member of the cytochrome P-450 family that is required for the regulated polar elongation of leaf cells. *Genes Dev.* **12**, 2381-2391.
- Kim, G.T., Shoda, K., Tsuge, T., Cho, K.H., Uchimiya, H., Yokoyama, R., Nishitani, K., y Tsukaya, H. (2002). The *ANGUSTIFOLIA* gene of *Arabidopsis*, a plant *CtBP* gene, regulates leaf-cell expansion, the arrangement of cortical microtubules in leaf cells and expression of a gene involved in cell-wall formation. *EMBO J.* **21**, 1267-1279.
- Kim, G.T., Tsukaya, H., Saito, Y., y Uchimiya, H. (1999). Changes in the shapes of leaves and flowers upon overexpression of cytochrome P450 in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 9433-9437.
- Kim, L., y Kimmel, A.R. (2000). GSK3, a master switch regulating cell-fate specification and tumorigenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **10**, 508-514.
- Kinsman, E.A., y Pyke, K.A. (1998). Bundle sheath cells and cell-specific plastid development in *Arabidopsis* leaves. *Development* **125**, 1815-1822.
- Klahre, U., Noguchi, T., Fujioka, S., Takatsuto, S., Yokota, T., Nomura, T., Yoshida, S., y Chua, N.H. (1998). The *Arabidopsis* *DIMINUTO/DWARF1* gene encodes a protein involved in steroid synthesis. *Plant Cell* **10**, 1677-1690.
- Klimyuk, V.I., y Jones, J.D. (1997). *AtDMC1*, the *Arabidopsis* homologue of the yeast *DMC1* gene: characterization, transposon-induced allelic variation and meiosis-associated expression. *Plant J.* **11**, 1-14.
- Klucher, K.M., Chow, H., Reiser, L., y Fischer, R.L. (1996). The *AINTEGUMENTA* gene of *Arabidopsis* required for ovule and female gametophyte development is related to the floral homeotic gene *APETALA2*. *Plant Cell* **8**, 137-153.
- Koizumi, K., Sugiyama, M., y Fukuda, H. (2000). A series of novel mutants of *Arabidopsis thaliana* that are defective in the formation of continuous vascular network: calling the auxin signal flow canalization hypothesis into question. *Development* **127**, 3197-3204.
- Koka, C.V., Cerny, R.E., Gardner, R.G., Noguchi, T., Fujioka, S., Takatsuto, S., Yoshida, S., y Clouse S.D. (2000). A putative role for the tomato genes *DUMPY* and *CURL-3* in brassinosteroid biosynthesis and response. *Plant Physiol.* **122**, 85-98.
- 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. (1994). *Arabidopsis* genetics. En *Arabidopsis*, pp. 89-120. Meyerowitz, E.M., y Somerville, C.R. (eds.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Koornneef, M., y Stam, P. (1992). *Genetic analysis*. En *Methods in Arabidopsis research*, pp. 83-99. Koncz, C., Chua, N.H., y Schell, J. (eds.). World Scientific.
- Kosambi, D.D. (1944). The estimation of map distance from recombination values. *Ann. Eugen.* **12**, 172-175.
- Kranz, A.R., y Kirchheim, B. (1987). Genetic resources in *Arabidopsis*. *Arabid. Inf. Serv.* **24**.
- Kropf, D.L., Bisgrove, S.R., y Hable, W.E. (1998). Cytoskeletal control of polar growth in plant cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 117-122.
- Kruglyak, L. (1997). The use of a genetic map of biallelic markers in linkage studies. *Nat. Genet.* **17**, 21-24.
- Kumaran, M.K., Bowman, J.L., y Sundaresan, V. (2002). *YABBY* polarity genes mediate the repression of *KNOX* homeobox genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**, 2761-2770.

- Lagercrantz, U., Ellegren, H., y Andersson, L. (1993). The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic Acids Res.* **21**, 1111-1115.
- Laibach, F. (1943). *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. als object für genetische und entwicklungsphysiologische untersuchungen. *Bot. Arch.* **44**, 439-455.
- Lander, E.S., Green, P., Abrahamson, J., Barlow, A., Daly, M.J., Lincoln, S.E., y Newburg, L. (1987). MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* **1**, 174-181.
- Langridge, J. (1955). Biochemical mutations in the crucifer *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Nature* **176**, 260-261.
- Langridge, J. (1994). *Arabidopsis thaliana*, a plant *Drosophila*. *BioEssays* **16**, 775-778.
- 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 Mayer, K.F. (1998). Cell fate regulation in the shoot meristem. *Semin. Cell Dev. Biol.* **9**, 195-200.
- Lee, I., Wolfe, D.S., Nilsson, O., y Weigel, D. (1997). A *LEAFY* co-regulator encoded by *UNUSUAL FLORAL ORGANS*. *Curr. Biol.* **7**, 95-104.
- Lee-Chen, S., y Steinitz-Sears, L.M. (1967). The location of linkage groups in *Arabidopsis thaliana*. *Can. J. Genet. Cytol.* **9**, 381-384.
- Lenhard, M., y Laux, T. (1999). Shoot meristem formation and maintenance. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**, 44-50.
- Leutwiler, L.S., Hough-Evans, B.R., y Meyerowitz, E.M. (1984). The DNA of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* **194**, 15-29.
- Levy, Y.Y., y Dean, C. (1998). Control of flowering time. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 49-54.
- Leyser, H.M., Lincoln, C.A., Timpote, C., Lammer, D., Turner, J., y Estelle, M. (1993). *Arabidopsis* auxin-resistance gene *AXR1* encodes a protein related to ubiquitin-activating enzyme E1. *Nature* **364**, 161-164.
- Leyser, H.M.O., y Furner, I.J. (1992). Characterisation of three shoot apical meristem mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **116**, 397-403.
- Li, H., Culligan, K., Dixon, R.A., y Chory, J. (1995). *CUE1*: a mesophyll cell-specific positive regulator of light-controlled gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **7**, 1599-1610.
- Li, H., Shen, J.J., Zheng, Z.L., Lin, Y., y Yang, Z. (2001a). The Rop GTPase switch controls multiple developmental processes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **126**, 670-684.
- 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.
- Li, J., Nam, K.H., Vafeados, D., y Chory, J. (2001c). *BIN2*, a new brassinosteroid-insensitive locus in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **127**, 14-22.
- Li, J., Wen, J., Lease, K.A., Doke, J.T., Tax, F.E., y Walker, J.C. (2002). BAK1, an *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell* **110**, 213-222.
- Li, J., y Chory, J. (1997). A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell*, **90**, 929-938.
- Li, J., y Chory, J. (1999). Brassinosteroid actions in plants. *J. Exp. Bot.* **50**, 275-282.
- Li, J., y Nam, K. H. (2002). Regulation of brassinosteroid signaling by a GSK3/SHAGGY-like kinase. *Science* **295**, 1299-1301.
- Li, S., y Rédei, G.P. (1969). Estimation of mutation rates in autogamous diploids. *Radiat. Bot.* **9**, 125-131.
- Li, X., Yost, H.J., Virshup, D.M., y Seeling, J.M. (2001b). Protein phosphatase 2A and its B56 regulatory subunit inhibit Wnt signaling in *Xenopus*. *EMBO J.* **20**, 4122-4131.
- 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.
- Lincoln, S., Daly, M., y Lander, E. (1992). Constructing genetic maps with MAPMAKER/EXP 3.0. Whitehead Institute Press, Cambridge, MA, USA. Technical Report, 3rd ed.
- Liscum, E., y Reed, J.W. (2002). Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. *Plant Mol. Biol.* **49**, 387-400.
- Lister, C., y Dean, C. (1993). Recombinant Inbred Lines for mapping RFLP and phenotypic markers in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **4**, 745-750.
- Litt, M., y Luty, J.A. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* **44**, 397-401.
- Liu, Y.G., Mitsukawa, N., Vazquez-Tello, A., Whittier, R.F. (1995). Generation of a high-quality P1 library of *Arabidopsis* suitable for chromosome walking. *Plant J.* **7**, 351-358.
- Liu, Z., y Meyerowitz, E.M. (1995). *LEUNIG* regulates *AGAMOUS* expression in *Arabidopsis* flowers. *Development* **121**, 975-991.
- Lolle, S.J., Cheung, A.Y., y Sussex, I.M. (1992). *Fiddlehead*: an *Arabidopsis* mutant constitutively expressing an organ fusion program that involves interactions between epidermal cells. *Dev. Biol.* **152**, 383-392.
- Lolle, S.J., Hsu, W., y Pruitt, R.E. (1998). Genetic analysis of organ fusion in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **149**, 607-619.
- Long, J., y Barton, M.K. (2000). Initiation of axillary and floral meristems in *Arabidopsis*. *Dev. Biol.* **218**, 341-353.
- 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.
- Long, J.A., y Barton, M.K. (1998). The development of apical embryonic pattern in *Arabidopsis*. *Development* **125**, 3027-3035.
- López-Juez, E., Paul Jarvis, R., Takeuchi, A., Page, A.M., y Chory, J. (1998). New *Arabidopsis cue* mutants suggest a close connection between plastid and phytochrome regulation of nuclear gene expression. *Plant Physiol.* **118**, 803-815.
- Lu, C., y Fedoroff, N. (2000). A mutation in the *Arabidopsis HYL1* gene encoding a dsRNA binding protein affects responses to abscisic acid, auxin, and cytokinin. *Plant Cell* **12**, 2351-2366.
- Lukowitz, W., Gillmor, C.S., y Scheible, W.R. (2000). Positional cloning in *Arabidopsis*. Why it feels good to have a genome initiative working for you. *Plant Physiol.* **123**, 795-805.
- Luschign, C. (2002). Auxin transport: ABC proteins join the club. *Trends Plant Sci.* **7**, 329.
- Lyndon, R.F. (1990). *Plant Development*. Unwin Hyman.
- Lynn, K., Fernandez, A., Aida, M., Sedbrook, J., Tasaka, M., Masson, P., y Barton, M.K. (1999). The *PINHEAD/ZWILLE* gene acts pleiotropically in *Arabidopsis* development and has overlapping functions with the *ARGONAUTE1* gene. *Development* **126**, 469-481.
- Marchant, A, Kargul, J., May, S.T., Muller, P., Delbarre, A., Perrot-Rechenmann, C., y Bennett, M. J. (1999). AUX1 regulates root gravitropism in *Arabidopsis* by facilitating auxin uptake within root apical tissues. *EMBO J.* **18**, 2066-2073.
- Marcinkowska, E., y Wiedlocha, A. (2002). Steroid signal transduction activated at the cell membrane: from plants to animals. *Acta Biochem. Pol.* **49**, 735-745.
- Marienfild, J., Unseld, M., y Brennicke, A. (1999). The mitochondrial genome of *Arabidopsis* is composed of both native and immigrant information. *Trends Plant Sci.* **4**, 495-502.
- Martin, C., Bhatt, K., y Baumann, K. (2001). Shaping in plant cells. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**, 540-549.
- Mattsson, J., Sung, Z.R., y Berleth, T. (1999). Responses of plant vascular systems to auxin transport inhibition. *Development* **126**, 2979-2991.

- Mayer, K.F., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jurgens, G., y Laux, T. (1998). Role of *WUSCHEL* in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell* **95**, 805-815.
- Mayer, U., Torres-Ruiz, R., Berleth, T., Misera, S., y Jürgens, G. (1991). *Nature* **353**, 402-407.
- Mayumi, K., y Shibaoka, H. (1995). A possible double role for brassinolide in the reorientation of cortical microtubules in the epidermal cell of azuki bean epicotyls. *Plant Cell Physiol.* **36**, 173-181.
- McCarty, D.R., y Chory, J. (2000). Conservation and innovation in plant signaling pathways. *Cell*, **103**, 201-209.
- McConnell, J.R., Emery, J., Eshed, Y., Bao, N., Bowman, J., y Barton, M.K. (2001). Role of *PHABULOSA* and *PHAVOLUTA* in determining radial patterning in shoots. *Nature* **411**, 709-713.
- McConnell, J.R., y Barton, M.K. (1995). Effect of mutations in the *PINHEAD* gene of *Arabidopsis* on the formation of the shoot apical meristem. *Dev. Genet.* **16**, 358-366.
- McConnell, J.R., y Barton, M.K. (1998). Leaf polarity and meristem formation in *Arabidopsis*. *Development* **125**, 2935-2942.
- McHale, N.A. (1992). A nuclear mutation blocking initiation of the lamina in leaves of *Nicotiana glauca*. *Planta* **186**, 355-360.
- McHale, N.A. (1993). *LAM-1* and *FAT* genes control development of the leaf blade in *Nicotiana glauca*. *Plant Cell* **5**, 1029-1038.
- McHale, N.A., y Marcotrigiano, M. (1998). *LAMI* is required for dorsoventrality and lateral growth of the leaf blade in *Nicotiana glauca*. *Development* **125**, 4235-4243.
- Medford, J.I., Elmer, J.S., y Klee, H.J. (1991). Molecular cloning and characterization of genes expressed in shoot apical meristems. *Plant Cell* **3**, 359-370.
- 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.
- Medford, J.I., Callos, J.D., Behringer, F.J., y Link, B.M. (1994). Development of the vegetative shoot apical meristem. En *Arabidopsis*, pp. 355-378. Meyerowitz, E.M., y Somerville, C.R. (eds.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Meinke, D. (1992). A homeotic mutant of *Arabidopsis thaliana* with leafy cotyledons. *Science* **258**, 1647-1650.
- Meinke, D., y Koornneef, M. (1997). Community standards for *Arabidopsis* genetics. *Plant J.* **12**, 247-253.
- Meinke, D.W., Cherry, J.M., Dean, C., Rounsley, S.D., y Koornneef, M. (1998). *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science* **282**, 678-682.
- Meinke, D.W., Meinke, L.K., Showalter, T.C., Schissel, A.M., Mueller, L.A., y Tzafir, I. (2003). A sequence-based map of *Arabidopsis* genes with mutant phenotypes. *Plant Physiol.* **131**, 409-418.
- 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). Plant developmental biology: green genes for the 21st century. *BioEssays* **16**, 621-625.
- Meyerowitz, E.M. (1994c). 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.
- Meyerowitz, E.M., y Pruitt, R.E. (1985). *Arabidopsis thaliana* and plant molecular genetics. *Science* **229**, 1214-1218.

- Micol, J.L., y Hake, S. (2003). The development of plant leaves. *Plant Physiol.* **131**, 389-394.
- Mizukami, Y., y Fischer, R.L. (2000). Plant organ size control: AINTEGUMENTA regulates growth and cell numbers during organogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 942-947.
- Moller, S.G., y Chua, N.H. (1999). Interactions and intersections of plant signaling pathways. *J. Mol. Biol.* **293**, 219-234.
- Montoya, T., Nomura, T., Farrar, K., Kaneta, T., Yokota, T., y Bishop, G.J. (2002). Cloning the tomato *curl3* gene highlights the putative dual role of the leucine-rich repeat receptor kinase tBRI1/SR160 in plant steroid hormone and peptide hormone signaling. *Plant Cell* **14**, 3163-3176.
- Moon, R.T., Bowerman, B., Boutros, M., y Perrimon, N. (2002). The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science* **296**, 1644-1646.
- Moose, S.P., y Sisco, P.H. (1994). *Glossy15* Controls the epidermal juvenile-to-adult phase transition in maize. *Plant Cell* **6**, 1343-1355.
- Moose, S.P., y Sisco, P.H. (1996). *Glossy15*, an *APETALA2-like* gene from maize that regulates leaf epidermal cell identity. *Genes Dev.* **10**, 3018-3027.
- Moreno, M.A., Harper, L.C., Krueger, R.W., Dellaporta, S.L., y Freeling, M. (1997). *liguleless1* encodes a nuclear-localized protein required for induction of ligules and auricles during maize leaf organogenesis. *Genes. Dev.* **11**, 616-628.
- Morton, N. (1955). Sequential tests for the detection of linkage. *Am. J. Hum. Genet.* **7**, 277-318.
- Moussian, B., Schoof, H., Haecker, A., Jurgens, G., y Laux, T. (1998). Role of the *ZWILLE* gene in the regulation of central shoot meristem cell fate during *Arabidopsis* embryogenesis. *EMBO J.* **17**, 1799-1809.
- Mozo, T., Dewar, K., Dunn, P., Ecker, J.R., Fischer, S., Kloska, S., Lehrach, H., Marra, M., Martienssen, R., Meier-Ewert, S., y Altmann, T. (1999). A complete BAC-based physical map of the *Arabidopsis thaliana* genome. *Nature Genet.* **22**, 271-275.
- Mozo, T., Fischer, S., Shizuya, H., y Altmann, T. (1998). Construction and characterization of the IGF *Arabidopsis* BAC library. *Mol. Gen. Genet.* **258**, 562-570.
- Muehlbauer, G.J., Fowler, J.E., Girard, L., Tyers, R., Harper, L., y Freeling, M. (1999). Ectopic expression of the maize homeobox gene *liguleless3* alters cell fates in the leaf. *Plant Physiol.* **119**, 651-662.
- 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.
- Müller, W.A. (1997). *Developmental Biology*. Springer-Verlag, New York.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., y Erilich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **51**, 263-273.
- Murashige, T., y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay, with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**, 473-497.
- Müssig, C., Fischer, S., y Altmann, T. (2002). Brassinosteroid-regulated gene expression. *Plant Physiol.* **129**, 1241-1251.
- Müssig, C., y Altmann, T. (2001). Brassinosteroid signaling in plants. *Trends Endocrinol. Metab.* **12**, 398-402.
- Nagpal, P., Walker, L.M., Young, J.C., Sonawala, A., Timpte, C., Estelle, M., y Reed, J.W. (2000). *AXR2* encodes a member of the Aux/IAA protein family. *Plant Physiol.* **123**, 563-574.
- Nakaya, M., Tsukaya, H., Murakami, N., y Kato, M. (2002). Brassinosteroids control the proliferation of leaf cells of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **43**, 239-244.

- Nelissen, H., Clarke, J.H., De Block, M., De Block, S., Vanderhaeghen, R., Zielinski, R.E., Dyer, T., Lust, S., Inze, D., y Van Lijsebettens, M. (2003). DRL1, a homolog of the yeast TOT4/KTI12 protein, has a function in meristem activity and organ growth in plants. *Plant Cell* **15**, 639-654.
- Neuffer, M.G., Coe, E.H., y Wessler, S.R. (1997). *Mutants of Maize*. Cold Spring Harbor Lab. Press.
- Neumann, C.J., y Cohen, S.M. (1997). Long-range action of Wingless organizes the dorsal-ventral axis of the *Drosophila* wing. *Development* **124**, 871-880.
- 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 accessing results from large-scale partial sequencing of anonymous *Arabidopsis* cDNA clones. *Plant Physiol.* **106**, 1241-1255.
- Nicol, F., His, I., Jauneau, A., Vernhettes, S., Canut, H., y Hofte, H. (1998). A plasma membrane-bound putative endo-1,4-beta-D-glucanase is required for normal wall assembly and cell elongation in *Arabidopsis*. *EMBO J.* **17**, 5563-5576.
- Noh, B., Murphy, A.S., y Spalding, E.P. (2001). Multidrug resistance-like genes of *Arabidopsis* required for auxin transport and auxin-mediated development. *Plant Cell* **13**, 2441-2454.
- Nomura, T., Nakayama, M., Reid, J.B., Takeuchi, Y., y Yokota, T. (1997). Blockage of brassinosteroid biosynthesis and sensitivity causes dwarfism in garden pea. *Plant Physiol.* **113**, 31-37.
- Ori, N., Eshed, Y., Chuck, G., Bowman, J.L., y Hake, S. (2000). Mechanisms that control *knox* gene expression in the *Arabidopsis* shoot. *Development* **127**, 5523-5532.
- Otsuga, D., DeGuzman, B., Prigge, M.J., Drews, G.N., y Clark, S.E. (2001). *REVOLUTA* regulates meristem initiation at lateral positions. *Plant J.* **25**, 223-236.
- Ouellet, F., Overvoorde, P.J., y Theologis, A. (2001). IAA17/AXR3. Biochemical insight into an auxin mutant phenotype. *Plant Cell*, **13**, 829-842.
- Page, D.R., y Grossniklaus, U. (2002). The art and design of genetic screens: *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 124-136.
- Page, R.D. (1996). TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* **12**, 357-358.
- Pang, P., y Meyerowitz, E.M. (1987). *Arabidopsis thaliana*, a model system for plant molecular biology. *Bio/Technology* **5**, 1177-1181.
- Parry, G., Delbarre, A., Marchant, A., Swarup, R., Napier, R., Perrot-Rechenmann, C. y Bennett, M. J. (2001). Novel auxin transport inhibitors phenocopy the auxin influx carrier mutation *aux1*. *Plant J.* **25**, 399-406.
- Pearson, W.R., Wood, T., Zhang, Z., y Miller, W. (1997). Comparison of DNA sequences with protein sequences. *Genomics* **46**, 24-36.
- Peleman, J., Cottyn, B., van Camp, W., van Montagu, M., e Inzé, D. (1991). Transient occurrence of extrachromosomal DNA of an *Arabidopsis thaliana* transposon-like element, *Tat1*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 3618-3622.
- Pennisi, E. (2003). HUMAN GENOME: Reaching their goal early, sequencing labs celebrate. *Science* **300**, 409.
- Pérez-Pérez, J.M., Ponce, M.R., y Micol, J.L. (2002). The *UCUI Arabidopsis* gene encodes a SHAGGY/GSK3-like kinase required for cell expansion along the proximodistal axis. *Dev. Biol.* **242**, 161-173.
- Piñeiro, M., y Coupland, G. (1998). The control of flowering time and floral identity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **117**, 1-8.
- Pines, J. (1994). Protein kinases and cell cycle control. *Semin. Cell Biol.* **5**, 399-408.
- Plesch, G., Stormann, K., Torres, J.T., Walden, R., y Somssich, I.E. (1997). Developmental and auxin-induced expression of the *Arabidopsis prha* homeobox gene. *Plant J.* **12**, 635-647.

- 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 cellular parameters of leaf development in tobacco: a clonal analysis. *Planta* **165**, 170-184.
- Poethig, R.S., y Sussex, I.M. (1985b). The developmental morphology and growth dynamics of the tobacco leaf. *Planta* **165**, 158-169.
- Ponce Molet, M.R. (1996). Aislamiento y caracterización molecular de genes de la superfamilia del TGF- β que se expresan en el embrión de *Strongylocentrotus purpuratus*. Tesis doctoral. Universidad de Alicante.
- Ponce, M.R., Pérez-Pérez, J. M., Piqueras, P. y Micol, J.L. (2000). A multiplex reverse transcriptase-polymerase chain reaction method for fluorescence-based semiautomated detection of gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **211**, 606-608.
- Ponce, M.R., Robles, P. y Micol, J.L. (1999). High-throughput genetic mapping in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* **261**, 408-415.
- Potter, C.J., y Xu, T. (2001). Mechanisms of size control. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**, 279-286.
- Pozzi, C., Müller, K.J., Rohde, W., y Salamini, F. (1999). Leaf development. En *Development. Genetics, Epigenetics and Environmental Regulation*, pp. 145-165. Russo, V.E.A., Cove, D.J., Edgar, L.G., Jaenisch, R., y Salamini, F. (eds.). Springer.
- Pozzi, C., Rossini, L., y Agosti, F. (2001). Patterns and symmetries in leaf development. *Semin. Cell Dev. Biol.* **12**, 363-372.
- Pratt, W.B., Krishna, P., y Olsen, L.J. (2001). Hsp90-binding immunophilins in plants: the protein movers. *Trends Plant Sci.* **6**, 54-58.
- Prigge, M.J., y Wagner, D.R. (2001). The *Arabidopsis* *SERRATE* gene encodes a zinc-finger protein required for normal shoot development. *Plant Cell* **13**, 1263-1279.
- Pruitt, R.E., Vielle-Calzada, J.P., Ploense, S.E., Grossniklaus, U., y Lolle, S.J. (2000). *FIDDLEHEAD*, a gene required to suppress epidermal cell interactions in *Arabidopsis*, encodes a putative lipid biosynthetic enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 1311-1316.
- Pruitt, R.E., y Meyerowitz, E.M. (1986). Characterization of the genome of *Arabidopsis thaliana*. *J. Mol. Biol.* **187**, 169-183.
- Przemeck, G.K., Mattsson, J., Hardtke, C.S., Sung, Z.R., y Berleth, T. (1996). Studies on the role of the *Arabidopsis* gene *MONOPTEROS* in vascular development and plant cell axialization. *Planta* **200**, 229-237.
- Purves, W.K., Orians, G.H., Heller, H.C., y Sadava, D. (1998). *Life: The Science of Biology*, 5th Edition. Sinauer Associates.
- 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.
- Pyke, K.A., Rutherford, S.M., Robertson, E.J., y Leech, R.M. (1994). *arc6*, a fertile *Arabidopsis* mutant with only two mesophyll cell chloroplasts. *Plant Physiol.* **106**, 1169-1177.
- Quesada, V., Ponce, M.R., y Micol, J.L. (1999). *OTC* and *AUL1*, two convergent and overlapping genes in the nuclear genome of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* **461**, 101-106.
- Ratcliffe, O.J., Riechmann, J.L., y Zhang, J.Z. (2000). *INTERFASCICULAR FIBERLESS1* is the same gene as *REVOLUTA*. *Plant Cell* **12**, 315-317.
- 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. Genet.* **9**, 111-127.
- Rédei, G.P., y Hirono, Y. (1964). Linkage studies. *Arabid. Inf. Serv.* **1**, 9-10.
- 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.

- Rédei, G.P., y Li, S.L. (1968). *Arabidopsis* as a research tool in genetics. *Arabid. Inf. Serv.* **5**, 3-5.
- Reed, J.W. (2001). Roles and activities of Aux/IAA proteins in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* **6**, 420-425.
- Reinholz, E. (1947a). Auslösung von Röntgenmutationen bei *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. und ihre Bedeutung die Pflanzenzüchtung und Evolutionstheorie. *Field Inf. Agency Tech. Rep.* **1006**, 1-70.
- Reinholz, E. (1947b). Röntgenmutationen bei *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Naturwissenschaften* **34**, 26-28.
- Reiter, R.S., Coomber, S.A., Bourett, T.M., Bartley, G.E., y Scolnik, P.A. (1994). Control of leaf and chloroplast development by the *Arabidopsis* gene *pale cress*. *Plant Cell* **6**, 1253-1264.
- Reiter, R.S., Williams, J.G., Feldmann, K.A., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., y Scolnik, P.A. (1992a). 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.
- Reiter, R.S., Young, R.M., y Scolnik, P.A. (1992b). Genetic linkage of the *Arabidopsis* genome: Methods for mapping with recombinant inbreds and Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs). En *Methods in Arabidopsis research*, pp. 170-190. Koncz, C., Chua, N.H., y Schell, J. (eds.). World Scientific.
- Relichova, J. (1976). Some new mutants. *Arabid. Inf. Serv.* **13**, 25-28.
- Reynolds, J.O., Eisses, J.F., y Sylvester, A.W. (1998). Balancing division and expansion during maize leaf morphogenesis: analysis of the mutant, *warty-1*. *Development* **125**, 259-268.
- Röbbelen, G. (1957). Über heterophyllie bei *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyn. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **70**, 39-44.
- Robertson, E.J., Pyke, K.A., y Leech, R.M. (1995). *arc6*, an extreme chloroplast division mutant of *Arabidopsis* also alters proplastid proliferation and morphology in shoot and root apices. *J. Cell Sci.* **108**, 2937-2944.
- Robles Ramos, P. (1999). Análisis genético de mutantes de *Arabidopsis thaliana* con alteraciones en la morfología de la hoja. Tesis Doctoral. Universidad Miguel Hernández.
- Robles, P., y Micol, J.L. (2001). Genome-wide linkage analysis of *Arabidopsis* genes required for leaf development. *Mol. Genet. Genomics*, **266**, 12-19.
- Rodríguez-Tome, P. (2001). EBI databases and services. *Mol. Biotechnol.* **18**, 199-212.
- Romano, C.P., Robson, P.R., Smith, H., Estelle, M., y Klee, H. (1995). Transgene-mediated auxin overproduction in *Arabidopsis*: hypocotyl elongation phenotype and interactions with the *hy6-1* hypocotyl elongation and *axr1* auxin-resistant mutants. *Plant Mol. Biol.* **27**, 1071-1083.
- Rouse, D., Mackay, P., Stirnberg, P., Estelle, M., y Leyser, O. (1998). Changes in auxin response from mutations in an *AUX/IAA* gene. *Science* **279**, 1371-1373.
- Roux, W. (1887). Beiträge zur Entwicklungs-mechanik des Embryo. *Arch. Mikrosk. Anat.* **29**, 157-212.
- Ruegger, M., Dewey, E., Gray, W.M., Hobbie, L., Turner, J., y Estelle, M. (1998). The TIR1 protein of *Arabidopsis* functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast *grr1p*. *Genes Dev.* **12**, 198-207.
- Rüffer-Turner, M., y Napp-Zinn, K. (1979). Investigations on leaf structure in several genotypes of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Arabid. Inf. Serv.* **16**, 94-98.
- Sachs, J.V. (1890). *History of botany, 1530-1860*. Clarendon Press, Oxford.
- Sachs, T. (1991). Cell polarity and tissue patterning in plants. *Development Suppl.* **1**, 83-93.
- Sakanaka, C., Sun, T.Q., y Williams, L.T. (2000). New steps in the Wnt/beta-catenin signal transduction pathway. *Recent Prog. Horm. Res.* **55**, 225-236.
- Sakurai, A., y Fujioka, S. (1997). Studies on biosynthesis of brassinosteroids. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**, 757-762.
- Sambrook, J., y Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning*. CSHL Press.

- Sanger, F., Nicklen, S., y Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Sano, H., y Youssefian, S. (1994). Light and nutritional regulation of transcripts encoding a wheat protein kinase homolog is mediated by cytokinins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 2582-2586.
- Satina, S., y Blakeslee, A.F. (1941). Periclinal chimeras in *Datura stramonium* in relation to development of leaf and flower. *Am. J. Bot.* **28**, 862-871.
- 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 polyploidy in periclinal chimeras. *Am. J. Bot.* **25**, 895-905.
- Sato, S., Nakamura, Y., Kaneko, T., Asamizu, E., y Tabata, S. (1999). Complete structure of the chloroplast genome of *Arabidopsis thaliana*. *DNA Res.* **6**, 283-290.
- Sawa, S., Watanabe, K., Goto, K., Kanaya, E., Morita, E.H., y Okada, K. (1999). *FILAMENTOUS FLOWER*, a meristem and organ identity gene of *Arabidopsis*, encodes a protein with a zinc finger and HMG-related domains. *Genes Dev.* **13**, 1079-1088.
- Sayle, R.A., y Milner-White, E.J. (1995). RASMOL: biomolecular graphics for all. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 374.
- Scanlon, M.J. (2000a). *NARROW SHEATH1* functions from two meristematic foci during founder-cell recruitment in maize leaf development. *Development* **127**, 4573-4585.
- Scanlon, M.J. (2000b). Developmental complexities of simple leaves. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**, 31-36.
- Scanlon, M.J., Schneeberger, R.G., y Freeling, M. (1996). The maize mutant *narrow sheath* fails to establish leaf margin identity in a meristematic domain. *Development* **122**, 1683-1691.
- Scanlon, M.J., y Freeling, M. (1997). Clonal sectors reveal that a specific meristematic domain is not utilized in the maize mutant *narrow sheath*. *Dev. Biol.* **182**, 52-66.
- Schichnes, D., Schneeberger, R., y Freeling, M. (1997). Induction of leaves directly from leaves in the maize mutant *Lax midrib1-O*. *Dev. Biol.* **186**, 36-45.
- Schiene-Fischer, C., y Yu, C. (2001). Receptor accessory folding helper enzymes: the functional role of peptidyl prolyl cis/trans isomerases. *FEBS Lett.* **495**, 1-6.
- Schneeberger, R., Tsiantis, M., Freeling, M., y Langdale, J.A. (1998). The *rough sheath2* gene negatively regulates homeobox gene expression during maize leaf development. *Development* **125**, 2857-2865.
- Schnittger, A., Folkers, U., Schwab, B., Jurgens, G., y Hulskamp, M. (1999). Generation of a spacing pattern: the role of *TRIPTYCHON* in trichome patterning in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **11**, 1105-1116.
- Schoof, H., Lenhard, M., Haecker, A., Mayer, K.F., Jurgens, G., y Laux, T. (2000). The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes. *Cell* **100**, 635-644.
- Schuler, G.D., Altschul, S.F., y Lipman, D.J. (1991). A workbench for multiple alignment construction and analysis. *Proteins* **9**, 180-190.
- Schumacher, K., y Chory J. (2000). Brassinosteroid signal transduction: still casting the actors. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**, 79-84.
- Schumacher, K., Vafeados, D., McCarthy, M., Sze, H., Wilkins, T., y Chory, J. (1999). The *Arabidopsis det3* mutant reveals a central role for the vacuolar H(+)-ATPase in plant growth and development. *Genes Dev.* **13**, 3259-3270.
- Schwarzacher, T. (1994). Mapping in plants: progress and prospects. *Curr. Opin. Genetics Dev.* **4**, 868-874.
- Scott, D.B., Jin, W., Ledford, H.K., Jung, H.S., y Honma, M.A. (1999). *EAF1* regulates vegetative-phase change and flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **120**, 675-684.
- Sears, L.M.S., y Lee-Chen, S. (1970). Cytogenetic studies in *Arabidopsis*. *Can. J. Genet. Cytol.* **12**, 217-223.

- Seeling, J.M., Miller, J.R., Gil, R., Moon, R.T., White, R., y Virshup, D.M. (1999). Regulation of beta-catenin signaling by the B56 subunit of protein phosphatase 2A. *Science* **283**, 2089-2091.
- Semiarti, E., Ueno, Y., Tsukaya, H., Iwakawa, H., Machida, C. and Machida, Y. (2001). The *ASYMMETRIC LEAVES2* gene of *Arabidopsis thaliana* regulates formation of a symmetric lamina, establishment of venation and repression of meristem-related homeobox genes in leaves. *Development* **128**, 1771-1783.
- Senger, M., Flores, T., Glatting, K., Ernst, P., Hotz-Wagenblatt, A., y Suhai, S. (1998). WWW interface to the GCG sequence analysis package. *Bioinformatics* **14**, 452-457.
- Sentoku, N., Sato, Y., y Matsuoka, M. (2000). Overexpression of rice *OSH* genes induces ectopic shoots on leaf sheaths of transgenic rice plants. *Dev. Biol.* **220**, 358-364.
- Serikawa, T., Kuramoto, T., Hilbert, P., Mori, M., Yamada, J., Dubay, C.J., Lindpainter, K., Ganten, D., Guenet, J.L., Lathrop, G.M., y Beckmann, J.S. (1992). Rat gene mapping using PCR-analyzed microsatellites. *Genetics* **131**, 701-721.
- Serna, L., y Fenoll, C. (1997). Tracing the ontogeny of stomatal clusters in *Arabidopsis* with molecular markers. *Plant J.* **12**, 747-755.
- Serrano-Cartagena, J. (1998). Disección genética del desarrollo de la hoja en *Arabidopsis thaliana*: Estudio de ecotipos y estirpes mutantes de la colección del *Arabidopsis* Information Service. Tesis Doctoral. Universidad de Alicante.
- Serrano-Cartagena, J., Candela, H., Robles, P., Ponce, M.R., Pérez-Pérez, J.M., Piqueras, P., y Micol, J.L. (2000). Genetic analysis of *incurvata* mutants reveals three independent genetic operations at work in *Arabidopsis* leaf morphogenesis. *Genetics* **156**, 1363-1377.
- Serrano-Cartagena, J., Robles, P., Ponce, M.R., y Micol, J.L. (1999). Genetic analysis of leaf form mutants from the *Arabidopsis* Information Service collection. *Mol. Gen. Genet.* **261**, 725-739.
- Sharma, V.K., y Fletcher, J.C. (2002). Maintenance of shoot and floral meristem cell proliferation and fate. *Plant Physiol.* **129**, 31-39.
- Sharpe, C., Lawrence, N., y Martínez Arias, A. (2001). Wnt signalling: a theme with nuclear variations. *Bioessays* **23**, 311-318.
- Sherr, C.J., y Roberts, J.M. (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* **9**, 1149-1163.
- Sherr, C.J., y Roberts, J.M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* **13**, 1501-1512.
- Shibaoka, H. (1994). Plant-hormone induced changes in the orientation of cortical microtubules: alterations in the crosslinking between microtubules and the plasma membrane. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45**, 527-544.
- Shirley, B.W., Hanley, S., y Goodman, H.M. (1992). Effects of ionizing radiation on a plant genome: analysis of two *Arabidopsis transparent testa* mutations. *Plant Cell* **4**, 333-347.
- Shizuya, H., Birren, B., Kim, U.J., Mancino, V., Slepak, T., Tachiiri, Y., y Simon, M. (1992). Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **15**, 8794-8797.
- Shuai, B., Reynaga-Pena, C.G., y Springer, P.S. (2002). The *lateral organ boundaries* gene defines a novel, plant-specific gene family. *Plant Physiol.* **129**, 747-761.
- Sieburth, L.E. (1999). Auxin is required for leaf vein pattern in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **121**, 1179-1190.
- Siegfried, E., Perkins, L.A., Capaci, T.M., y Perrimon, N. (1990). Putative protein kinase product of the *Drosophila* segment-polarity gene *zeste-white3*. *Nature* **345**, 825-829.
- Siegfried, K.R., Eshed, Y., Baum, S.F., Otsuga, D., Drews, G.N., y Bowman, J.L. (1999). Members of the *YABBY* gene family specify abaxial cell fate in *Arabidopsis*. *Development* **126**, 4117-4128.
- Simpson, G.G., Gendall, A.R., y Dean, C. (1999). When to switch to flowering. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **15**, 519-550.

- Simpson, G.G., y Dean, C. (2002). *Arabidopsis*, the Rosetta stone of flowering time? *Science* **296**, 285-289.
- Sinha, N. (1997). Simple and compound leaves: reduction or multiplication? *Trends Plant Sci.* **2**, 396-402.
- Sinha, N. (1998). Organ and cell fusions in the *adherent1* mutant in maize. *Int. J. Plant Sci.* **159**, 702-715.
- Sinha, N. (1999). Leaf development in angiosperms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 419-446.
- Sinha, N., Hake, S., y Freeling, M. (1993a). Genetic and molecular analysis of leaf development. *Curr. Top. Dev. Biol.* **28**, 47-80.
- Sinha, N.R., Williams, R.E., y Hake, S. (1993b). Overexpression of the maize homeobox gene, *KNOTTED-1*, causes a switch from determinate to indeterminate cell fates. *Genes Dev* **7**, 787-795.
- Smalley, M.J., y Dale, T.C. (1999). Wnt signalling in mammalian development and cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **18**, 215-230.
- Smeets, H.J.M., Brunner, H.G., Poppers H.H., y Wieringa, B. (1989). Use of variable simple sequence motifs as genetic markers: application to study of myotonic dystrophy. *Hum. Genet.* **83**, 245-251.
- Smith, L.G., Gerttula, S.M., Han, S., y Levy, J. (2001). Tangled1: a microtubule binding protein required for the spatial control of cytokinesis in maize. *J. Cell Biol.* **152**, 231-236.
- 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., 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.
- Smith, L.G., y Hake, S. (1992). The initiation and determination of leaves. *Plant Cell* **4**, 1017-1027.
- Smyth, D.R. (1990). *Arabidopsis thaliana*: A model plant for studying the molecular basis of morphogenesis. *Aust. J. Plant Physiol.* **17**, 323-331.
- Somerville, C., y Koornneef, M. (2002). A fortunate choice: the history of *Arabidopsis* as a model plant. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 883-889.
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.
- St Johnston, D. (2002). The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 176-188.
- Steeves, T.A., y Sussex, I.M. (1989). *Patterns in plant development*. Cambridge University Press.
- Stewart, R.N. (1978). Ontogeny of the primary body in chimeral forms of higher plants. *The clonal basis of development*, pp. 131-160. Sussex, I.M. y Subtelny, S. (eds.). Academic Press.
- 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*. Omega.
- Suggs, S.V., Wallace, R.B., Hirose, T., Kawashima, E.H., y Itakura, K. (1981). Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: isolation of cloned cDNA sequences for human beta 2-microglobulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 6613-6617.
- Sussex, I.M. (1954). Experiments on the cause of dorsiventrality in leaves. *Nature* **174**, 351-352.
- 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**, 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.
- Taguchi-Shiobara, F., Yuan, Z., Hake, S., y Jackson, D. (2001). The *fasciated ear2* gene encodes a leucine-rich repeat receptor-like protein that regulates shoot meristem proliferation in maize. *Genes Dev.* **15**, 2755-2766.
- Takada, S., Hibara, K., Ishida, T., y Tasaka, M. (2001). The *CUP-SHAPED COTYLEDON1* gene of *Arabidopsis* regulates shoot apical meristem formation. *Development* **128**, 1127-1135.
- 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.
- Talon, M., Koornneef, M., y Zeevaart J.A. (1990). Endogenous gibberellins in *Arabidopsis thaliana* and possible steps blocked in the biosynthetic pathways of the semidwarf *ga4* and *ga5* mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 7983-7987.
- Tanaka, H., Onouchi, H., Kondo, M., Hara-Nishimura, I., Nishimura, M., Machida, C., y Machida, Y. (2001). A subtilisin-like serine protease is required for epidermal surface formation in *Arabidopsis* embryos and juvenile plants. *Development* **128**, 4681-4689.
- Tatusova, T.A., y Madden, T.L. (1999). BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* **174**, 247-250.
- Tautz, D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* **17**, 6463-6471.
- Taylor, C.B. (1997). Plant vegetative development: from seed and embryo to shoot and root. *Plant Cell* **9**, 981-988.
- Taylor, S., Hofer, J., y Murfet, I.I. (2001). *Stamina pistilloida*, the Pea Ortholog of *Fim* and *UFO*, Is Required for Normal Development of Flowers, Inflorescences, and Leaves. *Plant Cell* **13**, 31-46.
- 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.
- Telfer, A., y Poethig, R.S. (1994). Leaf development in *Arabidopsis*. En *Arabidopsis*, pp. 379-400. Meyerowitz, E.M., y Somerville, C.R. (eds.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Telfer, A., y Poethig, R.S. (1998). *HASTY*: a gene that regulates the timing of shoot maturation in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **125**, 1889-1898.
- Terol, J., BARGUES, M., Carrasco, P., Pérez-Alonso, M., y Paricio, N. (2002). Molecular characterization and evolution of the protein phosphatase 2A B' regulatory subunit family in plants. *Plant Physiol.* **129**, 808-822.
- Terol, J., Castillo, M.C., BARGUES, M., Pérez-Alonso, M., de Frutos, R. (2001). Structural and evolutionary analysis of the copia-like elements in the *Arabidopsis thaliana* genome. *Mol. Biol. Evol.* **18**, 882-892.
- The *Arabidopsis* Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815.
- The *C. elegans* Sequencing Consortium (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating Biology. *Science* **282**, 2012-2018.
- Thitamadee, S., Tuchihara, K., y Hashimoto, T. (2002). Microtubule basis for left-handed helical growth in *Arabidopsis*. *Nature* **417**, 193-196.

- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., y Higgins, D.G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4876-4882.
- Tian, Q., Uhlir, N.J., y Reed, J.W. (2002). *Arabidopsis* SHY2/IAA3 inhibits auxin-regulated gene expression. *Plant Cell* **14**, 301-319.
- Tian, Q., y Reed, J.W. (1999). Control of auxin-regulated root development by the *Arabidopsis thaliana* SHY2/IAA3 gene. *Development* **126**, 711-721.
- Tichtinsky, G., Tavares, R., Takvorian, A., Schwebel-Dugue, N., Twell, D., y Kreis, M. (1998). An evolutionary conserved group of plant GSK-3/shaggy-like protein kinase genes preferentially expressed in developing pollen. *Biochem. Biophys. Acta* **1442**, 261-273.
- Tilney-Basset, R.A.E. (1986). *Plant chimeras*. Edward Arnold.
- Timmermans, M.C., Hudson, A., Becraft, P.W., y Nelson, T. (1999). *ROUGH SHEATH2*: a Myb protein that represses *knox* homeobox genes in maize lateral organ primordia. *Science* **284**, 151-153.
- Timmermans, M.C., Schultes, N.P., Jankovsky, J.P., y Nelson, T. (1998). *Leafbladeless1* is required for dorsoventrality of lateral organs in maize. *Development* **125**, 2813-2823.
- Timpte, C.S., Wilson, A.K., y Estelle, M. (1992). Effects of the *axr2* mutation of *Arabidopsis* on cell shape in hypocotyl and inflorescence. *Planta* **188**, 271-278.
- Todd, J.A. (1992). La carte des microsatellites est arrivé! *Hum. Mol. Genet.* **1**, 663-666.
- Tornero, P., Conejero, V., y Vera, P. (1996). Phloem-specific expression of a plant homeobox gene during secondary phases of vascular development. *Plant J.* **9**, 639-648.
- Traas, J., Bellini, C., Nacry, P., Kronenberg, J., Bouchez, D., y Caboche, M. (1995). Normal differentiation patterns in plants lacking microtubular preprophase bands. *Nature* **375**, 676-677.
- Traas, J., y Doonan, J.H. (2001). Cellular basis of shoot apical meristem development. *Int. Rev. Cytol.* **208**, 161-206.
- Trotochaud, A.E., Hao, T., Wu, G., Yang, Z., y Clark, S.E. (1999). The CLAVATA1 receptor-like kinase requires CLAVATA3 for its assembly into a signaling complex that includes KAPP and a Rho-related protein. *Plant Cell* **11**, 393-406.
- Trotochaud, A.E., Jeong, S., y Clark, S.E. (2000). CLAVATA3, a multimeric ligand for the CLAVATA1 receptor-kinase. *Science* **289**, 613-617.
- Tsay, Y.F., Frank, M.J., Page, T., Dean, C., y Crawford, N.M. (1993). Identification of a mobile endogenous transposon in *Arabidopsis thaliana*. *Science* **260**, 342-344.
- Tsiantis, M., Brown, M.I., Skibinski, G., y Langdale J.A. (1999b). Disruption of auxin transport is associated with aberrant leaf development in maize *Plant Physiol.* **121**, 1163-1168.
- Tsiantis, M., Schneeberger, R., Golz, J.F., Freeling, M., y Langdale, J.A. (1999a). The maize *rough sheath2* gene and leaf development programs in monocot and dicot plants. *Science* **284**, 154-156.
- Tsiantis, M., y Hay, A. (2003). Comparative plant development: the time of the leaf? *Nat. Rev. Genet.* **4**, 169-180.
- Tsiantis, M., y Langdale, J. (1998). The formation of leaves. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 43-48.
- 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., 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.
- Tsukaya, H. (1995). Developmental genetics of leaf morphogenesis in dicotyledonous plants. *J. Plant Res.* **108**, 407-416.

- Tsukaya, H. (2002). Leaf development. En *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists.
- Tsukaya, H. (2003). Organ shape and size: a lesson from studies of leaf morphogenesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**, 57-62.
- Tsukaya, H., Kozuka, T., y Kim, G.T. (2002). Genetic control of petiole length in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **43**, 1221-1228.
- 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., Shoda, K., Kim, G.T., y Uchimiya, H. (2000). Heteroblasty in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* **210**, 536-542.
- Ueda, K., Okamura, N., Hirai, M., Tanigawara, Y., Saeki, T., Kioka, N., Komano, T. and Hori, R. (1992). Human P-glycoprotein transports cortisol, aldosterone, and dexamethasone, but not progesterone. *J. Biol. Chem.* **267**, 24248-24252.
- Unsold, M., Marienfeld, J.R., Brandt, P., y Brennicke, A. (1997). The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. *Nat. Genet.* **15**, 57-61.
- 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 der Graaff, E., Dulk-Ras, A.D., Hooykaas, P.J., y Keller, B. (2000). Activation tagging of the *LEAFY PETIOLE* gene affects leaf petiole development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **127**, 4971-4980.
- Van Lijsebettens, M., y Clarke, J. (1998). Leaf development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol. Biochem.*, **36**, 47-60.
- Vega, S.H., Sauer, M., Orkwiszewski, J.A., y Poethig, R.S. (2002). The *early phase change* gene in maize. *Plant Cell* **14**, 133-147.
- Venglat, S.P., Dumonceaux, T., Rozwadowski, K., Parnell, L., Babic, V., Keller, W., Martienssen, R., Selvaraj, G., y Datla, R. (2002). The homeobox gene *BREVIPEDICELLUS* is a key regulator of inflorescence architecture in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 4730-4735.
- Venter, J.C., et al. (2001). The Sequence of the Human Genome. *Science* **291**, 1304-1351.
- Vittorioso, P., Cowling, R., Faure, J.D., Caboche, M., y Bellini, C. (1998). Mutation in the *Arabidopsis PASTICCINO1* gene, which encodes a new FK506-binding protein-like protein, has a dramatic effect on plant development. *Mol. Cell Biol.* **18**, 3034-3043.
- 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.
- Vucich, V.A., y Gasser, C.S. (1996). Novel structure of a high molecular weight FK506 binding protein from *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* **252**, 510-517.
- Waites, R., Selvadurai, H.R., Oliver, I.R., y Hudson, A. (1998). The *PHANTASTICA* gene encodes a MYB transcription factor involved in growth and dorsoventrality of lateral organs in *Antirrhinum*. *Cell* **93**, 779-789.
- Waites, R., y Hudson, A. (1995). *PHANTASTICA*: a gene required for dorsoventrality of leaves in *Antirrhinum majus*. *Development* **121**, 2143-2154.
- Walbot, V. (2000). A green chapter in the book of life. *Nature* **408**, 794-795.
- Walker, L., y Estelle, M. (1998). Molecular mechanisms of auxin action. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 434-439.
- Walsh, J., Waters, C.A., y Freeling, M. (1998). The maize gene *liguleless2* encodes a basic leucine zipper protein involved in the establishment of the leaf blade-sheath boundary. *Genes Dev.* **15**, 208-218.

- Wang, H., Zhou, Y., Gilmer, S., Whitwill, S., y Fowke, L.C. (2000). Expression of the plant cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1 affects cell division, plant growth and morphology. *Plant J.* **24**, 613-623.
- Wang, Z. Y., Nakano, T., Gendron, J., He, J., Chen, M., Vafeados, D., Yang, Y., Fujioka, S., Yoshida, S., Asami, T., y Chory, J. (2002). Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis. *Dev. Cell* **2**, 505-513.
- Wang, Z. Y., Seto, H., Fujioka, S., Yoshida, S., y Chory, J. (2001). BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids. *Nature* **410**, 380-383.
- Weber, J.L., y May, P.E. (1989). Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.* **44**, 388-396.
- 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.
- Wellesen, K., Durst, F., Pinot, F., Benveniste, I., Nettesheim, K., Wisman, E., Steiner-Lange, S., Saedler, H., y Yephremov, A. (2001). Functional analysis of the *LACERATA* gene of *Arabidopsis* provides evidence for different roles of fatty acid omega-hydroxylation in development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 9694-9699.
- Weng, G., Bhalla, U.S., y Iyengar, R. (1999). Complexity in biological signaling systems. *Science* **284**, 92-96.
- Weston, C.R., y Davis, R.J. (2001). Signal transduction: signaling specificity- a complex affair. *Science* **292**, 2439-2440.
- Whittington, A.T., Vugrek, O., Wei, K.J., Hasenbein, N.G., Sugimoto, K., Rashbrooke, M.C., y Wasteneys, G.O. (2001). *MORI* is essential for organizing cortical microtubules in plants. *Nature* **411**, 610-613.
- Wigge, P.A., y Weigel, D. (2001). *Arabidopsis* genome: life without notch. *Curr. Biol.* **11**, R112-R114.
- Wilkins, A.S. (1993). *Genetic analysis of animal development. 2nd edition*. John Wiley and Sons.
- Williams, F. E., y Trumbly, R. J. (1990). Characterization of TUP1, a mediator of glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 6500-6511.
- 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.
- Wodarz, A., y Nusse, R. (1998). Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**, 59-88.
- Wolpert, L., Beddington, R., Brockes, J., Jessell, T., Lawrence, P., y Meyerowitz, E. (1998). *Principles of Development*. Oxford University Press.
- Woodgett, J.R. (1990). Molecular cloning and expression of *glycogen synthase kinase-3/factor A*. *EMBO J.* **9**, 2431-2438.
- Wyman, A. R., y White, R. (1980). A highly polymorphic locus in human DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 6754-6758.
- Xu, W., Purugganan, M.M., Polisensky, D.H., Antosiewicz, D.M., Fry, S.C., y Braam, J. (1995b). *Arabidopsis TCH4*, regulated by hormones and the environment, encodes a xyloglucan endotransglycosylase. *Plant Cell* **7**, 1555-1567.
- Xu, Y.L., Li, L., Wu, K., Peeters, A.J., Gage, D.A., y Zeevaart, J.A. (1995a). The *GAS* locus of *Arabidopsis thaliana* encodes a multifunctional gibberellin 20-oxidase: molecular cloning and functional expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 6640-6644.
- Yamamuro, C., Ihara, Y., Wu, X., Noguchi, T., Fujioka, S., Takatsuto, S., Ashikari, M., Kitano, H., y Matsuoka, M. (2000). Loss of function of a rice *brassinosteroid insensitive1* homolog prevents internode elongation and bending of the lamina joint. *Plant Cell* **12**, 1591-1606.
- Yang, M., y Sack, F.D. (1995). The *too many mouths* and *four lips* mutations affect stomatal production in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **7**, 2227-2239.

- Yang, S.H., Yamaguchi, Y., Koizumi, N., Kusano, T., y Sano, H. (2002). Promoter analysis of *tbzF*, a gene encoding a bZIP-type transcription factor, reveals distinct variation in cis-regions responsible for transcriptional activation between senescing leaves and flower buds in tobacco plants. *Plant Science* **162**, 973-980.
- Ye, G.N., Stone, D., Pang, S.Z., Creely, W., Gonzalez, K., y Hinchee, M. (1999). *Arabidopsis* ovule is the target for *Agrobacterium* in planta vacuum infiltration transformation. *Plant J.* **19**, 249-257.
- Yephremov, A., Wisman, E., Huijser, P., Huijser, C., Wellesen, K., y Saedler, H. (1999). Characterization of the *FIDDLEHEAD* Gene of *Arabidopsis* Reveals a Link between Adhesion Response and Cell Differentiation in the Epidermis. *Plant Cell* **11**, 2187-2202.
- Yin, Y., Wang, Z.Y., Mora-Garcia, S., Li, J., Yoshida, S., Asami, T., y Chory, J. (2002). BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. *Cell* **109**, 181-191.
- Yu, J., *et al.* (2002). A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science*. **296**, 79-92.
- Yu, L.P., Miller, A.K., y Clark, S.E. (2003). *POLTERGEIST* encodes a protein phosphatase 2C that regulates *CLAVATA* pathways controlling stem cell identity at *Arabidopsis* shoot and flower meristems. *Curr. Biol.* **13**, 179-188.
- Yu, L.P., Simon, E.J., Trotochaud, A.E., y Clark, S.E. (2000). *POLTERGEIST* functions to regulate meristem development downstream of the *CLAVATA* loci. *Development* **127**, 1661-1670.
- Zambryski, P., Joos, H., Genetello, C., Leemansm, J., Montagu, V., y Scheel, J. (1983). Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* **2**, 2143-2150.
- Zhao, L., y Sack, F.D. (1999). Ultrastructure of stomatal development in *Arabidopsis* (Brassicaceae) leaves. *Am. J. Bot.* **86**, 929-939.
- Zheng, Z.L., y Yang, Z. (2000). The Rop GTPase: an emerging signaling switch in plants. *Plant Mol. Biol.* **44**, 1-9.
- Zhong, R., y Ye, Z.H. (1999). *IFL1*, a gene regulating interfascicular fiber differentiation in *Arabidopsis*, encodes a homeodomain-leucine zipper protein. *Plant Cell* **11**, 2139-2152.

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta tesis ha sido posible gracias a la financiación por el MEC y el MCYT (Proyectos PB95-0685, PB98-1389 y BMC2002-02840) y por la Generalitat Valenciana (Ayudas para Infraestructura en 2000, 2001 y 2002). Durante la realización de la misma, he disfrutado de una beca predoctoral de Formación de Personal Investigador de la Generalitat Valenciana, con cuya exigua dotación económica he logrado subsistir durante tres años y medio (1998-2001).

A mis directores, José Luis Micol y María Rosa Ponce, por haberme permitido iniciar mi carrera investigadora en su laboratorio y bajo su atenta dirección.

A María Rosa Ponce, por su paciente dedicación al enseñarme los entresijos de la Genética Molecular. Sin su ayuda, muy probablemente, los resultados de esta Tesis no hubieran sido tan satisfactorios.

A José Luis Micol por la gran paciencia que sigue teniendo en nuestras discusiones de ciencia, por su guía y por su espíritu crítico, que me han hecho ver que la buena investigación requiere de una atenta dedicación.

A María Rosa Ponce, Genoveva Berná, Pepe Serrano, Víctor Quesada, Pedro Robles y Héctor Candela, de cuyas Tesis se han tomado algunos apartados de Materiales y Métodos y ciertas otras cosas.

A José Manuel Serrano y Susana Gerber, nuestros técnicos de laboratorio, por su enorme predisposición ante mis continuas peticiones de material y ayuda.

A los veteranos Héctor Candela, Víctor Quesada y Pedro Robles, por hacerme participe de sus vastos conocimientos genéticos, y porque me guiaron durante mis primeros pasos en este laboratorio.

A Héctor Candela, Víctor Quesada, Pedro Robles, Pedro Piqueras, José Manuel Serrano, Santiago García, José María Barrero y Sara Jover, por vuestra amistad, porque habéis ayudado a que los largos días en el laboratorio se hiciesen más amenos.

A Antonio Martínez y Antonio Vera, por su inestimable ayuda en algunas cuestiones científicas y sus agradables tertulias cuando residíamos en el mismo Campus.

A Asunción Brotons, María Alonso, Paqui Lozano y Rebeca González, nuestra nueva generación, porque con su visión de las cosas me han hecho revivir mis tiempos mozos en el laboratorio.

A mis padres, mis tíos y el resto de mi familia por sus consejos en los momentos difíciles que ha habido, ya que, a pesar de todo, la aventura ha valido la pena.

A mis otros compañeros de viaje (Luismi, Sebas, Victor, José Miguel, Antonio, Alberto...), con los que además de la amistad, hemos compartido manías, noches de insomnio y algunas cervezas.

A Cristina González Poveda, por haber estado a mi lado en toda esta aventura, por su apoyo y su comprensión por todas esas horas que nos ha robado esta empresa.



