



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGRARIA

Tesis Doctoral

Control genético del tamaño floral en *Antirrhinum majus*

Memoria presentada para optar por el Título de Doctor

Presentada por

Luciana Delgado Benarroch

Lic. en Biotecnología

Directores

Julia Rosl Weiss

Marcos Egea Gutiérrez-Cortines

El libro de arena

(Extracto del Libro de Arena de Jorge Luis Borges (1977))

Abrió la valija y lo dejó sobre la mesa. Su inusitado peso me sorprendió. Lo abrí al azar. Me llamó la atención que la página par llevara el número (digamos) 40.514 y la impar, la siguiente, 999....llevaba una pequeña ilustración.....

Mírela bien. Ya no la verá nunca más.

Me pidió que buscara la primera página. Todo fue inútil: siempre se interponían varias hojas.

No puede ser, pero es. El número de páginas de este libro es exactamente infinito.

Ninguna es la primera; ninguna la última.

No mostré a nadie mi tesoro. Prisionero del Libro, casi no me asomaba a la calle.

.....comprendí que el libro era monstruoso. Sentí que era un objeto de pesadilla....

Recordé haber leído que el mejor lugar para ocultar una hoja es un bosque.

Aproveché un descuido para perder el Libro de Arena en uno de los húmedos anaqueles. Traté de no fijarme a qué altura ni a qué distancia de la puerta.

Siento un poco de alivio.....

A Leandro, por este largo viaje.....

AGRADECIMIENTOS

A mis directores Julia Weiss y Marcos Egea. ambos han depositado plena confianza en mi lo que me ha permitido desarrollar el trabajo sin trabas y con completa libertad. Considero que Marcos ha sido el motor creativo y ha aportado su gran capacidad de integrar información al desarrollo y realización de nuevos experimentos. Su optimismo ha resultado alentador en muchos casos en que las cosas no marcharon como se deseaba. En todo momento ha sabido considerar mis planteos y agradezco su capacidad de mantener discusiones de igual a igual. En especial, considero que los esfuerzos realizados a lo largo de este trabajo fueron compartidos a diario y discutidos al extremo con Julia, con quien creo hemos conseguido comprendernos. Ha sido un apoyo indispensable para alcanzar este punto en el que me encuentro. Su enorme capacidad de trabajo me ha servido de ejemplo y motivación diario. Me gustaría manifestar que ambos han actuado mas allá de su papel académico y supieron comprender y atender circunstancias personales.

A todos los que pasaron horas en nuestro laboratorio y me acompañaron cada día: May, Perla, Almudena, María, Marta, Amalia, Nacho. A las últimas en incorporarse que tuvieron la peor parte sufriendo las correcciones: Juana María e Izaskun. En especial a Agnieszka Pietras y Angélique Renard por su colaboración en los experimentos en la sección V y a Almudena Bayo con quien realizamos los trabajos de hacinamiento. A Raquel Conesa, que me introdujo en el citómetro y a la gente del SAIT, principalmente a Alberto Alcolea que me sumergió en la microscopía electrónica.

A Leandro que siempre y de forma incondicional me contuvo, escuchó y por sobre todo me demostró su amor durante todos estos años de trabajo. Su optimismo y respeto para con mi trabajo han sido los cimientos fundamentales en este emprendimiento. A Felipe, que se sumó a nosotros en el último período y permite que día a día me abstraiga de mis obligaciones para meterme en su mundo de personajes infinitos. A mi abuela, que con todos sus años, no decae en su soledad y me dejó alas para llegar hasta aquí y crecer profesional y personalmente. A mis padres, porque supieron motivarme en la difícil y seductora búsqueda de respuestas y me inculcaron que crecer es inherente a aprender y viceversa. A toda mi familia, que está tan lejos y sabe comprender sin exigir razones.

A mis amigos, que están dispersos por el mundo, alcanzando objetivos y viviendo vidas que aunque inconexas parecen ser paralelas. Por que los quiero mucho y siempre están dispuestos a escucharme estén donde estén.

A España, que me abrió las puertas y me dejó encantarme con su arquitectura, sus muros de piedra y sus innumerables paisajes y culturas.

Resumen:

El objetivo principal del presente trabajo de tesis es entender los mecanismos genéticos del tamaño floral en *Antirrhinum majus*. Para ello se ha llevado a cabo un estudio genético de mutantes de *A. majus* que afectan al tamaño floral. En primer lugar se evaluó la estabilidad de los parámetros en estudio frente a condiciones de hacinamiento y reducción artificial del área foliar en plantas silvestre (165E). Estos resultados demostraron que los órganos laterales del cuerpo tienden a reducir la masa total frente al hacinamiento. Las hojas disminuyen de forma preferencial en tamaño, manteniendo el número. De forma opuesta, se reduce la producción de flores mientras el tamaño floral permanece prácticamente imperturbable. Estos resultados indican que el tamaño floral es un carácter estable frente a las condiciones de hacinamiento y a la reducción del área foliar.

Se seleccionaron mutantes de *A. majus* en genes que afectan el tamaño y las proporciones florales: *COMPACTA* (*CO*), *GRANDIFLORA* (*GRAF*) Y *FORMOSA* (*FO*). En primer lugar se realizaron análisis de segregación en poblaciones F_2 y se observó que los mutantes *co* y *fo* son alelos recesivos mientras el mutante *Graf* es un alelo dominante. El mutante *co* presenta reducción en el tamaño de todos los órganos de las plantas incluyendo hojas y flores. Afecta de forma específica los sépalos, pétalos y gineceos reduciendo su tamaño y provocando variaciones en la expansión y/o la división celular dependiendo de los diferentes órganos o verticilos de la flor. *Graf*, que presente un efecto prácticamente exclusivo en el tamaño de la flor, parece provocar cambios opuestos a *co* incrementando el tamaño de todos los órganos florales. Provoca un aumento en la expansión celular de la superficie de los pétalos y en la división en los órganos sexuales. El análisis de los dobles mutantes *Graf co* sugiere una posible participación de ambos genes en una misma ruta de control del tamaño de los pétalos. Los dobles mutantes entre *co* y un gen de identidad de clase B (que también reduce el tamaño de los órganos florales) muestran sinergismo entre ambos genes en cuanto al tamaño y la identidad del pétalo. Estos resultados sugieren que ambos genes participan en rutas paralelas en el control del tamaño e identidad de los órganos del segundo verticilo.

El mutante *fo*, afecta exclusivamente el tamaño de la flor con órganos florales más grandes en los tres verticilos externos. Produce un incremento en el número de células en todos los órganos provocando un aumento de los niveles de expresión de *AmAINTEGUMENTA* en los meristemos florales así como un aumento de la expresión de genes relacionados con la actividad del ciclo celular en pétalos. También reduce la expansión celular de pétalos y gineceos causando una mayor expresión del gen *AmBigPetal*. El análisis de los dobles mutantes con un gen de identidad de clase C muestra que la acción diferencial de *fo* en cuanto al aumento en el tamaño de los órganos no parece ser específica de la identidad de los órganos. En el doble mutante también se observa sinergismo en cuanto al aumento del tamaño producido por *fo* lo que sugiere una posible participación de ambos genes en control del tamaño de los pétalos por vías redundantes. La presencia de mutantes pleiotrópicos afectando el tamaño de todos los órganos laterales de las plantas y de genes con efectos específicos en el tamaño floral indican que existen al menos dos grupos de genes que controlan el tamaño floral, uno que controla tanto el crecimiento vegetativo como reproductivo y otro específico de la flor.

Summary

The main objective of this thesis is to uncover the genetic control of floral size in *Antirrhinum majus*. We have done a characterization of *A. majus* mutants. First step was the evaluation of the stability of floral size against crowding conditions and artificial foliar reduction, in wild type 165E plants. These results demonstrated that plant lateral organs tend to reduce total mass upon crowding. Leaf number proved a stable character, while leaf size decreased. In contrary, flower number was reduced while floral size was stable. Results indicate that floral size is a stable character both under crowding and foliar reduction.

The following genes of *A. majus* whose mutants affect floral size and proportions were selected: *COMPACTS (CO)*, *GRANDIFLORA (GRAF)* Y *FORMOSA (FO)*. A segregation analysis in F₂ populations revealed that *co* and *fo* mutants are recessive alleles while *Graf* mutant is a dominant allele. The mutant *co* shows a reduction in the size of all plant lateral organs including flowers and leaves. In the flowers we observed a size reduction of sepals, petals and carpels either due to changes in cell expansion and/or cell division, depending on the floral organ identity or the floral whorl. *Graf*, which almost exclusive effect flower size, shows a phenotype opposite to *co* with an increase in size of all floral organs. Changes are due to an increment on cell expansion in petals and cell division in sexual organs. Analysis of the double mutant, *Graf co*, suggests that both genes act in the same route controlling petal size. Double mutants between *co* and a class B floral identity gene (which also reduces floral organ size) show a synergistic effect between both genes concerning organ size and petal identity. This suggests that the two genes could participate in organ size control and petal identity in parallel routes.

The mutant *fo* affect exclusively flowers showing bigger floral organs in the three outer whorls. Increases cell number in all floral organs. Expression level of *AINTEGUMENTA* is elevated in floral meristems and those of cell cycle related genes in mutant petals. Cell expansion is reduced in petals and carpels and this coincides with an up regulation of *BigPetal* gene. Double mutant analysis between *fo* and a class C flower identity gene indicates that *fo* effect is not specific of organ identity. The *fo* double mutant also shows synergism with the class C identity gene suggesting a putative participation of both genes in redundant routes in the control of petal size. The presences of pleiotropic mutants affecting all plant lateral organs, and genes that disturb only flower size indicate the presence of at least two gene groups, one controlling vegetative and reproductive growth and another flower specific one.

ÍNDICE

| | | |
|-----------|--|-----------|
| I | INTRODUCCIÓN GENERAL | 3 |
| 1 | ANTIRRHINUM COMO PLANTA MODELO | 3 |
| 2 | VARIABILIDAD FENOTÍPICA FRENTE A CAMBIOS DEL ENTORNO | 6 |
| 3 | DESARROLLO VEGETATIVO | 7 |
| 3.1 | MANTENIMIENTO DEL MERISTEMO APICAL | 7 |
| 3.2 | ORGANIZACIÓN DE LOS MERISTEMOS APICALES | 8 |
| 3.3 | GENES DE MANTENIMIENTO MERISTEMÁTICO | 9 |
| 4 | FORMACIÓN DE NUEVOS ÓRGANOS | 13 |
| 4.1 | DEFINICIÓN DE LOS LÍMITES ENTRE MERISTEMOS Y ÓRGANOS | 14 |
| 4.2 | DETERMINACIÓN DE POLARIDAD DE ÓRGANOS | 16 |
| 4.2.1 | Crecimiento polar y tamaño de los órganos florales | 18 |
| 4.3 | DETERMINACIÓN DE LA IDENTIDAD DE LOS ÓRGANOS FLORALES | 19 |
| 4.3.1 | Modelo ABCDE | 20 |
| i. | Genes de clase A | 21 |
| ii. | Genes de clase B | 22 |
| iii. | Genes de clase C | 22 |
| iv. | Genes de clase E | 23 |
| v. | Genes de clase D | 24 |
| 4.3.2 | Regulación de los genes de identidad | 25 |
| 4.3.3 | Genes homeóticos y tamaño floral | 28 |
| 5 | DIVISIÓN CELULAR, EXPANSIÓN CELULAR Y CRECIMIENTO DE LOS ÓRGANOS | 29 |
| 5.1 | DIVISIÓN CELULAR | 29 |
| 5.2 | EXPANSIÓN CELULAR | 34 |
| 5.2.1 | Endoreduplicación | 35 |
| 5.2.2 | Relación de la expansión celular con el control del tamaño de los órganos florales | 38 |
| 5.3 | MECANISMOS DE COMPENSACIÓN | 39 |
| II | MATERIALES Y MÉTODOS | 47 |
| 1 | MATERIAL VEGETAL | 47 |
| 2 | CONDICIONES DE CRECIMIENTO | 47 |

| | | |
|---|---|-----------|
| 3 | ENSAYOS DE HACINAMIENTO | 47 |
| 4 | ANÁLISIS ESTADÍSTICO..... | 49 |
| 5 | ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS..... | 49 |
| 5.1 | GELES DE AGAROSA PARA ADN | 49 |
| 5.2 | GELES DE AGAROSA PARA ARN | 50 |
| 6 | MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO | 50 |
| 7 | EXTRACCIÓN DE ARN | 51 |
| 8 | PREPARACIÓN DE PRIMERA HEBRA DE ADN | 51 |
| 9 | REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)..... | 51 |
| 9.1 | PCR | 51 |
| 9.2 | PCR EN TIEMPO REAL (RT-PCR)..... | 52 |
| 10 | ANÁLISIS FILOGENÉTICO..... | 53 |
| 11 | CITOMETRÍA DE FLUJO | 54 |
| 11.1 | MATERIAL VEGETAL | 54 |
| 11.2 | AISLAMIENTO Y TINCIÓN DE NÚCLEOS..... | 54 |
| 11.3 | CALIBRACIÓN DEL CITÓMETRO..... | 55 |
| 12 | PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN A PARTIR DE GEL | 55 |
| 13 | SECUENCIACIÓN | 55 |
| 14 | TRATAMIENTO CON CITOCALISINA D | 56 |
| III ESTABILIDAD DE LOS PARÁMETROS FLORALES | | |
| FRENTE A CONDICIONES DE HACINAMIENTO | | |
| 59 | | |
| 1 | RESUMEN | 60 |
| 2 | INTRODUCCIÓN..... | 61 |
| 2.1 | PLASTICIDAD FENOTÍPICA EN PRESENCIA DE MODIFICACIONES DEL ENTORNO | 61 |
| 2.2 | INTEGRACIÓN MODULAR..... | 62 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 3 | RESULTADOS | 63 |
| 3.1 | DESCRIPCIÓN DE PARÁMETROS VEGETATIVOS BAJO CONDICIONES DE HACINAMIENTO..... | 63 |
| 3.2 | DESCRIPCIÓN DE PARÁMETROS FLORALES BAJO CONDICIONES DE HACINAMIENTO..... | 66 |
| 3.3 | ANÁLISIS DE CORRELACIÓN ENTRE PARÁMETROS REPRODUCTIVOS Y VEGETATIVOS..... | 67 |
| 3.4 | REDUCCIÓN DEL ÁREA FOLIAR | 68 |
| 4 | DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES | 71 |
| 4.1 | RESPUESTA ESPECÍFICA DEL ESTADIO DE DESARROLLO | 71 |
| 4.2 | INTEGRACIÓN MODULAR | 73 |
| | | |
| IV | CARACTERIZACIÓN CELULAR DEL PÉTALO DE A. MAJUS | 75 |
| | | |
| 1 | DESARROLLO DEL MAPA CELULAR | 75 |
| 2 | DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE PLOIDÍA | 78 |
| | | |
| V | INFLUENCIA DE COMPACTA EN EL TAMAÑO FLORAL Y EN LA IDENTIDAD DE ÓRGANO | 81 |
| | | |
| 1 | RESUMEN | 81 |
| 2 | INTRODUCCIÓN | 82 |
| 2.1 | COORDINACIÓN ENTRE EXPANSIÓN Y DIVISIÓN CELULAR | 82 |
| 2.2 | CAMBIOS EN DIVISIÓN Y EXPANSIÓN CELULAR DEPENDIENTES DE LA IDENTIDAD DEL ÓRGANO | 83 |
| 2.3 | MUTANTES EN GENES DE IDENTIDAD DE CLASE B..... | 84 |
| 3 | RESULTADOS | 85 |
| 3.1 | DESCRIPCIÓN FENOTÍPICA Y CELULAR DE LOS MUTANTES SIMPLES <i>GRAF</i> Y <i>CO</i> | 85 |
| 3.1.1 | Caracterización morfológica del mutante <i>co</i> | 85 |
| 3.2 | FUNCIÓN DE <i>CO</i> ANTE EL CAMBIO DE IDENTIDAD DE ÓRGANO | 93 |
| 3.2.1 | Análisis de tamaño de órganos y células | 94 |
| i. | Sépalos | 94 |
| ii. | Segundo verticilo pétalos-sepaloides | 95 |
| iii. | Tercer verticilo-estambres carpeloides..... | 95 |

| | |
|---|------------|
| iv. Gineceo | 97 |
| 3.3 EFECTO FENOTÍPICO Y MOLECULAR DE LA INHIBICIÓN DE LA EXPANSIÓN CELULAR EN PÉTALOS | 100 |
| 3.4 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE IDENTIDAD <i>DEF^{NIC}</i> | 104 |
| 4 DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN | 105 |
| 4.1 ACCIÓN DE <i>GRAF</i> Y <i>CO</i> EN EL TAMAÑO DE LOS ÓRGANOS DE LAS PLANTAS..... | 105 |
| 4.2 ¿ <i>CO</i> ESPECÍFICO DE IDENTIDAD O VERTICILLO?..... | 106 |
| 4.3 <i>CO</i> Y <i>DEF</i> CONTROLAN EL TAMAÑO DE LOS PÉTALOS POR VÍAS PARALELAS..... | 106 |
| 4.4 <i>CO</i> AFECTA LA IDENTIDAD DE LOS PÉTALOS POR UNA VÍA PARALELA A LA DE <i>DEF</i> | 107 |
| VI EL GEN FORMOSA RESTRINGE EL CRECIMIENTO DE LOS ÓRGANOS FLORALES MODIFICANDO LA ACTIVIDAD DE LA DIVISIÓN CELULAR. | 111 |
| 1 RESUMEN | 111 |
| 2 INTRODUCCIÓN..... | 112 |
| 2.1 RELACIÓN ENTRE LA DIVISIÓN CELULAR Y LA DIFERENCIACIÓN | 112 |
| 2.2 TAMAÑO DE LOS ÓRGANOS DE LA FLOR | 113 |
| 2.3 ACTIVIDAD DEL CICLO CELULAR EN <i>A. MAJUS</i> | 114 |
| 3 RESULTADOS..... | 115 |
| 3.1 ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LOS MUTANTES <i>FO</i> | 115 |
| 3.2 ANÁLISIS FENOTÍPICO DEL DOBLE MUTANTE <i>PLE FO</i> | 119 |
| 3.3 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES QUE AFECTAN EL CICLO Y LA EXPANSIÓN CELULAR EN EL MUTANTE <i>FO</i> | 122 |
| 3.3.1 Análisis filogenético de <i>ANT</i> y <i>BPE</i> en <i>A. majus</i> | 122 |
| i. <i>AINTEGUMENTA</i> | 122 |
| ii. <i>BIG PETAL</i> | 124 |
| 4 DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN | 130 |
| 4.1 EL GEN <i>FO</i> RESTRINGE ESPECÍFICAMENTE EL CRECIMIENTO DE LOS ÓRGANOS FLORALES..... | 130 |
| 4.2 EFECTOS DE FORMOSA SOBRE LA EXPANSIÓN Y LA DIVISIÓN CELULAR | 131 |

| | |
|---|------------|
| VII CONCLUSIONES GENERALES | 135 |
| VIII BIBLIOGRAFÍA | 141 |
| IX ANEXO TABLAS..... | 169 |

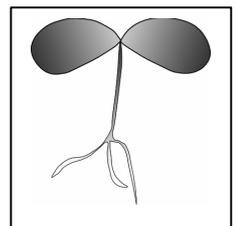
ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|-----|
| Figura 1: Morfología de <i>A. majus</i> . | 5 |
| Figura 2: Estructura del SAM. | 9 |
| Figura 3: Comparación del SAM en los mutantes <i>wus</i> y <i>clv</i> . | 10 |
| Figura 4: Modelo de la acción de AP2 en las células madre del SAM. | 13 |
| Figura 5: Interacción genética que controla la polaridad adaxial-abaxial en <i>Arabidopsis</i> . | 17 |
| Figura 6: Modelo floral ABC de <i>Arabidopsis</i> . | 24 |
| Figura 7: Activación inicial de los genes de identidad floral (Jack 2004) | 26 |
| Figura 8: Opciones de crecimiento celular durante la diferenciación. | 37 |
| Figura 9: Modelo que describe los eventos de algunos de los genes conocidos que afectan el tamaño floral y sus proporciones. | 40 |
| Figura 10: Descripción de los parámetros florales. | 49 |
| Figura 11: Efecto de los tratamientos de hacinamiento sobre los parámetros vegetativos. | 65 |
| Figura 12: Efecto de los dos tratamientos de hacinamiento sobre los parámetros florales. | 67 |
| Figura 13: Efecto de la reducción del área foliar en los parámetros vegetativos. | 70 |
| Figura 14: Efecto de la reducción del área foliar en los parámetros florales. | 71 |
| Figura 15: Micrografías electrónicas del mapa celular del pétalo. | 77 |
| Figura 16: Citometría de flujo de las regiones del mapa celular del pétalo. | 79 |
| Figura 17: Fotografías de los mutantes simples <i>co</i> y <i>Graf</i> . | 86 |
| Figura 18: Micrografías electrónicas de barrido de células de los órganos florales de los mutantes <i>Graf</i> y <i>co</i> comparados con los silvestres. | 89 |
| Figura 19: Citometría de flujo de células de los pétalos del mutante <i>Graf</i> . | 91 |
| Figura 20: Fotografías de los dobles mutantes <i>Graf co</i> . | 92 |
| Figura 21: Fotografías de los dobles mutantes <i>def^{nic} co</i> . | 94 |
| Figura 22: Micrografías electrónicas de células de los órganos de la flor de <i>def^{nic}</i> y <i>def^{nic} co</i> | 96 |
| Figura 23: Efectos del tratamiento de inhibición de la expansión celular. | 101 |
| Figura 24: Niveles de expresión de DEF. | 104 |
| Figura 25: Hipótesis de interacción entre <i>DEF</i> , <i>GRAF</i> y <i>CO</i> . | 109 |
| Figura 26: Sinopsis de las posibles relaciones entre el ciclo celular y la diferenciación. | 113 |
| Figura 27: Flores del mutante <i>fo</i> . | 115 |
| Figura 28: Micrografías electrónicas de células de los órganos de la flor de <i>fo</i> y silvestre. | 117 |
| Figura 29: Morfología de los mutantes <i>ple</i> y <i>ple fo</i> . | 121 |
| Figura 30: Análisis filogenético de <i>AmANT</i> . | 125 |
| Figura 31: Análisis filogenético de <i>AmbPE</i> . | 127 |
| Figura 32: Cuantificación relativa de los niveles de expresión de genes relacionados con la actividad del ciclo y la expansión celular en <i>fo</i> . | 129 |
| Figura 33: Esquema putativo de la acción de <i>FO</i> respecto a expansión y división celular. | 132 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|-----|
| Tabla 1: Genes que afectan el tamaño y la arquitectura floral en dicotiledóneas. | 43 |
| Tabla 2: Información detallada de los cebadores utilizados..... | 53 |
| Tabla 3: Medidas de las dimensiones de las tres primeras hojas de las plantas en condiciones de hacinamiento. | 64 |
| Tabla 4: Análisis de correlación entre el área foliar y el número de flores en condiciones de hacinamiento..... | 68 |
| Tabla 5: Comparación de parámetros vegetativos entre el silvestre y los mutantes <i>co</i> y <i>Graf</i> | 87 |
| Tabla 6: Comparación de parámetros florales entre el silvestre y los mutantes <i>co</i> y <i>Graf</i> | 88 |
| Tabla 7: Comparación de áreas celulares entre el silvestre y los mutantes <i>co</i> y <i>Graf</i> | 90 |
| Tabla 8: Comparación de los parámetros florales entre el silvestre y los mutantes <i>def^{nic}</i> , <i>co</i> y <i>def^{nic}co¹</i> | 98 |
| Tabla 9: Comparación del área celular de estambres y estilos entre el silvestre y los mutantes <i>def^{nic}</i> , <i>co</i> y <i>def^{nic}co¹</i> | 99 |
| Tabla 10: Comparación de los parámetros florales entre las plantas silvestres control y las tratadas con citocalasina D ¹ | 103 |
| Tabla 11: Comparación del área celular del pétalos entre plantas tratadas con citocalasina D y plantas control ¹ | 103 |
| Tabla 12: Medidas de los parámetros vegetativos del mutante <i>fo</i> comparado con silvestre..... | 118 |
| Tabla 13: Medidas de los parámetros florales del mutante <i>fo</i> respecto a silvestre..... | 118 |
| Tabla 14: Medidas del área celular de los órganos florales de los mutantes <i>fo</i> respecto a silvestre..... | 119 |
| Tabla 15: Medidas de parámetros florales y celulares de silvestre, <i>fo</i> , <i>ple</i> y <i>ple fo</i> | 121 |
| Tabla 16: Diferencias Interregionales e intraregionales del área celular en el lóbulo abaxial del pétalo dorsal..... | 169 |
| Tabla 17: Diferencias interregionales e intraregionales del área celular en el lóbulo adaxial del pétalo dorsal..... | 170 |
| Tabla 18: Parámetros vegetativos y número de flores en condiciones de hacinamiento. | 171 |
| Tabla 19: Parámetros florales en condiciones de hacinamiento..... | 172 |
| Tabla 20: Parámetros de las cápsulas..... | 173 |
| Tabla 21: Parámetros vegetativos y número de flores en plantas con reducción del área foliar (<i>raf</i>)..... | 174 |
| Tabla 22: Parámetros florales en plantas con reducción del área foliar (<i>raf</i>)..... | 175 |

INTRODUCCIÓN





I INTRODUCCIÓN GENERAL

El objetivo principal del trabajo de Tesis es aportar información acerca de los genes que controlan el tamaño de los órganos florales utilizando como planta modelo a *Antirrhinum majus*.

A lo largo de este capítulo se describen los aspectos más relevantes relacionados con los temas discutidos durante el trabajo experimental.

En primer lugar una breve introducción histórica que justifica el uso de *A. majus* como planta modelo en este estudio.

Posteriormente se detallan aspectos teóricos relacionados con las variaciones fenotípicas inherentes a las condiciones del entorno. Este aspecto resulta de particular importancia en nuestro trabajo para conocer la estabilidad de los parámetros florales analizados en los estudios posteriores y la variación relativa entre éstos y los parámetros vegetativos de la planta independientemente de variaciones genéticas.

Luego se describen los procesos de desarrollo que abarcan desde el meristemo apical del tallo hasta alcanzar los órganos florales. A través de la comprensión de estos mecanismos se vislumbra una compleja interconexión entre los genes que participan a la vez en las diferentes etapas del desarrollo. Esto permite reflejar en eventos tardíos del desarrollo los cambios producidos en etapas tempranas. En cada estadio del desarrollo se describen además aquellos genes que intervienen en la regulación del tamaño de los órganos florales.

Por último se aborda la regulación de la división y expansión celular y sus efectos sobre el crecimiento de los órganos, y en su caso, el efecto específico sobre los órganos florales. Los estudios revelan una compleja relación entre la división y expansión celular que comunican ambos procesos.

La escasez de información acerca de genes involucrados de forma específica en el tamaño de las flores y las evidencias que avalan su existencia motiva a la búsqueda de mayor información y es el objetivo central de esta Tesis.

1 ANTIRRHINUM COMO PLANTA MODELO

La historia de *A. majus* se remonta hacia mediados del siglo XIX a partir de los primeros estudios de variación y herencia que se extendieron hasta finales del siglo realizados por Mendel, Darwin y Masters, entre otros. Fue a principios del siglo XX cuando varios investigadores y particularmente Erwin Baur redescubrieron los estudios de herencia de Mendel y establecieron a *A. majus* como una especie modelo. Sus estudios permitieron introducir muchos conceptos

básicos como ligamiento genético, herencia citoplasmática, análisis de los efectos ambientales sobre la recombinación, etc. La mayor parte de esta investigación junto con la descripción de 550 mutantes fue compilada por Hans Stubbe (1966), cuya colección se mantiene actualmente en Gatersleben (Schwarz-Sommer, Davies, & Hudson 2003a; Stubbe 1966).

El género de *A. majus*, perteneciente a la familia de las Scrophulariaceae, comprende alrededor de 36 especies conocidas comúnmente como "boca de dragón". La mayoría de ellas se encuentran alrededor de las costas del mar Mediterráneo (21 especies), en gran parte endémicas de la Península Ibérica, y en América del Norte (15 especies). Entre ellas solo *A. majus* ha sido domesticada como planta ornamental (Thompson 1988; Zhang *et al.* 2005).

A. majus así como otros géneros de *Antirrhineae*, son ejemplos clásicos de flores especializadas en polinización por abejas (Thompson 1988). El género *Antirrhinum* comprende especies con diferentes sistemas reproductivos, aunque la mayoría son auto incompatibles, entre las que se encuentra *A. majus*. Sin embargo se han documentado casos de auto-compatibilidad en *A. majus* y *A. latifolium* (Mateu-Andres & De Paco 2005). Esta incompatibilidad está regulada por el locus simple S multialélico encontrado en especies pertenecientes a las familias Solanaceae, Scrophulariaceae y Rosacea. En la mayoría de los casos este locus contiene al menos dos genes polimórficos, uno que se expresa en el polen (gen F-box) y otro en el pistilo (RNAsa S). La discriminación del polen propio se produce por la interacción entre ambos componentes (Lai *et al.* 2002; Xue *et al.* 1996).

La implementación de *A. majus* como planta modelo permitió avanzar en la comprensión de fundamentos sobre el desarrollo genético de las plantas, sobre mecanismos que controlan la forma de células, hojas y flores, la organización y arquitectura de las plantas así como la regulación y biosíntesis de pigmentos y esencias (Whibley & Baxter 2004).

Una particularidad de las flores de *A. majus* que la diferencia de otras plantas modelo como *Arabidopsis* es que son zigomórficas, con asimetría dorsoventral. Esta peculiaridad ha permitido identificar los genes responsables de la asimetría así como analizar la evolución de la asimetría floral (Cubas 2004; Cubas, Coen, & Zapater 2001; Schwarz-Sommer *et al.* 2003a). La arquitectura de la flor está organizada en cuatro verticilos concéntricos: cinco sépalos verdes; cinco pétalos bilabiados que se fusionan formando un tubo, un labio superior bilobado y un labio inferior con tres lóbulos y un paladar; cinco estambres y dos carpelos. Los dos pétalos dorsales son largos y forman el labio superior de la flor. Entre los cinco estambres el más dorsal aborta para dar lugar a un órgano llamado estaminoide y los dos laterales son más cortos que los ventrales. El ovario está formado por dos carpelos (figura 1) (Cubas 2004; Güemes J 2008;



Luo *et al.* 1996).

Recientemente se ha realizado un mapa de ligamiento sobre la base de genes transcritos con un intervalo promedio entre marcadores de 2,5 cM (Schwarz-Sommer *et al.* 2003b), a esta información se ha sumado la ubicación de los centrómeros, lo que ha permitido relacionar los grupos de ligamiento con los cromosomas de *A. majus* (Zhang *et al.* 2005). Además, se cuenta con una base de datos de 12000 secuencias de genes únicos en una base de datos de las cuales 2500 se han agregado a la base de datos del European Molecular Biology Laboratory (EMBL) (Schwarz-Sommer *et al.* 2003a).

El presente trabajo de Tesis se centra principalmente en el estudio de genes que intervienen en los procesos de regulación del tamaño de órganos con acción específica sobre las flores. Para ello hemos partido de trabajos previos realizados a mediados del siglo XX por Hans Stubbe en mutantes de *A. majus* que permitieron seleccionar mutantes simples con variación en el tamaño de los órganos de la flor (Stubbe 1966).



Figura 1: Morfología de *A. majus*.

A) Dibujo en el que se muestran todos los órganos de *A. majus*, incluyendo los órganos florales reproductivos, cápsulas y semillas. B) Fotografía mostrando una vista lateral de la flor (imágenes extraída de: <http://www.edb.ups-tlse.fr/equipe1/thebaud.htm>, <http://www.botany.hawaii.edu/Faculty/Carr/scrophulari.htm>)

2 VARIABILIDAD FENOTÍPICA FRENTE A CAMBIOS DEL ENTORNO

Las plantas son organismos sésiles y por lo tanto, para adaptarse a los cambios en el entorno, deben sufrir modificaciones en el desarrollo que afectan el crecimiento, la floración y hasta la supervivencia.

La plasticidad fenotípica se define como la capacidad que tiene un organismo con un genotipo determinado de cambiar el fenotipo frente a variaciones del entorno. Este concepto y otros relacionados han sido definidos a principios de 1940 siendo modificado posteriormente de acuerdo con diferentes autores (Bradshaw 1965; Schmalhausen 1949; Waddington 1942).

Desde el punto de vista evolutivo la plasticidad fenotípica puede considerarse como una capacidad de adaptación frente a entornos heterogéneos. Estas respuestas plásticas incluyen cambios fisiológicos, de comportamiento, morfológicos, de crecimiento etc., cambios que pueden producirse a lo largo del ciclo de vida de un organismo o a través de generaciones (de Jong 2005; DeWitt 1998; Miner *et al.* 2005; Vía *et al.* 1995).

La plasticidad fenotípica puede estar influenciada entre otras cosas por la interacción entre especies, variaciones relacionadas con el clima, disponibilidad de agua y nutrientes y competencia intraespecífica. El estudio de la competencia en monocultivo por aumento de la densidad es de gran importancia por dos razones: por un lado para comprender la capacidad de adaptación de las plantas tanto a nivel evolutivo como individual, y por otro lado por el alto interés agronómico que posee. En condiciones de cultivo es de particular importancia establecer un marco de siembra adecuado que permita un rendimiento óptimo evitando la competencia intraespecífica.

Existen tres efectos fundamentales causados por la competencia intraespecífica en monocultivos: el efecto competencia-densidad que causa una disminución del tamaño medio de las plantas sobrevivientes en función de un aumento de la densidad, un desarrollo de jerarquías de tamaño dentro de la población y la mortalidad dependiente de la densidad (Park, Benjamin, & Watkinson 2003).

En cuanto a las plantas ornamentales como es el caso de *A. majus* se tienen en cuenta características como el número, tamaño y disposición de las flores, largo total de las plantas, variación en el tiempo de floración, entre día largo y día corto, dominancia apical, etc. Existen estudios realizados en los cuales se describe que el aumento de la densidad produce un aumento en la producción



pero una disminución en la masa de la planta, como es el caso de tomate, crisantemo cortado y rosa (Dambre, Blindeman, & Van Iabeke 1998; LANGTON, Benjamin, & Edmonson 1999; LEE, HEUVELINK, & CHALLA 2002). También se han realizado estudios en *Achillea millefolium* L. que presenta un alto rendimiento independientemente del espacio y tamaño de la flor tampoco se ve afectado (Zhang *et al.* 1996).

La comprensión de la dinámica de crecimiento de los cultivos así como las características del mismo, son importantes para el desarrollo de modelos matemáticos que expliquen los comportamientos de crecimiento frente a las diferentes variables que afectan los parámetros de calidad y permitan una comparación en diferentes condiciones.

Otro concepto a tener en cuenta a la hora de hablar de plasticidad fenotípica es la modularidad. Las plantas están constituidas por la repetición de entidades estructurales elementales, definidas en los años '50 como fitómeros (Galinat 1959), cuya morfología, dimensión, función y anatomía cambian durante la ontogenia según el estadio de desarrollo (Barthelemy & Caraglio 2007). Estas unidades repetitivas han sido denominadas módulos según la definición dada por De Kroon (2005), y son a menudo estructural y funcionalmente semiautónomas. Una misma planta puede experimentar diferentes entornos, por ejemplo por encima de la tierra el cuerpo vegetativo y por debajo las raíces. En relación con la plasticidad fenotípica el efecto total sobre la planta sería la suma de las respuestas modulares inducidas por el entorno. Existen diversos ejemplos que ratifican esta teoría: por ejemplo se observa una localización selectiva de las raíces en puntos del suelo con mayor concentración de nutrientes generando plantas igualmente saludables que aquellas crecidas en medios ricos, experimentos de competencia por luz han demostrado una respuesta plástica localizada en el lugar de las variaciones de las condiciones de luz a nivel de un nodo y su hoja. Estos módulos pueden reaccionar de forma independiente a las diferentes condiciones del entorno y puede haber una interconexión entre ellos que cause variación en la respuesta fenotípica global (De Kroon *et al.* 2005; Hodge 2004; Ryser & Eek 2000).

3 DESARROLLO VEGETATIVO

3.1 MANTENIMIENTO DEL MERISTEMO APICAL

Las plantas resultan particularmente atractivas para el estudio de los procesos de desarrollo y diferenciación dado que a diferencia de los animales

éstos se prolongan a lo largo de todo el ciclo de vida de las plantas. En animales durante la embriogénesis se establece el plano corporal y la aparición de los órganos, la función de células madre en los adultos es reparar tejidos, compensar pérdidas celulares y mantener líneas germinales. Las plantas, en cambio, desarrollan nuevos órganos y estructuras durante todo su ciclo de vida. La generación de estos nuevos órganos es a partir de células madre meristemáticas que pueden renovarse por sí mismas y mantener la capacidad de dar lugar a nuevos órganos y tejidos (Prem & Mohan 2006).

Las células madre son mantenidas tanto en plantas como animales en microentornos denominados “nichos de células madre”. En plantas los nichos mejor estudiados se encuentran en el meristemo apical del tallo y de la raíz (SAM y RAM). Alrededor del nicho las células se dividen más rápido y proveen las células precursoras de nuevos órganos. Tanto en plantas como en animales las células madre son mantenidas por señales externas y sus hijas se diferencian cuando se desplazan y alejan de esta señal. Cuando las células salen del nicho antes de completar la diferenciación atraviesan un período de rápida división celular. El proceso de división lenta presente en el nicho puede ser una forma de protección frente a mutaciones, en las plantas es particularmente importante debido a que no solo generan tejidos somáticos sino también líneas germinales. (Sablowski 2004).

El mantenimiento de las células madre en los nichos y su función son influenciados por diversos factores que serán detallados a continuación: por genes que participan en una vía de señalización mediada por *CLAVATA 1, 2 y 3 (CLV1, 2, 3)*, *WUSCHEL (WUS)* y *SHOOT MERISTEMLESS (STM)*; por remodelamiento de la cromatina por medio de metilación y acetilación; por ARN de interferencia y mediante hormonas como las auxinas.

En cuanto a los genes ortólogos en *A. majus* se conoce un gen homólogo a *WUS*, *ROSULATA (ROA)* descrito por Kieffer y colaboradores (Kieffer *et al.* 2006). El apilamiento de secuencia entre *ROA*, *WUS* y *TERMINATOR (TER)*, (el ortólogo en *Petunia híbrida*), revela que comparten un 83% de homología (Kieffer *et al.* 2006). Con respecto a los genes *KNOX*, familia a la que pertenece *STM*, se han encontrado en *A. majus* los genes *HIRZINA (HIRZ)* e *INVAGINATA (INA)* cuya expresión tiene el mismo patrón que su ortólogo en *Arabidopsis*.

3.2 ORGANIZACIÓN DE LOS MERISTEMOS APICALES

El SAM de las angiospermas consiste en un pequeño grupo de células en forma de bóveda con características estructurales específicas. En cuanto a la distribución de capas se encuentra la capa epidérmica L1 y sub-epidérmica L2 con



un espesor de una única célula. Ambas constituyen la "túnica", mantienen la identidad clonal de cada capa y principalmente con división anticlinal. La capa L3 permanece por debajo de la túnica, constituye el *corpus* y sus células se dividen en todos los planos. L1 da lugar a la epidermis de tallos, hojas y flores, L2 provee el tejido sub-epidérmico y las células germinales y L3 genera los tejidos centrales (figura 2) (Fletcher *et al.* 2000; Mjolsness E. *et al.* 1999).

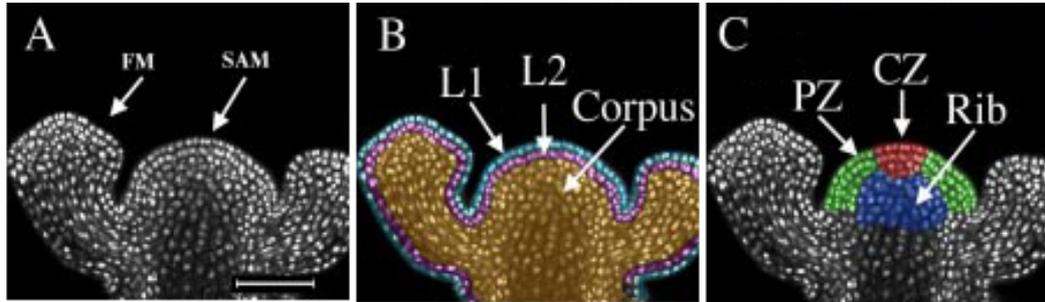


Figura 2: Estructura del SAM.

Tres vistas del meristemo apical del tallo (SAM) en *Arabidopsis*. Micrografía láser confocal que muestra A) la sección central a través del ápice del tallo. FM: meristemo floral. B) Coloración señalando la estructura en capas del meristemo. L1 (epidérmica), L2 (sub-epidérmica) y L3 (corpus). C) coloración que señala las regiones según la función en el SAM. CZ: la zona central, PZ: zona periférica, Rib: centro organizativo (Mjolsness E. *et al.* 1999).

Los estudios histológicos del SAM también indican divisiones en zonas: zona central (CZ), zona periférica (PZ) y centro organizativo (OC). La zona central se encuentra en el ápice del meristemo y contiene las células madre prácticamente inactivas y con una división celular muy lenta. La zona periférica rodea a la zona central en forma de anillo y sus células se dividen más rápidamente incorporándose en los primordios de órganos en las zonas flanqueantes del meristemo. Las células del OC son internas a las otras dos zonas y producen las señales que permiten el mantenimiento de las células madre (figura 1) (Castellano & Sablowski 2005; Fletcher *et al.* 2000). La fuente de mantenimiento de células madre en RAM es el centro quiescente (QC) que se encuentra en el centro del meristemo rodeado de células madre (Castellano *et al.* 2005).

3.3 GENES DE MANTENIMIENTO MERISTEMÁTICO

Las células madre del meristemo son mantenidas gracias a la acción de *CLV-WUS-STM* en *Arabidopsis*, cuyo mecanismo de regulación se basa en una retroalimentación negativa entre las células madre y el OC (Castellano *et al.* 2005). *WUS* se expresa en la OC del meristemo apical y su función es la de mantener las células no diferenciadas en la CZ a través de una función no

autónoma celular (Laux *et al.* 1996; Mayer *et al.* 1998). Los mutantes *wus* presentan pérdida de células madre en CZ y son incapaces de mantener el meristemo (figura 3). Los efectos del mutante se manifiestan en todos los estadios de desarrollo de la planta y sus flores carecen de los órganos centrales (Laux *et al.* 1996). El fenotipo de *roa*, de *A. majus*, es más drástico que el observado en los mutantes *wus* ya que no alcanzan a producir flores. Esto podría deberse a la presencia de genes redundantes que ejerzan el mantenimiento de las células madre en *Arabidopsis* o a un control más estricto en la floración de *A. majus* junto con una destrucción más grave del SAM (Kieffer *et al.* 2006).

Los genes *CLV1*, *2* y *3* tienen función opuesta a *WUS* y son los responsables de reclutar las células desde CZ hacia la PZ para la formación de los primordios de los órganos. Los mutantes *clv 1-3* poseen un SAM más grande que genera un mayor número de primordios de órganos con una pérdida aparente de la filotaxis y la aparición de más carpelos (figura 3) (Doerner 2000; Laux *et al.* 1996).

Los genes *WUS* y *CLV* se regulan de forma recíproca de tal manera que los genes *CLV* a través de una vía de señalización desde CZ restringen la expresión de *WUS* mientras éste induce la expresión de *CLV3* (Doerner 2003; Vernoux & Benfey 2005).

Recientemente se han descubierto los genes *POLTERGEIST* (*POL*) y *POLTERGEIST-LIKE1* (*PLL1*) que actúan aguas abajo de los genes *CLV*, y su función parece relacionarse con el mantenimiento de la expresión de *WUS* y el balance entre células madre y las destinadas a la diferenciación (Song, Lee, & Clark 2006).

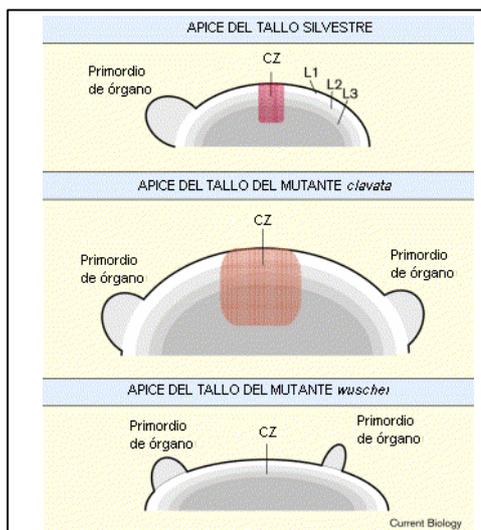


Figura 3: Comparación del SAM en los mutantes *wus* y *clv*.

Comparación esquemática de los ápices del tallo silvestres (superior), mutante *clavata* (centro) y mutante *wuschel* (inferior) en plantas de *Arabidopsis*. La zona central (CZ) en rojo se expande en los meristemos *clv* y se genera un número excesivo de primordios de órganos en la periferia. En los mutantes *wus* las células madre del ápice se consumen formando los primordios aunque se generan meristemos adventicios que producen eventos transitorios de formación de órganos desde posiciones apicales distribuidas al azar (Doerner 2000).



El estado indeterminado de las células dentro de SAM depende también del gen *STM* (Barton & Poethig 1993). Este gen pertenece a la familia de los genes *KNOTTED-like*, de *Arabidopsis* (*KNAT*), o genes *KNOX*, de la cual también forman parte los genes *KNAT1* o *BREVIPEDICELLUS* (*BP*), *KNAT2*, *3*, *4*, *5* y *6* (Hake *et al.* 2004; Serikawa, Martinez-Laborda, & Zambryski 1996). Los mutantes *stm* poseen un fenotipo opuesto al fenotipo de los mutantes simples de *clv*. Este gen se expresa en las células indeterminadas del meristemo y está ausente en los primordios de órganos. En comparación con los genes *WUS* se ha encontrado que ambos mutantes simples *wus* y *stm* provocan la detención de la actividad meristemática con un patrón de crecimiento, aborto y reinicio. Sin embargo en *stm* las células meristemáticas se consumen por completo en el desarrollo de los órganos pero en *wus* de alguna manera se mantienen permitiendo el reinicio continuo aunque transitorio del desarrollo de tallo (Doerner 2003). Esta diferencia conduce a pensar que *STM* previene que las células meristemáticas formen un órgano específico, mientras que *WUS* está involucrado en el mantenimiento de las células madre, por lo tanto el arresto del meristemo observado en ambos mutantes simples se debe a dos razones diferentes (Simon & James 2006).

De los análisis de co-expresión ectópica de *WUS* y *STM* se deduce que se requieren ambos genes para proporcionar identidad meristemática (Lenhard, Jurgens, & Laux 2002). Los genes *WUS* y *STM* son expresados en forma independiente uno de otro y en diferentes patrones durante la embriogénesis, sin embargo no pueden mantenerse uno en ausencia del otro (Mayer *et al.* 1998). Los genes *BP* y *KNAT6* participan junto con *STM* en el mantenimiento de las células meristemáticas y *BP* también regula el desarrollo de los entrenudos y participa en el desarrollo del replo placentario (Alonso-Cantabrana *et al.* 2007; Belles-Boix *et al.* 2006; Byrne, Simorowski, & Martienssen 2002).

HIRZ e *INA* en *A. majus*, tienen el mismo patrón de expresión que *STM* de *Arabidopsis* presentándose en SAM y en los entrenudos en desarrollo pero no en los primordios ni inicios de órganos. Los análisis de dos alelos hipermórficos demuestran que actúan en vías redundantes promoviendo la formación de SAM (Golz, Keck, & Hudson 2002).

Además de los genes mencionados se ha encontrado un mutante *hairy meristem* (*ham*), en petunia, incapaz de mantener el meristemo apical. Los mutantes *ham* son indistinguibles del silvestre en plantas jóvenes pero a partir del desarrollo de unas pocas hojas se detiene la formación de órganos y los niveles de expresión de *PhWUS* (*TER*) y *PhSTM* decaen rápidamente. Los dobles mutantes *ham ter* tienen inicialmente el fenotipo de *wus* pero en estadios posteriores de desarrollo alcanzan el fenotipo de *ham*, sugiriendo que ambos genes actúan en vías paralelas. Dado que la expresión de *HAM* se limita a los tejidos derivados de la capa L3 del tallo y las hojas, su acción parece ser no autónoma celular (Doerner

2003; Stuurman, Jaggi, & Kuhlemeier 2002).

En resumen se puede concluir que *STM* es requerido para mantener un estado indeterminado en las células dentro del SAM, mientras *WUS* conserva un subgrupo de estas células en el centro de SAM como células madre. Los genes *CLV1-3* mantienen la homeostasis de las células madre por medio de la retroinhibición de *WUS* y permiten el equilibrio entre las células que pluripotenciales y aquellas destinadas a la formación de nuevos órganos.

Recientemente se ha encontrado un mutante con fenotipo indistinguible de los mutantes *wus* que es un alelo dominante negativo del gen de identidad *APETALA (AP2)*, *I28*. El fenotipo del mutante de pérdida de función *ap2* presenta características similares al mutante *I28* mostrando reducción de la expresión de *WUS* y *CLV3* en SAM. Esta reducción de *WUS* sugiere una activación regulada por *AP2*, que requiere la presencia de *CLV3*. Por lo tanto *AP2* o factores controlados por él actuarían regulando negativamente la vía de señalización de *CLV*. *AP2* se expresa en todos los estadios del SAM, los resultados en los trabajos realizados por Wurschum y colaboradores demuestran que la actividad silvestre de *AP2* compete con la actividad de *I28* (figura 4). (Doerner 2006; Wurschum, Gross-Hardt, & Laux 2006).

Otros mecanismos de regulación de la expresión de genes como el remodelación de la cromatina o la regulación mediada por los micro ARN (miARN) también participan en la regulación de los genes de mantenimiento del meristemo. En relación con la cromatina se han descrito los mutantes en los genes *FASCIATA 1 Y 2 (FAS1 y 2)* que afectarían el dominio de expresión de *WUS* como represores (Kaya *et al.* 2001). Mutaciones en el gen *AtBrahma* homólogo a una subunidad del complejo de remodelación de la cromatina en levaduras, provoca anormalidades en el desarrollo del tallo, en el mantenimiento del SAM, reducción en el tamaño de las inflorescencias y número de flores así como cambios en el tamaño y forma de hojas y flores (Farrona *et al.* 2004). Los mutantes en la proteína *SPLAYED (SYD)* exhiben un fenotipo similar al producido cuando se restringe la expresión de *WUS* (Kwon *et al.* 2006).

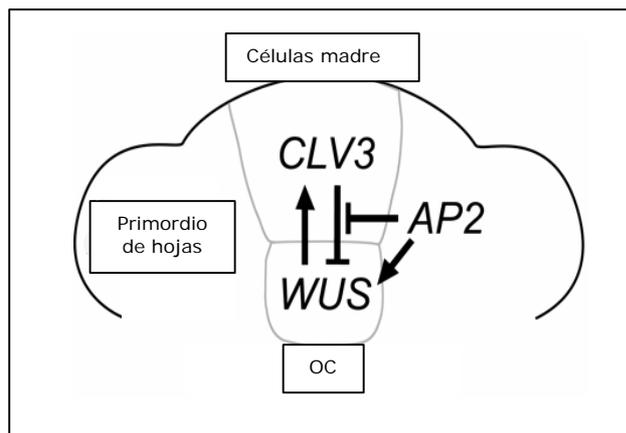


Figura 4: Modelo de la acción de AP2 en las células madre del SAM.

AP2 puede promover el mantenimiento de las células madre regulando negativamente la señalización mediada por CLV (línea cortada) o contraponiendo su efecto (flecha) (Wurschum *et al.* 2006).

Estudios recientes sugieren que las moléculas de miARN son moléculas reguladoras claves en el desarrollo de las plantas. Se ha encontrado que la proteína *ARGONAUTA1* (*AGO1*), que participa en la biosíntesis de miARN, está relacionada con el mantenimiento de las células madre en el meristemo además de presentar diversas funciones a lo largo del desarrollo de la planta como se mencionará más adelante (Prem *et al.* 2006). Del análisis de los mutantes simples *ago1* y *pinhead* (*phd*), un gen estrechamente relacionado con *AGO1*, se deduce que ambos genes tienen un efecto positivo en la función de *STM*. Sin embargo la información disponible no permite definir el modo de acción de *AGO1* y *PNH/ZLL* en la función de *STM* (Kidner & Martienssen 2005; Prem *et al.* 2006)

La mayoría de los mutantes en estos genes que afectan el mantenimiento del meristemo y el número de células de los primordios de órganos comprometen la arquitectura floral. Sus efectos no cambian el tamaño de los órganos de la flor sino el número (Weiss, Delgado-Benarroch, & Egea-Cortines 2005).

4 FORMACIÓN DE NUEVOS ÓRGANOS

Pequeños grupos de células cercanas al meristemo muestran los primeros signos de diferenciación hacia la formación de los primordios de órganos. En principio se define un grupo de células denominadas pre-fundadoras que posteriormente darán lugar a las células fundadoras. Durante esta fase se establecen los límites que separan el primordio del resto de los tejidos (Carraro *et al.* 2006).

Los primeros estudios genéticos comenzaron con el aislamiento de los genes

PHANTASTICA (*PHAN*) de *A. majus* (Waites et al. 1998; Waites & Hudson 1995) posteriormente se aislaron los ortólogos en maíz (*ROUGH SHEATH 2*) (Timmermans et al. 1999; Tsiantis et al. 1999) y en *Arabidopsis* *ASYMMETRIC LEAVES1* (*AS1*) (Byrne et al. 2000), todos con dominios myb de factores de transcripción. Estos genes participan en la represión de proteínas KNOX en las células fundadoras de los órganos. A su vez se ha demostrado que *AS1* y *ASYMMETRIC LEAVES2* (*AS2*) son reprimidos por *STM* (Byrne et al. 2000) y actúan formando un complejo que se une directamente a los promotores de proteínas KNOX para reprimir su expresión (Guo et al. 2008). *AS1* y *AS2* actúan por otro lado regulando positivamente la expresión de *LATERAL ORGAN BOUNDARY* (*LOB*) miembro de la familia de proteínas denominada LOB domain (LBD) a la que pertenece la proteína *AS2* (Iwakawa et al. 2002; Shuai, Reynaga-Pena, & Springer 2002). *LOB* se expresa en los límites entre SAM y los primordios de los órganos en desarrollo y su función es redundante con otras proteínas pertenecientes a la misma familia como lo demuestra la ausencia de fenotipo en el mutante simple *lob* (Byrne et al. 2002; Shuai et al. 2002). Recientemente se ha descrito una nueva función de los genes *BLADE-ON-PETIOLE1* y *2* (*BOP1* y *2*) en la regulación de los órganos laterales y la forma celular en *Arabidopsis*. La expresión ectópica de ambos genes conduce a una sobre-expresión de *LOB* y *AS2* y a una reducción de su expresión en los mutantes *bop*. Además la expresión ectópica de *BOP* provoca la represión de los genes KNOX de clase I (Ha et al. 2007).

Estos resultados sugieren que los genes que se expresan en los primordios de órganos interactúan con los genes meristemáticos para regular la morfogénesis del tallo.

4.1 DEFINICIÓN DE LOS LÍMITES ENTRE MERISTEMOS Y ÓRGANOS

Los órganos laterales se forman a partir del SAM originándose en grupos de células de la periferia del meristemo. Esto conduce a la formación de bordes entre el meristemo y los órganos laterales y entre los diferentes órganos. Las células que conforman estos bordes tienen comportamientos especiales respecto de la división y expansión celular y a la continuidad de los plasmodesmos (Aida & Tasaka 2006).

En cuanto a la división celular trabajos realizados en SAM de tomate y en inflorescencias de *Arabidopsis* demuestran que la división celular se detiene en los bordes o disminuye de forma significativa. También se ha descrito una disminución significativa de la expresión de la ciclina *D3b* en *A. majus* (Breuil-



Broyer et al. 2004; Gaudin et al. 2000; Hussey 1971). Sin embargo otros trabajos realizados por Laufs et al (Laufs et al. 2004) en *Arabidopsis*, en estadios muy tempranos del desarrollo de sépalos, sí se observan células con actividad mitótica en los bordes entre órganos y entre órgano y meristemo. Esto sugiere la existencia de un período de tiempo entre la especificación de la forma de los bordes y la detención de la actividad del ciclo celular (Aida et al. 2006).

La morfología de las células también es diferente en los bordes. En general las células de los meristemos y los primordios son redondeadas con superficies planas o convexas. Sin embargo, las células en los bordes entre órganos y meristemos, son cóncavas (curvatura negativa) y se alargan extendiéndose paralelas al eje del borde. Esta elongación se combina con una contracción en el plano perpendicular, lo que genera un surco presente en la separación de los primordios del meristemo (Aida et al. 2006).

El desarrollo de los límites entre órganos involucra la regulación de diversos genes que están relacionados con su formación. Se han encontrado mutaciones que producen fenotipos con órganos adyacentes fusionados que incluyen el *NO APICAL MERISTEM (NAM)* en *Petunia*, los genes de *Arabidopsis CUC1* y *2* y el gen de *A. majus CUPULIFORMIS (CUP)*. Además de la fusión de los cotiledones los dobles mutantes *cuc1* y *2* con los mutantes *nam* carecen de SAM. Por otro lado los mutantes *stm* poseen también cotiledones fusionados, lo que sugiere una comunicación entre las vías involucradas en la formación de bordes y el mantenimiento del meristemo. Los análisis de los dobles y triples mutantes *cuc 1*, *2* y *stm* muestran que *CUC1* y *CUC2* son esenciales para la expresión de *STM* y viceversa. En el caso de *A. majus* los mutantes *CUP* son más drásticos presentando fusión en todos los órganos laterales. Estos resultados indican que en *Petunia* y *Arabidopsis* existe una mayor redundancia para la separación de órganos que la presente en *A. majus* (Aida et al. 2002; Aida, Ishida, & Tasaka 1999; Aida et al. 2006; Weir et al. 2004). La regulación de los genes *CUC* es afectada por diversos factores entre los cuales se encuentran las auxinas. Los mutantes simples en los genes *PIN-FORMED1 (PIN1)*, un transportador de auxinas) y *PINOID (PID)*, un regulador de la localización polar de *PIN1*) causan efectos suaves en el desarrollo de los cotiledones. Los dobles mutantes, sin embargo, tienen efectos más drásticos que incluyen la completa ausencia de cotiledones. En estos dobles mutantes los dominios de expresión de *CUC1*, *CUC2* y *STM* se expanden hacia la periferia y se solapan con los marcadores específicos de los cotiledones. En un fondo genético *cuc1*, *cuc2* o *stm* se recupera el crecimiento de los cotiledones sugiriendo que la regulación negativa de estos genes por *PIN1* y *PID* es suficiente para el crecimiento del primordio. (Aida et al. 2006; Furutani et al. 2004). También se ha establecido que los genes *CUC* están bajo un control post-transcripcional por miARN, miR164, que regula la acumulación de los

productos génicos (Aida *et al.* 2006).

4.2 DETERMINACIÓN DE POLARIDAD DE ÓRGANOS

La literatura disponible respecto al desarrollo de la polaridad de los órganos se centra principalmente en el estudio del desarrollo de las hojas. Los primordios de los órganos se subdividen en dominios diferentes a lo largo de los ejes adaxial/abaxial y próximo/distal, en referencia a la localización del meristemo (Byrne 2005; Engstrom, Izhaki, & Bowman 2004). La base del desarrollo asimétrico en un organismo multicelular es la habilidad de las células de interpretar su posición respecto de una referencia, que en el caso de los primordios de órganos es el meristemo, y traducir la información en patrones de diferenciación, proceso denominado como establecimiento de la polaridad (Carrazo, 2006).

Los estudios realizados en *Arabidopsis* han identificado diversas familias de genes que participan en la determinación de la polaridad adaxial-abaxial apropiada. Los genes de Clase III del homeodominio/ cremallera de Leucinas (Clase III HD-ZIP), en particular *PHABULOSA* (*PHB*), *PHAVOLUTA* (*PHV*) y *REVOLUTA* (*REV*) están relacionados con el mantenimiento del dominio adaxial (McConnell *et al.* 2001; Otsuga *et al.* 2001; Prigge *et al.* 2005). El dominio abaxial por otro lado es influenciado por las familias *KANADI* (*KAN1*, 2 y 3) y *YABBY* donde están normalmente activos. Existen evidencias genéticas y moleculares que sugieren que *PHB* y *KANADI* se reprimen mutuamente en los primordios de las hojas definiendo dos regiones adyacentes de expresión (Scofield & Murray 2006).

Dado que *PHB*, *PHV* y *REV* exhiben un patrón similar de expresión se ha postulado que los tres tienen función redundante para promover el desarrollo del meristemo y la identidad adaxial de los órganos laterales. La regulación de los genes pertenecientes a la Clase III HD-ZIP se ha sugerido recientemente podría estar mediada por miRNAs (Emery *et al.* 2003; Kidner & Timmermans 2007; Yang, Xue, & An 2007).

La función de los genes *YABBY* (*YAB*) parece entrar en acción aguas abajo de las rutas descritas hasta el momento. La familia de los genes *YAB* comprende seis factores de transcripción estrechamente relacionados, de los cuales tres se expresan durante el desarrollo vegetativo (*FILAMENTOUS FLOWER* (*FIL*), *YAB2* y *YAB3*) (Siegfried *et al.* 1999). Tanto *KAN* como *ETTIN/AUXIN RESPONSE FACTOR4* (*ETT/ARF4*) con función redundante en la determinación de la identidad abaxial, regulan positivamente la expresión de *FIL*. Mientras *AS2* y *AS1* (ortólogo de *PHAN* en *Arabidopsis*) la inhiben en el dominio adaxial y parecen promover la identidad



de este dominio (Kidner *et al.* 2007). Resultados recientes han demostrado que posiblemente *AS2* restringe la expresión de las proteínas HD-ZIPIII mediada por miRAN165/166 maduros (Ueno *et al.* 2007). La localización polarizada de auxinas podría intervenir en la polarización de la expresión de *FIL* a través de *ETT/ARF4* cuya expresión es a su vez controlada por *trans-acting short-interfering ARN* (ta-siARN) (figura 5) (Kidner *et al.* 2007).

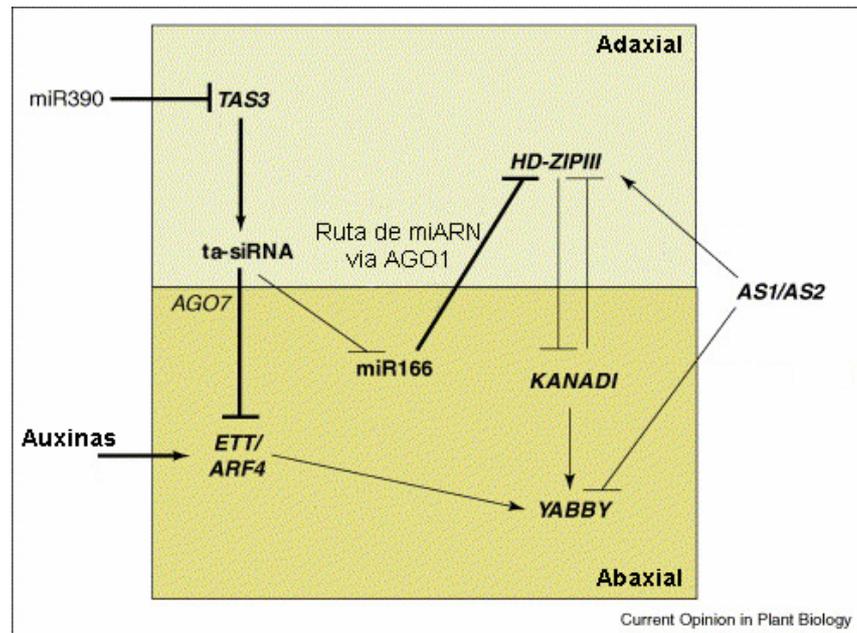


Figura 5: Interacción genética que controla la polaridad adaxial-abaxial en *Arabidopsis*.

La especificación de la polaridad involucra tres rutas genéticas conservadas: TAS3-ta-siARN, HD-ZIPIII-KAN, y AS1-AS2. Estas rutas se identificaron por redundancias y por interacciones antagónicas entre los componentes abaxiales y adaxiales. Todas confluyen en los genes *YABBY*. Las interacciones que se conocen son directas están señaladas en negritas.

En el gráfico mostrado en la figura 5 se detalla la interconexión entre los genes mencionados para *Arabidopsis* que participan en la regulación de la polaridad de las hojas.

De las tres rutas descritas que median la regulación de la polaridad de las hojas, en *A. majus* sólo se ha encontrado la mediada por *AS1* y *AS2*. El gen *PHAN* de *A. majus* actúa tanto en el mantenimiento del meristemo como en la determinación de la polaridad de los órganos. Su acción es redundante con los genes *HANDLEBARS* (*HB*) el cual actúa tanto en el desarrollo vegetativo como en la simetría de los pétalos (Waites *et al.* 1998; Waites & Hudson 2001). Ambos genes especifican la polaridad en las hojas e intervienen en el mantenimiento del meristemo. Sin embargo, dado que *HB* también presenta una función en flores, se puede inferir que la asimetría abaxial-adaxial de las hojas puede compartir

componentes con la vía de las flores (Waites *et al.* 2001). Los genes *GRAMINIFOLIA* (*GRAM*) y *PROLONGATA* (*PROL*) de *A. majus*, pertenecientes a la familia de genes *YABBY*, se expresan en el dominio abaxial y determinan la forma abaxial de las células de manera redundante excluyendo la identidad adaxial. Sin embargo *GRAM* es capaz de promover la identidad adaxial junto con *PROL* y *PHAN* de una manera no autónoma celular (Golz *et al.* 2004)

Hasta el momento no se conoce demasiado acerca de los controles que actúan aguas arriba de estos programas encargados de determinar la polaridad de los órganos. Nole-Wilson & Krizek han descrito una posible relación entre *AINTEGUMENTA* (*ANT*) y *FIL* promoviendo la polaridad de los órganos a través de la inducción de la expresión de *PHB* (Nole-Wilson & Krizek 2006).

Como hemos descrito los genes *AS1* y *2* relacionados con el mantenimiento del meristemo también tienen un papel en la determinación de la polaridad de las hojas. Esta interconexión entre los diferentes programas genéticos también se evidencia en la represión de los genes *KNOX* mediada por *YAB3* y *FIL* (Engstrom *et al.* 2004).

4.2.1 Crecimiento polar y tamaño de los órganos florales

Los primeros trabajos realizados en *A. majus* proporcionaron la información básica para la comprensión del desarrollo de las hojas con la identificación del programa genético que controla la simetría dorsoventral de los órganos laterales de las plantas.

Algunos genes pertenecientes a la familia de los genes *YAB* producen fenotipos florales en sus mutantes; la pérdida de función de *FIL* provoca una transformación de los sépalos y los pétalos en filamentos de estambres, con variación en el número y forma de los órganos florales, este gen también está involucrado en el mantenimiento del meristemo floral (Sawa *et al.* 1999). Este fenotipo sugiere que los genes *YAB* controlan la disposición no solo de las hojas sino de las flores. Además podrían tener una función más general regulando la expansión de los órganos dado que la expresión de los genes *YAB*, bajo la regulación del promotor de *KANAD1* produce flores grandes (Yuval Eshed, comunicación personal). Recientemente se ha descrito que los genes *SEUSS* (*SEU*) y *LEUNIG* (*LEU*) están involucrados en la determinación de la polaridad abaxial/adaxial de los pétalos en *Arabidopsis* y su acción parece tener lugar a través de la regulación de los genes *FIL/YAB1* y *PHB*. (Franks, Liu, & Fischer 2006). Estos genes (*SEU* y *LEU*) intervienen también en la determinación de la identidad de los órganos florales a través de la represión de la expresión *AGAMOUS* (*AG*) en sépalos y pétalos para permitir una especificación adecuada de la identidad de los órganos (Franks *et al.* 2002; Liu & Meyerowitz 1995). Los



mutantes presentan una reducción en el área de los pétalos y la función de *LEU* y *SEU* respecto a la formación correcta de la lámina de estos órganos parece ser a través de la regulación de la proliferación celular en una vía independiente de *AG* (Franks *et al.* 2002; Franks *et al.* 2006).

Todos estos datos sugieren que los genes que controlan la polaridad adaxial/abaxial interaccionan con otros genes requeridos para establecer los límites de identidad y la proliferación celular en una compleja red de genes que aun no se conoce con claridad.

4.3 DETERMINACIÓN DE LA IDENTIDAD DE LOS ÓRGANOS FLORALES

La transición desde los meristemos vegetativos hasta la formación de los primordios florales y por último los órganos florales involucra estadios intermedios entre el meristemo de inflorescencia y el meristemo floral, estos están determinados por una red de genes de identidad que integran la información endógena y del entorno para regular espacial y temporalmente la formación de las flores.

Existen cuatro tipos de señales capaces de inducir la floración: 1- vía dependiente de giberelinas (GA), indispensable en días cortos; 2- vía dependiente del día largo; 3- vía autónoma; y 4- ruta de vernalización. Todas estas vías convergen en los genes *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO 1* (*SOC1*) y *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) (Corbesier & Coupland 2006).

Estas rutas que regulan la inducción de la floración confluyen en la activación de los genes *LEAFY* (*LFY*) y *APETALA1* (*AP1*) en *Arabidopsis*. Estos genes son además reprimidos por *TERMINAL FLOWER1* (*TFL1*) (Blazquez *et al.* 2006; Bradley *et al.* 1997; Shannon & Meekswagner 1991). En *A. majus* el gen con mayor homología con *TFL1* es *CENTRORADIALIS* (*CEN*) cuyos mutantes recesivos *cen* transforman el fenotipo indeterminado de la inflorescencia de *A. majus* en una inflorescencia que termina en una flor pero no afectan el tiempo de floración (Bradley *et al.* 1996).

El gen *LFY* es por lo tanto un gen de identidad meristemática responsable de la transición del desarrollo vegetativo al reproductivo en las plantas dicotiledóneas. A pesar de la importancia en la función de este gen sus genes blanco son solo tres, dos involucrados en la regulación de la identidad floral, *AG* y *APETALA3* (*AP3*), y el tercero relacionado con la identidad meristemática *AP1*, el cual es además un gen de identidad de órgano de clase A como se describe más adelante (figuras 6 y 7). Los mutantes con pérdida de función de *LFY* continúan produciendo hojas y tallos laterales en lugar de flores. La expresión ectópica de

LFY es capaz de producir flores en lugar de hojas (Blazquez *et al.* 1998; Blazquez *et al.* 2006; Coen *et al.* 1990; Jack 2004; Schultz & Haughn 1991). Este gen se encuentra altamente conservado en especies diversas como tabaco (Kelly, Bonnländer, & Meeks-Wagner 1995), petunia (Souer *et al.* 1998), tomate (Molinero-Rosales *et al.* 1999). El ortólogo en *A. majus* es *FLORICAULA (FLO)*, cuyo mutante tiene fenotipo similar al de *Arabidopsis*. Esto indica que *LFY* es indispensable para la producción de los órganos florales en estadios tempranos. En flores tardías *AP1* presenta una actividad redundante con *LFY* en la transición floral (Blazquez *et al.* 1997; William *et al.* 2004). El gen *SQUAMOSA (SQUA)* en *A. majus* codifica para un factor de transcripción que pertenece a la misma familia que *AP1* (MADS box), sus dominios de expresión son similares (Huijser *et al.* 1992).

4.3.1 Modelo ABCDE

Tanto las flores de *A. majus* como de *Arabidopsis* están organizadas en lo que se denominan verticilos, sépalos, pétalos, estambres y carpelos. Los órganos florales se generan secuencialmente a partir de los bordes de los meristemas florales. En primer lugar aparecen los sépalos seguidos por los pétalos, los estambres y finalmente los carpelos. Los sépalos protegen y envuelven el capullo, mientras que los pétalos en muchas especies sirven para atraer a los polinizadores. Ambos tipos de órganos recubren los órganos sexuales: los estambres, más externos, que producen el polen, y los carpelos que se encuentran en el interior y contienen los óvulos (Irish 1999).

Por más de una década el modelo ABC fue la base de la comprensión del desarrollo floral mediante estudios de mutantes homeóticos en *Arabidopsis* y *A. majus* (Schwarz-Sommer *et al.* 2003a). Curiosamente todos los genes involucrados, a excepción de uno, pertenecen a la familia de los genes MADS. Recientemente se han encontrado los genes de clase D que están relacionados con la identidad del óvulo y los genes de clase E que actúan junto con ABC en los tres verticilos interiores. La acción tanto en forma independiente como conjunta, dependiendo del órgano, de las diferentes clases de genes mencionadas, conduce a la formación de las cuatro clases de órganos que componen la flor (Kramer & Hall 2005). Este modelo puede resultar controversial con respecto a los genes de clase A dado que no se han encontrado mutantes homeóticos en *A. majus* para esta clase de genes con fenotipos homólogos a los encontrados en *Arabidopsis* y por lo tanto la función de los genes de clase A en cuanto a la especificación de los órganos florales es aún un enigma (Keck *et al.* 2003; Schwarz-Sommer *et al.* 2003a). Sin embargo trabajos realizados en *Pisum sativum* sugieren que el homólogo a *AO1* ejerce una doble función en la identidad del meristemo y la



identidad de órganos florales (Berbel *et al.* 2001).

Trabajos en *Pisum sativum* y *Medicago truncatula* demuestran que a pesar de las diferencias en la ontogenia floral de estas plantas respecto a *Arabidopsis* y *Antirrhinum* el desarrollo floral requiere la presencia de los mismo genes de identidad (A, B y C) (Benlloch *et al.* 2003; Ferrandiz *et al.* 1999).

El modelo de acción de las diferentes clases de genes se detalla en la figura 6 de tal manera que los genes A determinan la identidad de los sépalos o primer verticilo, la acción combinada de A y B especifica los pétalos, tanto B como C se encargan de la identidad de los estambres y por último los genes de clase C que determinan la formación de los carpelos. Los genes A y C además de su función de identidad tienen actividad cadastral, en el caso de *Arabidopsis*, lo que significa que la expresión de los genes A en el verticilo 1 y 2 no permite la expresión de C en estos verticilos el que excluye a A de los verticilos 3 y 4 (Coen & Meyerowitz 1991; Weigel & Meyerowitz 1994).

i. Genes de clase A

En el caso de *Arabidopsis* hay dos genes que pertenecen a esta clase *APETALA 1 (AP1)* y *APETALA 2 (AP2)*. En principio *AP1* había sido considerado únicamente como gen de identidad meristemática, sin embargo la expresión específica en los verticilos 1 y 2 develaron su actividad en la identidad de los órganos florales. Los mutantes *ap1* afectan la identidad meristemática desarrollando meristemos de inflorescencia en lugar de florales y además causa defectos en el desarrollo de sépalos y pétalos, aunque estos cambios no son exactamente los predichos por el modelo ABC: carpelo-estambre-estambre-carpelo (Bowman *et al.* 1993; Egea Gutierrez-Cortines & Davies 2000). El homólogo de *AP1* en *A. majus* es *SQUAMOSA (SQUA)* aunque no es estrictamente requerido para el desarrollo de pétalos y sépalos (Huijser *et al.* 1992). Los mutantes *ap2*, forman órganos reproductivos en los verticilos externos de la flor, en alelos débiles los sépalos son reemplazados por estructuras similares a las hojas que en ocasiones presentan en sus extremos tejido estigmático y los pétalos por órganos estaminoides, alelos más fuertes presentan carpelos en los verticilos 1 y 2 y ocasionalmente aparecen estambres entre estos dos verticilos (figura 6) (Bowman, Smyth, & Meyerowitz 1989; Keck *et al.* 2003; Kramer *et al.* 2005). La función de *AP2* es doble, por un lado como se deduce de los mutantes, participa en el desarrollo de los sépalos y los pétalos y además reprime la función de *AG* en los verticilos 1 y 2 (Bowman *et al.* 1989). Las dos funciones inherentes a *AP2* son independientes dado que los dobles mutantes *ap2 ag* son epistáticos para *ap2* en los órganos de los dos verticilos externos de la flor (Keck *et al.* 2003). En el caso de *A. majus* no se ha encontrado un fenotipo comparable al de *ap2* de *Arabidopsis*. La función en el desarrollo de los órganos del segundo verticilo

parece relacionarse con los genes *LIPLESS (LIP) 1 y 2*. Los dobles mutantes *lip1 y 2* muestran defectos en los cuatro verticilos, el órgano correspondiente a los sépalos tiene un fenotipo similar a las brácteas, el segundo verticilo presenta reducción en el tamaño de los labios, el paladar y los lóbulos de la flor, estas regiones presentan un fenotipo celular no identificado con células más pequeñas que las silvestres. Los estambres y carpelos no tienen prácticamente cambios en la identidad pero presentan una reducción de tamaño.

Estos resultados sugieren que los genes *LIP* juegan un papel importante en el crecimiento y desarrollo de los órganos del segundo verticilo sin embargo no parecen relacionarse con la inhibición de la expresión de los genes de clase C (Keck *et al.* 2003). La inhibición de *PLENA (PLE)*, gen de clase C de *A. majus* (Bradley *et al.* 1993) parece llevarse a cabo por otros genes como *STY* y *FISTULATA (FIS)*.

ii. Genes de clase B

Estos genes son los responsables de la identidad de los pétalos y los estambres (figura 6). Esta clase de genes ha sido encontrada tanto en *Arabidopsis* como en *A. majus*. En el primer caso se han identificado a *AP3* (Jack, Brockman, & Meyerowitz 1992) y *PISTILLATA (PI)* (Goto & Meyerowitz 1994) y en el caso de *A. majus* a *DEFICIENS (DEF)* (Sommer *et al.* 1990) y *GLOBOSA (GLO)* (Trobner *et al.* 1992) todos miembros de la familia génica de las cajas MADS. Ambos mutantes *def* y *glo* poseen fenotipos similares en la flor. En el caso de *Arabidopsis* los mutantes de clase B tiene 4 verticilos, sin embargo los de *A. majus* solo 3. Estas variaciones pueden deberse a interacciones diferentes con otros genes reguladores que varían entre ambas especies (figura 6). Por ejemplo en *Arabidopsis* el doble mutante del gen *SUPERMAN (SUP)*, que presenta defectos en el límite entre los verticilos 3 y 4, con cualquiera de los genes de clase B, produce un fenotipo similar al los mutantes simples de clase B en *A. majus*. Esto significa que existen diferencias entre ambas especies en cuanto a la regulación de la finalización de formación de nuevos órganos (control de determinación) (Bowman *et al.* 1992; Schwarz-Sommer *et al.* 2003a)

iii. Genes de clase C

Los genes de clase C especifican la identidad de órgano y la determinación meristemática en diversas especies de plantas como *A. majus* (Bradley *et al.* 1993), *Arabidopsis* (Yanofsky *et al.* 1990), tomate (Pnueli *et al.* 1994b), petunia y pepino (Kater *et al.* 1998).

Estos genes producen mutantes comparables tanto en *Arabidopsis* como en *A. majus*, en general poseen un mayor número de verticilos y un patrón de crecimiento indeterminado. En *Arabidopsis* el mutante en el gen *AG* presenta un



fenotipo: sépalo, pétalo, pétalo, sépalo y así sucesivamente causando la formación de flores dentro de flores (figura 6). En *A. majus* la mutación en el gen de clase C, *PLE*, posee un fenotipo similar pero con un número variable de órganos en el verticilo 4. La función cadastral de los genes de clase C sobre los genes de clase A se observó tanto en *Arabidopsis* como en *A. majus*, en el primer caso un mutante con expresión constitutiva de *AG* en los verticilos 1 y 2 conduce a la aparición de carpelos y estambres en lugar de sépalos y pétalos, en *A. majus* una ganancia de función de *PLE* en los mismo verticilos también presenta fenotipos similares a las pérdidas de función de los genes de clase A (Weigel *et al.* 1994). Los genes de clase A en *Arabidopsis* presentan acción cadastral sobre los genes de clase C y los mutantes *ap2* provocan su expresión ectópica en los órganos más externos de la flor. Esto genera flores con menos órganos dentro de los verticilos 1, 2 y 3 debido a la acción de estos genes (*PLE* y *AG*) en la determinación de los órganos florales (Schwarz-Sommer *et al.* 2003a)

Tanto en *A. majus* como en *Arabidopsis* se han encontrado genes que comparten funciones con los genes de función C. En el primer caso, *FARINELLI* (*FAR*), aunque el fenotipo del mutante simple no sea comparable al fenotipo de *ple*, mostrando solo esterilidad masculina, el doble mutante *ple far* evidencia una acción redundante de ambos genes en la regulación negativa de los genes de clase B en el cuarto verticilo (Davies *et al.* 1999). En el caso de *Arabidopsis* se identificaron los genes *HUA1* y *2* que parecen compartir las funciones con *AG* de identidad de órganos reproductivo, represión de *AP1* y determinación (Chen & Meyerowitz 1999).

iv. Genes de clase E

La transformación de hojas en flores por la mera sobre expresión de los genes de identidad floral solo fue posible después de identificar los genes *SEPALLATA* (*SEP*). Estos genes actúan en combinación con las funciones ABC para especificar la identidad de los órganos de los verticilos 2, 3 y 4. Su nombre tiene origen en que los triples mutantes *sep1 sep2 sep3* producen flores indeterminadas compuestas únicamente de sépalos (figura 6) (Pelaz *et al.* 2000). La función de estos genes no solo es requerida para el correcto desarrollo de pétalos, estambres y carpelos sino también para prevenir el crecimiento indeterminado. Existen evidencias de la interacción entre *SEP3* y los genes *AP1* y el heterodímero *AP3/PI* y más aún este complejo de genes de clase B puede interactuar con *AG* y *SEP3* en complejos mas grandes (Pelaz *et al.* 2000; Pelaz *et al.* 2001). Se han encontrado los genes ortólogos en eudicotiledóneas y monocotiledóneas evolutivamente distantes de *Arabidopsis* como petunia, *A. majus* (*DEFH 200, 72, 84*) y tomate entre otras (Ambrose *et al.* 2000; Angenent *et al.* 1994; Davies *et al.* 1996b; Pnueli *et al.* 1994a)

v. Genes de clase D

Estudios realizados en petunia híbrida de los genes *FLORAL BINDING PROTEIN 7* y *11* (*FBP 7* y *11*) indicaron que estos eran genes de identidad de óvulo.

La sobre-expresión de *FBP 7* y *11* en los cuatro verticilos conduce a la formación de óvulos en los sépalos y pétalos. La supresión de ambos resulta en la transformación homeótica de los óvulos en tejidos carpeloides, estos resultados condujeron a proponer un nuevo modelo ABCD (Colombo *et al.* 1995; Skipper *et al.* 2006). En *Arabidopsis* estos genes están codificados por los genes *SEEDSTICK* (*STK*) y *SHATERPROOF 1* y *2* (*SHP1* y *2*) todos homólogos a *AG*, los cuatro genes determinan la identidad del carpelo (figura 6) (Krizek & Fletcher 2005; Pinyopich *et al.* 2003).

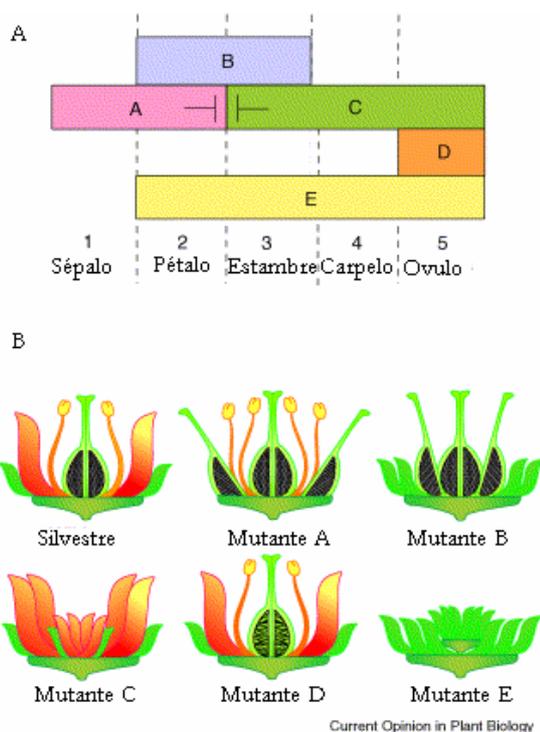


Figura 6: Modelo floral ABCDE de *Arabidopsis*.

Las letras A, B, C, D y E especifican las actividades solapantes de las cinco clases de genes reguladores, los cuales son responsables de la identidad de los cinco órganos florales: A sépalos; A, B y E pétalos; B, C y E estambres; C y E carpelos; y C, D y E óvulos. B) Composición teórica de los cinco tipos de mutantes ABCDE. En el mutante A, la función C está presente en los verticilo 1 y 2; lo que produce la formación de carpelos en el verticilo 1 y estambres en el verticilo 2. En el mutante B los dos primeros verticilos consisten en sépalos, y el tercero y cuarto están formados por carpelos. En el mutante C, a diferencia del mutante A, la función A está activa en todos los verticilos. Por lo tanto se forman pétalos en los verticilos 2 y 3 y la flor se vuelve indeterminada iniciándose una nueva flor en el centro de la flor. En el mutante D los óvulos en el quinto verticilo se convierten en órganos carpeloides. Finalmente en las flores de los mutantes E se producen solo sépalos y son indeterminadas formando una nueva flor desde la región central meristemática. Figura adaptada de Ferrario *et al.*, (Ferrario, Immink, & Angenent 2004)



4.3.2 Regulación de los genes de identidad

La formación de los nuevos órganos florales depende de la regulación de los genes homeóticos de identidad floral. Como se ha descrito hasta el momento *LFY* participa tanto en la regulación de la expresión de genes relacionados con la identidad meristemática como con la identidad floral como *AP1* y *CAL*. La expresión de los genes de clase B *AP3* y *PI* es también regulada por la acción combinada de *LFY* y *UNUSAL FLORAL ORGANS (UFO)*, cuyo ortólogo en *A. majus* es el gen *FIMBRIATA (FIM)* de (Ingram *et al.* 1995; Simon *et al.* 1994).

Los mutantes *fim* muestran cambios a nivel de identidad de órganos florales así como cambios en la identidad meristemática. Los cambios a nivel de identidad de órgano se producen en el segundo y tercer verticilo, sitio de acción de la función B. La expresión de *FIM* se observa antes de la aparición de los primordios de órganos y antes de que los genes de clase B y C se expresen. En etapas tempranas del desarrollo *FIM* se expresa en los dominios de los genes de clase B y C y en estadios más tardíos se presenta solo en los límites de estos dominios (Simon *et al.* 1994). El gen *FIM* además de afectar la identidad de órgano también afecta la disposición de los mismos y la correcta ubicación de los límites entre órganos (Ingram *et al.* 1997). El patrón de expresión de *UFO* y sus mutantes *ufo*, de *Arabidopsis*, tienen muchas características en común con el ortólogo en *A. majus*. Incluyendo los cambios de los mutantes *fim* a nivel de identidad meristemática y de órganos (Ingram *et al.* 1995; Vijayraghavan, Prasad, & Meyerowitz 2005). Los cambios fenotípicos observados en ambos mutantes sugieren que estos genes afectan la actividad de los genes de clase B tanto en *Arabidopsis* como en *A. majus*. En *A. majus* se ve reflejado en la reducción de la expresión de los genes B, sin embargo los resultados obtenidos para *Arabidopsis* no son tan claros. Los análisis de expresión ectópica de *UFO* en *Arabidopsis* muestran una expresión temprana y ectópica del gen de clase B *AP3*, provocando la presencia de pétalos en lugar de sépalos y estambres en lugar de carpelos.

La acción de *UFO* depende de la presencia de *LFY* como lo demuestra la sobre-expresión de *UFO*; incapaz de rescatar el fenotipo de *lfy*, por lo tanto ambos genes actúan juntos y su presencia es suficiente para activar *AP3* (Lee *et al.* 1997) (figura 7). Análisis genéticos y moleculares de la sobre expresión de *AP1* muestran que esta proteína actúa como activador transcripcional regulando los dominios espaciales de *AP3* y *PI* a través de *UFO* y especificando la identidad del pétalo (Ng & Yanofsky 2001). Los estudios genéticos han demostrado *AP1/SQUA* actúan en vías paralelas respecto a la vía *UFO/LFY*, *FIM/FLO* (figura 6) (Ingram *et al.* 1995).

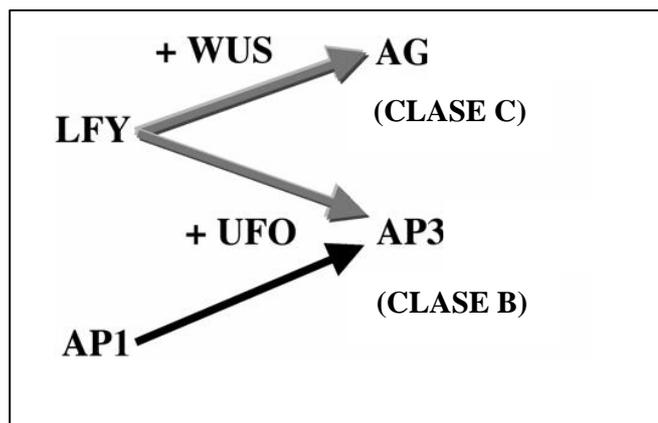


Figura 7: Activación inicial de los genes de identidad floral (Jack 2004).

La represión de los genes de clase C en *A. majus* no está mediada por los genes de clase A como en *Arabidopsis* sino que existen otros genes que cumplen esta función. Los mutantes *sty* y *fis* presentan en el segundo verticilo órganos estaminoides en lugar de pétalos. El análisis de expresión de *PLE* muestran que en ambos mutantes los tejidos del segundo verticilo coinciden con la aparición de *PLE*, aunque esta regulación no necesariamente sea una acción directa sobre *PLE* dado que en el doble mutante *fis sty* se observan cambios en los niveles de expresión de otros genes homeóticos como *FLO*, *SQUA* (Motte, Saedler, & Schwarz-Sommer 1998).

El gen *FIS* podría formar parte de una ruta encargada de modular la expresión de los genes de clase C. Recientemente se ha descrito que *FIS* codifica para una miARN, relacionado con la familia miARN169 cuyos genes blanco pertenecen a la familia de factores de transcripción NF-YA (Cartolano *et al.* 2007). Estos genes reconocen secuencias específicas, presentes en la mayoría de los genes de clase C, las cuales son esenciales para activar y mantener su expresión. Por lo tanto en función de estos resultados se postula que *FIS* miARN restringe la transcripción de los factores de transcripción NF-YA los que serían responsables de la activación y mantenimiento de la expresión de *PLE*. Sorprendentemente, los análisis de dobles mutantes *fim fis* confirman la acción de *FIS* como represor de la función C también en el verticilo central y por lo tanto se sugiere que *fim* podría actuar aguas arriba de *FIS* reprimiéndolo de forma indirecta en los verticilos centrales de la flor (Cartolano *et al.* 2007).

En *Arabidopsis* se ha encontrado un locus, *SUP*, cuyos mutantes presentan la aparición de estambres en el lugar de los carpelos sin cambios en los demás verticilos. Los dobles mutantes *sup* con genes de función B son epistáticos para estos últimos y por lo tanto *SUP* actuaría aguas arriba de los genes *AP3* y *PI* como regulador negativo (Bowman *et al.* 1992; Sakai, Medrano, & Meyerowitz 1995;



Schultz, Pickett, & Haughn 1991). No existe para *A. majus* un gen comparable con todas las características de *SUP* (Davies *et al.* 1999)

LFY no solo actúa en la activación de *AP3* sino que también activa *AG*, esta activación está mediada por *WUS* (figura 7) y ambos genes (*LFY* y *WUS*) actúan directamente sobre secuencias intrónicas del gen *AG*. (Jack 2004). Aunque la activación de *AG* por *LFY* es evidente por los estudios genéticos realizados, los análisis de los mutantes *lfy* muestran un aumento en la expresión de *AG* en yemas y en flores tardías indicando que *LFY* puede tanto activar como reprimir *AG*. En el caso de *FLO* también presenta efectos tanto positivos como negativos sobre la expresión de *PLE* (el ortólogo de *AG*) y la acción de este gen es no autónoma celular (Busch, Bomblies, & Weigel 1999). Como se describió anteriormente los genes *SEU* y *LUG* de *A. majus* actúan como co-represores de la expresión del gen de identidad *AG* (Conner & Liu 2000; Franks *et al.* 2002). En *A. majus*, el gen ortólogo a *LUG* es *STY* y su acción parece estar asociada a *GRAMINIFOLIA* (*GRAM*) restringiendo el dominio de expresión de los genes de identidad de clase B y C. Los dobles mutantes *gram sty* presentan efectos diversos con mayores defectos que los producidos por las mutaciones simples, con desarrollo retardado de las flores, aborto de inflorescencias, pero especialmente se observan cambios homeóticos. Las flores exhiben pétalos estaminoides y sépalos petaloides lo que los relacionan con una expresión ectópica de los genes de identidad B y C en todos los verticilos de la flor (Navarro *et al.* 2004).

Se ha documentado que *ANT*, que se relaciona con los genes *YABBY* y *FIL* y la expresión de *AP3*, actúa reprimiendo *AG* en el segundo verticilo y en meristemos florales en estadios tempranos del desarrollo (Krizek, Probst, & Macias 2000; Nole-Wilson *et al.* 2006). En estos mismos estudios se ha encontrado que la función de *ANT*, de promover la identidad de las células de los pétalos, es independiente de la regulación negativa de *AG* y se relaciona con la activación de los genes de clase B *AP3* (Nole-Wilson *et al.* 2006).

Muchos mutantes afectados en la síntesis de giberelinas presentan defectos en el desarrollo de los órganos florales. Los genes involucrados en la represión de la señalización por giberelinas pertenecen a la familia de proteínas DELLA. Una disminución en la función de estas proteínas restaura el desarrollo de los estambres en mutantes en la vía de biosíntesis de giberelinas. Se ha demostrado que los genes homeóticos *AP3*, *PI* y *AG* aumentan inmediatamente los niveles de expresión en presencia de giberelinas (Yu *et al.* 2004).

4.3.3 Genes homeóticos y tamaño floral

La descripción de los mutantes en genes homeóticos florales tanto en *A. majus* como en *Arabidopsis*, indican variaciones en tamaño de órganos además de los cambios de identidad. Sin embargo, hasta hoy no se conocen los mecanismos por los cuales los genes homeóticos regulan genes blanco que permiten alcanzar órganos florales de tamaño y forma correctos. Por ejemplo el morfoalelo del gen *DEF def101*, sensible a temperatura, además de los cambios homeóticos de la flor tiene un menor tamaño (Zachgo *et al.* 1995).

La pérdida de función de los genes B en *Arabidopsis* causa la pérdida de los órganos del tercer verticilo por ejemplo en el mutante *pi1* (Bowman, Smyth, & Meyerowitz 1991), y la expresión ectópica de *AP3* y *PI* conduce al rescate del número de órganos florales disminuido en los mutantes de clase A y a un aumento en el número de estambres (Krizek & Meyerowitz 1996). Estos resultados sugieren que los genes de clase B ejercen una función doble en la proliferación celular a nivel de órgano y en la formación de primordios.

Como se describió previamente la expresión de los genes de identidad de clase B y C está regulada por *FIM* y *UFO* (*A. majus* y *Arabidopsis*). *UFO* parece tener además efectos sobre el tamaño de los órganos florales, por un lado los mutantes *ufo* presentan variación tanto en número como en tamaño y la expresión ectópica de *UFO* causa el incremento en el tamaño del órgano debido a un aumento en la división celular (Lee *et al.* 1997; Mizukami 2001). El hecho de que la expresión ectópica de los genes de identidad B no provoque incremento en el tamaño del órganos sugiere que el fenotipo de la sobre-expresión de *UFO* se debe a otro factor desconocido (Weiss *et al.* 2005). Esto concuerda con los resultados obtenidos por Ingram *et al.* que sugieren que *FIM* actúa por degradación selectiva de proteínas reguladoras involucradas en controlar la función de genes homeóticos y la división celular (Ingram *et al.* 1997). Otros experimentos demuestran que la pérdida de función de genes que actúan en conjunto con *UFO* interrumpen el desarrollo floral incluyendo pérdida de órganos y arresto del desarrollo del pétalo (Ni *et al.* 2004).

La reducción en la actividad de algunos genes que se requieren para mantener o activar la función C como *POLYPETALA*, en *A. majus*, también presentan un incremento en el número de órganos debido a la presencia de verticilos adicionales de pétalos (Mcstee *et al.* 1998). El incremento en el número de órganos es causado por el mantenimiento de *WUS* en el meristemo floral que en condiciones normales sería reprimido por la función C. *WUS* está además influenciado por muchos otros genes encargados de restringir la acumulación de células en el primordio de los órganos (Lenhard *et al.* 2001; Lohmann *et al.* 2001). El gen *ULTRAPETALA (ULT)*, por ejemplo, parece controlar el tamaño del



meristemo floral a través del control de la expresión de *CLV* y la represión de la actividad de *WUS* (Carles *et al.* 2004), los mutantes *ult* poseen flores con más órganos que las silvestres (Fletcher 2001). El análisis genético de *CLV*, *ULT*, *WUS* y *AG* muestran que *WUS* juega un papel indirecto pero importante en establecer el número de células disponibles para formar el primordio floral en estadios tempranos previos a su inactivación por la función C.

Los genes de identidad de clase A presentes en *Arabidopsis* como *AP2* (Crone & Lord 1994; Kunst *et al.* 1989; Maes, Van Montagu, & Gerats 1999) u otros genes represores de la función C en el perianto, como *LUG* (Liu *et al.* 1995) o *STERILE APETALA (SAP)* (Byzova *et al.* 1999), tienen efectos en la arquitectura de la flor. La expresión ectópica de *AP2* de *Arabidopsis* en petunia incrementa el número de órganos de las flores (Maes *et al.* 1999). Dado que la función A es un regulador negativo de la expresión de *AG*, el cual inhibe *WUS* (Lohmann *et al.* 2001), es posible que el incremento en el número de órganos por la expresión ectópica de *AP2* se deba a la inhibición de *AG* y por lo tanto a un incremento en la actividad de *WUS*. De forma similar se puede analizar la pérdida de órganos observada en las mutantes en la función A que podría ser consecuencia de la represión prematura de *WUS* debido a la expresión ectópica de *AG*.

Los dos genes ortólogos de la función A en *A. majus*, *LIP 1* y *2*, no muestran pérdida de órganos en el doble mutante sin embargo tampoco poseen la actividad cadastral de inhibir la función C en el perianto. Estos dobles mutantes sin embargo fallan en el desarrollo de los labios del pétalo. Las células de los pétalos presentan cambios en la morfología celular respecto a la morfología normal (Glover & Martin 1998; Noda *et al.* 1994). El crecimiento de los órganos de la corola se ve reducido así como los estambres y el estilo, sin embargo los sépalos presentan una tamaño mucho mayor al normal (Keck *et al.* 2003).

A pesar de los efectos observados en los mutantes homeóticos en el tamaño de los órganos florales no se conoce aún el mecanismo por el cual el control de identidad y tamaño intercambian información. El cambio en el número de órganos y verticilos observado en alguno de estos mutantes, sin embargo, parece relacionarse con el tamaño inicial del primordio floral.

5 DIVISIÓN CELULAR, EXPANSIÓN CELULAR Y CRECIMIENTO DE LOS ÓRGANOS

5.1 DIVISIÓN CELULAR

Existen al menos dos maneras de abordar el tema del control del ciclo celular en plantas. Una es la de conocer los genes involucrados y su

correspondiente función como maquinaria general de la regulación del ciclo celular y otra es el análisis de la actividad y/o modalidad del ciclo en el contexto de desarrollo de la planta. Este último enfoque nos permitirá entender las variaciones en la regulación de la actividad del ciclo celular a medida que las células adquieren la identidad correspondiente al órgano que constituyen.

A modo de introducción general cabe destacar que el ciclo celular esta compuesto por cuatro fases secuenciales, la fase G_2 separa la replicación del ADN (Fase S) de la segregación de los cromosomas (Fase M) y la Fase G_1 se interpone entre la Fase M y la Fase S. La actividad del ciclo celular puede modificarse de diversas maneras, las variaciones en la duración de las fases del ciclo conducen a diferencias en la velocidad del mismo. Por otro lado se puede cambiar el período de tiempo durante el cual se mantiene activo, la transición hacia la diferenciación y la posibilidad de endoreduplicación (Jakoby & Schnittger 2004; Mizukami 2001).

Las histonas marcan la fase en la cual se produce replicación de ADN, que corresponde a la Fase S del ciclo celular o a pasos posteriores a la división celular que incluyen la endoploidía somática (Kondorosi, Roudier, & Gendreau 2000).

La regulación en la actividad de los genes relacionados con el ciclo celular depende del estadio de desarrollo de las plantas, de la identidad de los órganos, de la interacción con el entorno y puede provocar variaciones en el tamaño de los órganos. (Meyerowitz 1997; Shpak, Lakeman, & Torii 2003).

La mayoría de los mutantes encontrados en la bibliografía que afectan la división celular, presentan efectos pleiotrópicos a nivel de todos los órganos de las plantas, aunque en algunos casos las respuestas observadas dependen de la identidad de los órganos como es el caso de *CINCINNATA (CIN)*.

Se ha observado que los cambios en la actividad del ciclo celular no siempre tienen consecuencias en el tamaño de los órganos, como es el caso de plantas de tabaco que sobre-expresan las ciclinas *CYCD3* y *CYCD2*. Estos mutantes presentan una disminución en la duración de la fase G_1 y por lo tanto el ciclo celular es más corto, provocando un crecimiento acelerado y un florecimiento temprano sin observarse cambios en el tamaño ni en el número de entrenudos y hojas y tampoco se producen variaciones a nivel del tamaño de los primordios (Cockcroft *et al.* 2000).

Existen ejemplos sin embargo de una relación directa entre variaciones en la actividad del ciclo celular y el tamaño de los órganos como es el caso de los mutantes en *AINTEGUMENTA (ANT)*, que participan en el mantenimiento de la capacidad de división celular, en los que se observan tanto hojas como flores de tamaños reducidos y pérdida en el número de órganos que componen los tres primeros verticilos de la flor (Mizukami & Fischer 2000). Entre los diferentes fenotipos descritos de diferentes alelos, los mutantes presentan además cambios



en la identidad de los órganos florales, principalmente en el desarrollo del óvulo. Los análisis de expresión muestran que *ANT* se expresa en los primordios de todos los órganos laterales (Elliott *et al.* 1996; Klucher *et al.* 1996). La expresión ectópica de *ANT* en *Arabidopsis* causa un incremento en el tamaño de los órganos de las flores debido a un aumento en la división celular en sépalos y a la expansión celular en los tres verticilos internos (Krizek 1999a). Estudios posteriores realizados por Mizukami y Fischer, (2000) demostraron que la variación en el tamaño de los órganos florales por la expresión ectópica de *ANT* se debía principalmente a un incremento en el número de células y asignaron esta diferencia a un mayor período de proliferación celular (Mizukami *et al.* 2000).

Las auxinas juegan un papel fundamental en el establecimiento de los primordios y la expansión de los órganos laterales. El gen *ARGOS* fue identificado en experimentos de *microarrays* estudiando el efecto del tratamiento con la auxina ácido naftalenacético (ANA) en raíces de *Arabidopsis* (Hu, Xie, & Chua 2003). Su expresión no está destinada solo a las raíces, se ha detectado en los tallos, las rosetas y las flores. La manipulación de la expresión de *ARGOS* por antisentido y sobre-expresión muestran que juega un papel importante en el crecimiento de las plantas en general, cuando es silenciado se producen órganos más pequeños en la parte aérea de la planta incluyendo hojas, flores y frutos. La sobre-expresión provoca incremento de tamaño de todos los órganos. El análisis detallado de las plantas 35S::*ARGOS* indica que el aumento en el tamaño de los órganos se deben a un mayor período de proliferación, junto con un aumento en los niveles de expresión de *ANT*. Por otro lado se observa que el efecto de 35S::*ARGOS* se anula en los mutantes *ant-1*. Ambos resultados indican que *ARGOS* actúa a través de la activación de *ANT* (figura 9). Otros estudios muestran que *ARGOS* actúa aguas abajo de algún gen relacionado con las auxinas dado que su expresión ectópica restaura parcialmente el desarrollo de los órganos en los mutantes en el gen *AUXIN RESISTANT (AXR1)*. El mutante *axr1* posee hojas, inflorescencias y órganos florales más pequeños debido a una disminución en el número de células (Lincoln, Britton, & Estelle 1990). Estos resultados sugieren que las auxinas pueden promover el crecimiento en general a través de la vía de *ARGOS* y *ANT* controlando la actividad del ciclo celular (Weiss *et al.* 2005). El gen *AUXIN RESPONSE FACTOR2 (ARF2)*, restringe la proliferación celular probablemente por la vía de *ANT* y los mutantes *arf2* además de presentar defectos en el tamaño de los órganos provocan cambios pleiotrópicos incluyendo retraso en la senescencia y crecimiento floral defectuoso (Anastasiou & Lenhard 2007b). Las auxinas se relacionan además con otros genes involucrados en el control del tamaño de los órganos de las plantas. Los genes *E2FA* y *B* inducidos por auxinas estimulan la proliferación celular por un incremento en la velocidad del ciclo disminuyendo el tamaño de las células y afectando el fenotipo de raíces,

cotiledones y hojas (Magyar et al. 2005; Sozzani et al. 2006). La proteína EBP1, también regulada por auxinas, es capaz de incrementar el crecimiento de los órganos promoviendo la división celular, reduciendo los niveles mínimos de volumen celular requeridos para la proliferación celular, acortando el período meristemático y promoviendo la expansión celular post-mitótica (Horvath et al. 2006). La proteína de unión a auxinas ABP1 (Hertel, Russo, & Thomson 1972; Lobler & Klambt 1985) que participa tanto en la expansión celular (Chen et al. 2001b; Chen et al. 2001a; Jones et al. 1998) como en la división celular. Tiene un papel crítico en la regulación del ciclo celular, actúa en las transiciones G₁/S y G₂/M y su pérdida de función provoca la detención del ciclo celular (David et al. 2007). Además se han descrito otras proteínas controladas por auxinas y que intervienen en la actividad del ciclo celular como por ejemplo KRP2 (David et al. 2007; Himanen et al. 2002)

También se observa variación en el tamaño de los órganos por cambios en el número de células mediada por el gen *ERECTA* (*ER*) (Torii et al. 1996). Esta proteína pertenece a una familia con funciones redundantes y la pérdida de función de la familia completa confiere un fenotipo que afecta el tamaño de todos los órganos laterales, formando flores con menor número de órganos sin pedicelos y con órganos más pequeños y defectuosos, estos genes parecen promover la proliferación celular a través de un mecanismo diferente al que media *ANT* (Shpak et al. 2004). Estudios en mutantes de pérdida parcial de *ER* han encontrado un gen, *YUCCA5*, putativa monooxigenasa, cuya sobre-expresión suprime la mutación *er-103*. Los análisis fenotípicos y celulares de estos mutantes indican que tanto auxinas como *ER* regulan la división y expansión celular por vías independientes pero solapantes durante la elaboración de la arquitectura de la inflorescencia (Woodward et al. 2005). La mutación *erecta* cosegrega con un QTL que afecta el tamaño floral sugiriendo su importancia en el control del tamaño floral en *Arabidopsis* (Juenger, Purugganan, & Mackay 2000). El mutante en el gen *REVOLUTA/INTERFASCICULAR FIBERLESS1*, de *Arabidopsis*, cuyos períodos de proliferación se prolongan respecto al silvestre también causa mayor elongación en hojas y flores y tallos más grandes (Talbert et al. 1995).

El gen *JAG* pertenece a una familia de factores de transcripción con dominios (dedos de Zn) de unión a ADN, se expresa en todos los órganos y parece promover el crecimiento de los órganos laterales a través del mantenimiento de la división celular. El mutante *jag-1* posee pétalos y sépalos más angostos y cortos que los silvestres. El lóbulo distal de los pétalos está reducido o ausente y prácticamente no presenta células cónicas. Los estambres tienen un filamento normal con anteras de morfología alterada y poca producción de polen, los carpelos son relativamente normales. Por lo tanto este gen es requerido para la formación apropiada de los órganos laterales, particularmente el



desarrollo de las regiones distales de sépalos, pétalos y estambres (Dinneny *et al.* 2004). La actividad de *JAG* es comparable a la de *ANT* dado que mantiene la división celular sin embargo la sobre-expresión de *JAG* no conduce a un aumento en el tamaño de los órganos sino la aparición de hojas en el lugar de las flores, esto sugiere que *JAG* y *ANT* no actúan en la misma vía de regulación (Weiss *et al.* 2005). Este gen parece ejercer su función en una vía paralela a *AS1* y *AS2* reprimiendo los genes encargados de determinar los límites en sépalos y pétalos (*PTL*, *RABBIT EAR* y *CUC1 y2*) (Xu *et al.* 2008). El gen *NUBBIN* (*NUB*) (Dinneny, Weigel, & Yanofsky 2006) parece tener función redundantes con *JAG* en estambres y carpelos. Está relacionado con el mantenimiento de la división celular en el margen de los órganos laterales y es capaz de activar el crecimiento por expresión ectópica. Ambos genes estarían encargados de controlar eventos morfogénicos durante el crecimiento de los órganos laterales que resulta esencial para determinar la forma final de los órganos (Dinneny *et al.* 2004; Dinneny *et al.* 2006).

Recientemente se ha aislado un gen responsable de controlar el crecimiento de los órganos de las plantas incluyendo las flores, *BIG BROTHER* (*BB*), en *Arabidopsis* (Disch *et al.* 2006). Este gen codifica para una proteína que contiene un dominio RING-finger, estas proteínas actúan como ligasas E3 de la ubiquitina y participan en la cascada de ubiquitinación. La ausencia de ARNm de *BB* produce sépalos y pétalos más largos, estambres más anchos y ocasionalmente un gineceo también más largo comparados con la planta silvestre. Cuando se expresan los niveles normales los fenotipos observados son comparables al silvestre y la sobre expresión conduce a una disminución en el tamaño de pétalos y sépalos así como del espesor de los estambres, en estos casos también se presenta una reducción en el tamaño de las hojas. En general estos efectos están relacionados con una variación en el número de células de tamaño normal. Los análisis muestran que *BB* limita el crecimiento del órgano restringiendo la extensión del período de proliferación celular. Las proteínas *BB* parecen estar presentes en tejidos en división, no se inducen en presencia de fitohormonas, son degradadas rápidamente mediante la acción del proteosoma y parece actuar en una vía independiente de *ANT* y *JAG* (ver más adelante). Por el contrario el gen *KLUH* (*KLU*) estimula el crecimiento de los órganos de las plantas previniendo el arresto de la división celular, por una vía independiente de fitohormonas. Tanto los mutantes simples así como una expresión controlada conducen a diferencias en el tamaño de los órganos (Anastasiou *et al.* 2007a)

Las giberelinas tienen también un papel fundamental en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Trabajos recientes han mostrado que las proteínas DELLA son cruciales para provocar el arresto del crecimiento frente a condiciones adversas (Anastasiou *et al.* 2007b).

Además de los controles directos de los puntos clave de regulación del ciclo celular se ha encontrado un gen involucrado en el control de la actividad del ciclo celular a nivel específico de órgano. El gen *CINCINNATA* (*CIN*) parece promover la detención de la división celular en hojas para evitar malformaciones, sin embargo podría tener el efecto opuesto en pétalos donde promueve el crecimiento celular (Crawford *et al.* 2004; Nath *et al.* 2003). Un aspecto interesante del trabajo realizado por Crawford *et al.* (2004) es que el alelo débil *cin-628* tienen sólo efecto en las células cónicas de los pétalos pero no provoca cambios a nivel de las hojas. Otros trabajos muestran que los genes *JAW*, cuyos mutantes presentan fenotipos similares a los mutantes *cin*, codifican para un miARN que regula *TCP4*, un gen altamente relacionado a *CIN*. Estos resultados sugieren que el control sobre *CIN* y sus ortólogos es importantes en la morfología de las plantas (Palatnik *et al.* 2003)

La regulación del crecimiento por la proliferación celular parece actuar principalmente en la duración del crecimiento, extendiendo o limitando el período de proliferación celular más que la velocidad de crecimiento. Potencialmente, el crecimiento ocurre a la velocidad máxima posible bajo las condiciones ambientales dadas, de tal forma que los cambios en el tamaño de los órganos se producen por variaciones en el período de crecimiento (Anastasiou *et al.* 2007b)

En resumen según lo detallado se puede inferir que los genes involucrados en la regulación del ciclo celular influyen en el tamaño de los órganos de las plantas. Los efectos son en general pleiotrópicos y las vías de acción en algunos casos pueden interactuar con la regulación mediada por fitohormonas.

5.2 EXPANSIÓN CELULAR

Cuando se producen cambios en la expansión celular tanto durante o después de la proliferación celular, se afectan aspectos de crecimiento de la pared celular. Esto incluye diferencias en la presión interna de la célula; en eventos biosintéticos (componentes del citosol, de la pared celular y del núcleo); en los componentes del citoesqueleto (microtúbulos y filamentos de actina) y en los procesos de vacuolación que se presentan una vez que la célula ha abandonado el meristemo (Andrew 2006; Bannigan & Baskin 2005). Los órganos de las plantas alcanzan su tamaño adecuado gracias a un control de la división y la expansión celular y una coordinación de ambos con los procesos de desarrollo y diferenciación celular.

El proceso de expansión celular que se produce durante el ciclo celular (fases G_1 y G_2) y después que las células cesan la división es también responsable del crecimiento de los órganos. El evento limitante es el intercambio insuficiente de nutrientes, cuando las células se expanden el cociente superficie/volumen



disminuye y por lo tanto el intercambio de nutrientes y deshechos con el exterior se reduce provocando la detención del crecimiento. Sin embargo este problema puede solucionarse mediante un cambio en la forma celular manteniendo el volumen o aumentando la extensión de la membrana plasmática que rodea a la vacuola, tonoplasto, capaz de producir intercambio molecular (figura 8) (Kondorosi *et al.* 2000). Entre los mutantes que afectan el tamaño celular se encontraron genes relacionados con la biosíntesis de la pared celular y otros involucrados en la percepción de hormonas como brasinosteroides, giberelinas y etileno.

Existen algunos ejemplos que evidencian una relación directa entre la morfología celular y la morfología final de los órganos. El gen *ROTUNDIFOLIA* (*ROT*) de *Arabidopsis* codifican para un citocromo P450 que parece funcionar de forma específica en la elongación polar de las células de las hojas, exclusivamente en la dirección del eje longitudinal (Kim, Tsukaya, & Uchimiya 1998b). Una sobre-expresión de este gen produce un cambio en la morfología de la hoja que se elonga más que una silvestre pero mantiene el mismo ancho. Los dobles mutantes de *rot3* y otro gen relacionado con los citocromos presentan fenotipos enanos similares a los provocados por los mutantes defectuosos en la biosíntesis de brasinosteroides. Los análisis bioquímicos revelan que *ROT3* participa en la activación de un paso de la biosíntesis de BR (Kim *et al.* 2005). Los mutantes en un gen que afecta también la elongación pero en sentido transversal, *ANGUSTIFOLIA* (*AM*), produce células mas angostas y hojas mas angostas (Folkers *et al.* 2002; Kim *et al.* 2002).

El tamaño final de las células de las plantas se relaciona en forma directa con el tamaño del núcleo que depende del contenido de ADN, este fenómeno se corresponde con lo observado en levaduras y animales, sin embargo, en estos últimos, los cambios a nivel celular no se reflejan a nivel de órgano cuyo tamaño es determinado por la masa total (Kondorosi *et al.* 2000; Mizukami 2001).

5.2.1 Endorreduplicación

La endopoliploidía se define como la aparición de diferentes niveles de ploidía dentro de un organismo generado tanto por endorreduplicación en plantas como por endomitosis en animales. Este fenómeno es muy frecuente en plantas, pero sólo se ha encontrado en angiospermas.

Durante el desarrollo de las plantas las células del SAM que cesan su actividad meristemática y por lo tanto dejan de dividirse, continúan incrementando su tamaño durante la diferenciación mediante diferentes alternativas (figura 8).

Como se mencionó anteriormente el incremento en el contenido del ADN genómico aumenta el volumen celular posiblemente debido a un aumento en la actividad metabólica, síntesis de ARNr y actividad transcripcional que posibilitan el crecimiento y expansión celular. Esto fue corroborado molecularmente en levaduras con niveles crecientes de ploidía.

Las células poliploides son el resultado de la endoploidía somática es decir, ciclos repetitivos de duplicación del genoma (endorreduplicación) en ausencia de mitosis, el patrón de endopoliploidía es heredado y transmitido de generación en generación para una dada especie (figura 8).

La mayoría de las especies generan células poliploides en todos los tipos celulares (Kondorosi *et al.* 2000). Por ejemplo en el caso de *Arabidopsis* los niveles de ploidía varían entre 4C y 32C y los análisis morfométricos revelan una relación directa entre el tamaño celular y el contenido de ADN genómico (Galbraith, Harkins, & Knapp 1991). Este proceso, sin embargo, no es indispensable para el incremento en el volumen celular dado que por ejemplo en las células guarda de *Arabidopsis* la células se expanden pero mantienen el nivel de ploidía 2C (Melaragno, Mehrotra, & Coleman 1993). Por otro lado el aumento en los niveles de ploidía no necesariamente provoca un cambio en el tamaño de los órganos según lo que se observa cuando se induce la endoreduplicación por sobre-expresión de los genes *CDC6* (Castellano *et al.* 2001).

La regulación de la endoreduplicación a lo largo del desarrollo podría ser empleado como control de la expansión celular post-mitótica y por lo tanto del tamaño final de los órganos, esto lo demuestran los mutantes de *Arabidopsis* en los genes *FRL1*, cuyos pétalos son mas grandes debido a una endoreduplicación anormal en la región distal. Otro ejemplo se presenta en mutantes deficientes en Giberelinas que reducen la endoreduplicación normal que se presenta en las hojas y por ende producen hojas más pequeñas, esto sugiere que la endoreduplicación puede ser un factor determinante del tamaño final de los órganos (Mizukami 2001).

En relación con el tejido de los pétalos en *Arabidopsis* no se ha observado endoreduplicación, sin embargo en repollo parece ser un mecanismo común de control del tamaño celular (Kudo & Kimura 2001).

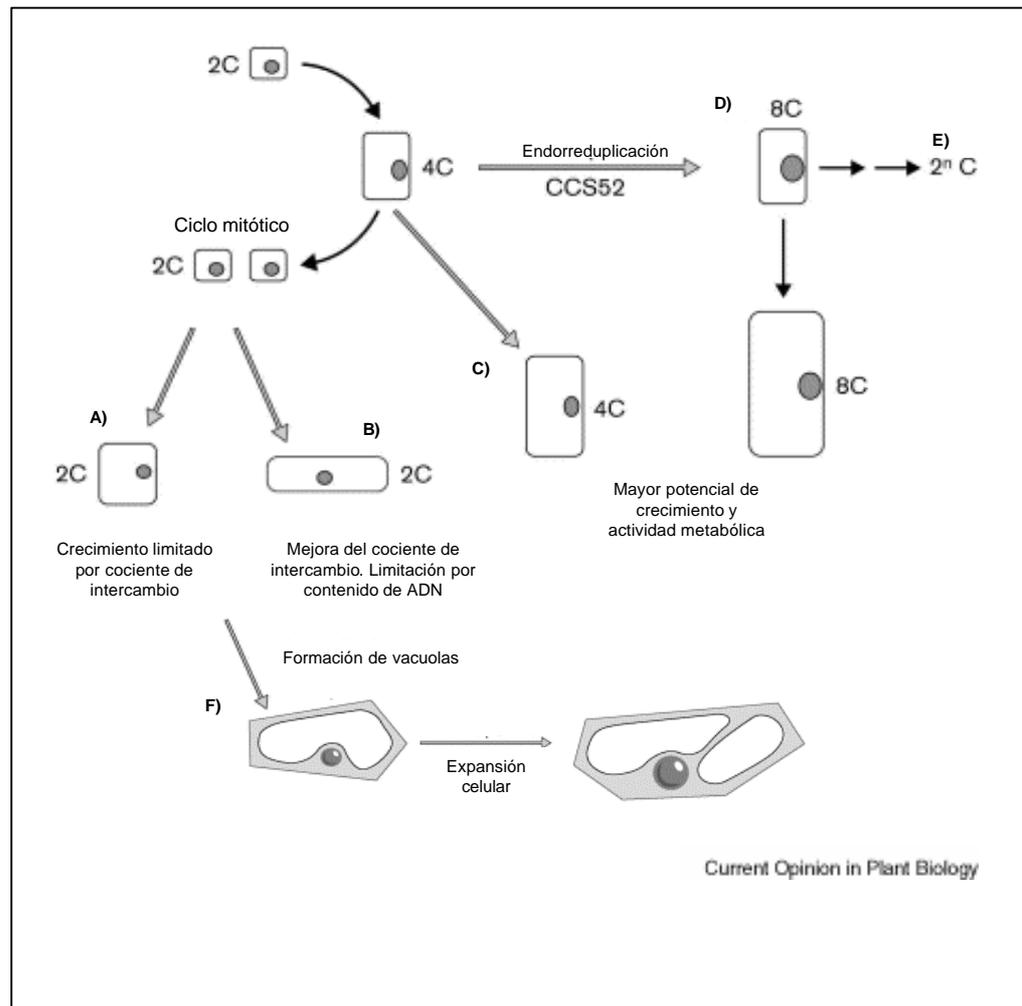


Figura 8: Opciones de crecimiento celular durante la diferenciación.

Las señales externas e internas (flechas grises) inducen la terminación del ciclo mitótico tanto en las fases G1 o G2 con un contenido de ADN de 2C o 4C respectivamente, siendo C el contenido haploide de ADN. Posteriormente las células crecen de forma A) isotrópica o B) anisotrópica. El potencial de crecimiento de las células C) 4C es mayor que el de las células A y B) 2C. Un cambio en el ciclo celular, que involucra la proteína CCS52, dirige las células hacia la endoreduplicación D) La duplicación del genoma (8C) aumenta el potencial de crecimiento y la extensión de la elongación celular. E) La repetición de endociclos conduce a mayores amplificaciones del genoma. F) Existe un segundo mecanismo de expansión a través de la formación y aumento de tamaño de las vacuolas. Ambos procesos se combinan para determinar el tamaño final de las células. Figura modificada de Kondorosi *et al.* y Sugimoto-Shirasu and Roberts (Kondorosi *et al.* 2000; Sugimoto-Shirasu & Roberts 2003).

Se han realizado estudios en el desarrollo de nódulos fijadores de nitrógeno de *Medicago truncatula*, los que requieren la endoreduplicación para la diferenciación de las células simbióticas. Estos han demostrado que existe un estricto control genético que regula el cambio desde el ciclo mitótico a los endociclos que generan células poliploides. La regulación está relacionada con el

control de la ubiquitinación y degradación de proteínas involucradas en la división celular (Vinardell *et al.* 2003). Estudios de ARN antisentido, en *M. sativa* y *M. truncatula* muestran que *Ccs52A* parece estar directamente relacionado con los ciclos de endoreduplicación. Esta proteína es homóloga a la proteína *Cdh1* de levaduras involucrada en la regulación de la actividad del complejo promotor de la anafase (APC), un regulador de la ubiquitin protein ligasa, que media la degradación mitótica de ciclinas (figura 8) (Kondorosi & Kondorosi 2004). La entrada a los endociclos se ve afectada también por las fitohormonas: el etileno induce una vuelta adicional de endoreduplicación mientras las giberelinas tienen un efecto global positivo y afectan la elongación celular dependiendo de la concentración de hormonas. En los hipocótilos de *Arabidopsis* se observó que la luz también ejerce un efecto negativo en los endociclos (Kondorosi *et al.* 2000).

5.2.2 Relación de la expansión celular con el control del tamaño de los órganos florales

Como se describió anteriormente las plantas incrementan el volumen celular por mecanismos que incluyen la vacuolación, aumentando el volumen celular sin cambios en el del citoplasma, y la endoreduplicación (Joubes & Chevalier 2000).

Se han descrito mutantes que afectan la formación de la pared celular de manera global y conducen a cambios pleiotrópicos que afectan también a las flores. Esto sugiere que la expansión celular es importante para que los órganos completen su desarrollo y función. Por ejemplo las mutaciones en *ECTOPIC LIGNIFICATION 1 (ELI1)* que impiden la lignificación y la expansión celular muestran efectos pleiotrópicos incluyendo menor tamaño floral (Caño-Delgado, Metzlauff, & Bevan 2000). El mutante *FRAGILE FIBERS 2 (FRA2)* que presenta defectos en el largo de las fibras de celulosa también tiene efectos pleiotrópicos con hojas y flores más cortas y más anchas (Burk *et al.* 2001; Burk & Ye 2002).

Sin embargo en algunos trabajos se han descrito mutantes que afectan de forma específica el tamaño de los órganos florales. Estudios de ARN antisentido en petunia disminuyendo la actividad de la expansina 1 (*phEXP1*) que se expresa de forma específica en la zona lobular de los pétalos, demuestran que *PhEXP1* influye en la cantidad de celulosa cristalina de la pared celular. Este fenómeno afecta la expansión, área y forma celular, provocando reducción en el tamaño del limbo de los pétalos (Zenoni *et al.* 2004). Otra proteína relacionada con la biosíntesis de la pared celular en *Gerbera hybrida* también provoca cambios a nivel de órganos florales. La expresión ectópica del gen *GEG*, cuya expresión es específica de corola y estilo provoca una menor elongación de la corola y los carpelos (Kotilainen *et al.* 1999).

Trabajos recientes en *Arabidopsis* han aislado un gen, *BIG PETALp (BPEp)*,



relacionado con el control específico del tamaño de los pétalos mediante la restricción del tamaño celular que actúa aguas abajo de los genes de identidad floral. Los mutantes con pérdida de función poseen flores con pétalos más grandes, sin embargo la morfología celular se mantiene, los demás órganos de la flor mantienen el tamaño y morfología normal (Szecsi *et al.* 2006). En pimiento se ha encontrado un gen con alta homología a *BPep*, *Upa20*, también relacionado con la expansión celular cuya inducción en *Nicotiana benthamiana* y otras solanáceas provocan hipertrofia en hojas (Kay *et al.* 2007). En relación con las fitohormonas los mutantes *gal1-3* presentan una reducción en el tamaño de los estambres y gineceos de las flores en *Arabidopsis* debido a una reducción en la elongación celular, sin embargo, como en la mayoría de mutantes en vías hormonales el efecto de esta mutación es pleiotrópico y afecta diversos aspectos del desarrollo de las plantas (Cheng *et al.* 2004).

En la figura 9 se representan algunos de los genes que participan en la regulación del tamaño floral a lo largo de los diferentes estadios de desarrollo de la planta.

5.3 MECANISMOS DE COMPENSACIÓN

El análisis de los mutantes y experimentos de transformación en plantas muestran que los cambios en el tamaño de los órganos pueden atribuirse a un incremento o disminución en el número o tamaño de las células o una combinación de ambas. Sin embargo los cambios en la actividad del ciclo celular no siempre se correlacionan en forma directa con el tamaño del órgano debido a compensaciones entre número y tamaño de células. En cereales por ejemplo, cuando el ciclo celular se interrumpe por radiación gamma el incremento en el tamaño celular compensa los cambios, de tal manera que se producen hojas morfológicamente normales. Ambos procesos son capaces de compensar al otro en caso de fallas, sin embargo los mutantes que interrumpen tanto en la división como la expansión celular producen efectos aditivos con defectos en el desarrollo (Doonan 2000)

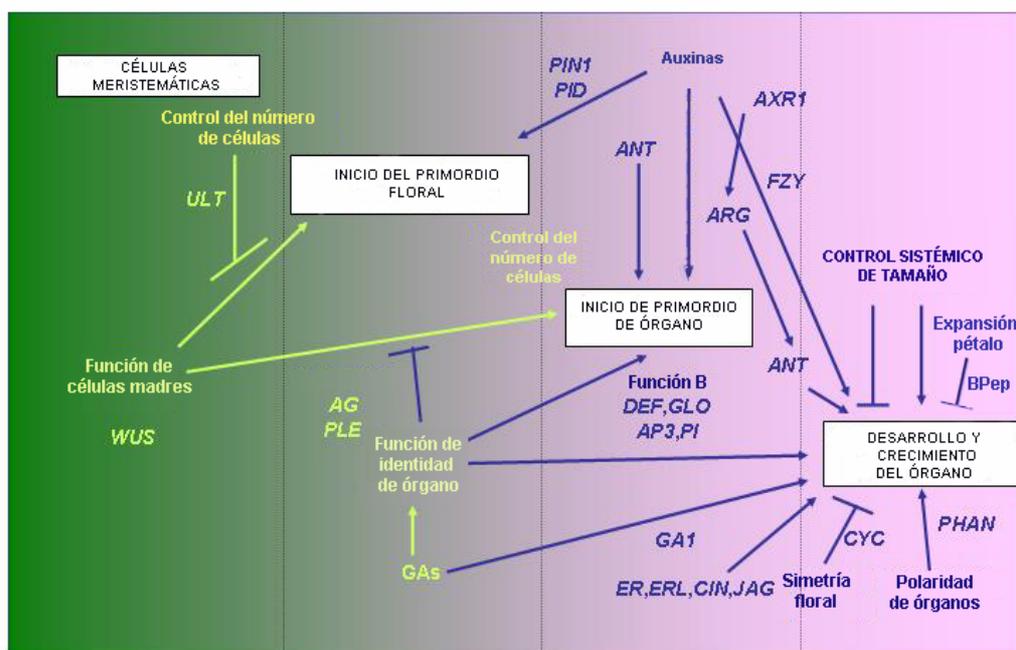


Figura 9: Modelo que describe los eventos de algunos de los genes conocidos que afectan el tamaño floral y sus proporciones.

Figura extraída y modificada de Weiss et al (2005) (Weiss et al. 2005).

Existen muchos estudios que reportan que la reducción en el número de células conduce a un incremento en el volumen celular. Los cambios a nivel celular de incremento o disminución de volumen han presentado evidencias de inducir cambios compensatorios en el número de células (Tsukaya 2003). Como se describió anteriormente en la regulación negativa de *cdc2* en tabaco y en los mutantes *ant* de *Arabidopsis* la reducción del número de células conduce a un incremento en el volumen celular. Se han elaborado diferentes teorías respecto a la regulación y/o coordinación entre división y expansión celular y su relación con el control del tamaño final de los órganos. La mayoría de los ejemplos descritos en la bibliografía se relacionan con el estudio de mutantes y plantas transgénicas que presentan variaciones a nivel de tamaño de hojas y tallos de las plantas, existiendo pocos análisis respecto del tamaño de los órganos florales. Las teorías al respecto consideran comportamiento extremos en los cuales o bien el control de tamaño y forma celular está directamente relacionado con el tamaño y morfología del órgano (teoría celular), o que existe un mecanismo global que especifica la forma final del órgano independientemente de la influencia genética en la forma y tamaño de las células y en la extensión y orientación de la división celulares. Tsukaya propuso una nueva teoría celular en la cual se considera a la célula como la unidad morfogenética, y que cada célula es a su vez controlada por



factores que gobiernan la morfogénesis del órgano al que pertenece (Tsukaya 2002; Tsukaya 2003). Esta teoría está de acuerdo con la presencia de mecanismos de compensación, se ha postulado recientemente por Horiguchi et al, 2006 que los mecanismos de compensación pueden ser la consecuencia de una coordinación entre la expansión y la proliferación celular de tal manera que debería existir un nivel basal mínimo de células por debajo del cual se dispara el mecanismo de compensación, lo que justificaría la ausencia de compensación que se observa en algunos fenotipos descritos. El gen *TANGLED* (*TAN*) en maíz tiene una división celular aberrante sin embargo la morfología de la hoja es prácticamente normal, el gen *SHORT AINTEGUMENTA 2* (*SIN2*) produce una reducción del número de células en el integumento externo del óvulo pero la morfología total es relativamente normal. Aún así la combinación de mutaciones que afectan la expansión celular, como *sin1*, con mutaciones que afectan la división como *sin2* sí causan defectos severos en el desarrollo (Doonan 2000)

El gen *ANGUSTIFOLIA3* (*AN3*), también presenta mecanismos de compensación en mutantes simples que reducen el período de proliferación celular y por lo tanto aumentan el volumen de las células (Horiguchi, Kim, & Tsukaya 2005). La sobre-expresión de este gen, aunque produce cambios en el tamaño de las hojas por incremento en el número de células no presenta variaciones a nivel de expansión celular (Horiguchi et al. 2005). Existen evidencias de que *AN3* actúa junto con los genes *GROWTH REGULATING FACTOR* (*GRF*), controlando la elongación longitudinal de las hojas a través de la proliferación celular (Busov, Brunner, & Strauss 2008). Estos genes constituyen una familia de factores de transcripción en plantas con función redundantes y son inducidos por giberelinas (Busov et al. 2008)

Se ha descrito también que la regulación del ciclo celular y la expansión celular puede solaparse con la vía mediada por las auxinas a través de un miembro de la familia *YUCCA* (Woodward et al. 2005).

Según lo descrito hasta el momento sobre el control de tamaño de los órganos de las plantas se deduce que los mecanismos que controlan el tamaño final de un organismo involucran la coordinación de la división y la expansión celular. Aunque es evidente la necesidad de integración y regulación de ambos en el contexto de desarrollo de los órganos no existen evidencias claras al respecto. El gen *KLU*, recientemente aislado parece participar en una vía nueva de control que, se postula, podría intervenir en el mantenimiento de la división celular hasta que el primordio alcanza un tamaño determinado (Anastasiou et al. 2007a).

Se plantea que el crecimiento de la planta y la determinación del tamaño final de los órganos es un proceso modular, se produce a lo largo de todo el ciclo de vida de la planta en respuesta a patrones intrínsecos de desarrollo y a las condiciones del entorno (Doonan 2000). Existe una amplia información obtenida a

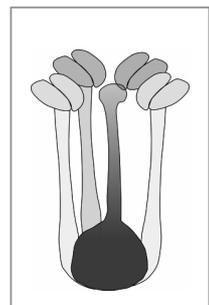
partir de *Arabidopsis* por clonado y análisis genético de mutantes en genes que provocan variaciones en el tamaño y crecimiento de los órganos, sin embargo en la mayoría de los casos la información referida a la descripción de las flores es escaso.

Para un detalle bibliográfico de los genes que afectan al tamaño floral ver la Tabla 1 modificada de Weiss, J *et al.* (Weiss *et al.* 2005).

**Tabla 1:** Genes que afectan el tamaño y la arquitectura floral en dicotiledóneas.

| Gen | Especie | Referencia |
|--|------------------------------|---|
| ARQUITECTURA FLORAL | | |
| Aumento del número de órganos | | |
| CLAVATA 1, 2 and 3 | <i>Arabidopsis</i> | (Clark, Running, & Meyerowitz 1993; Fletcher et al. 1999; Kayes & Clark 1998)8) |
| ULTRAPETALA | <i>Arabidopsis</i> | (Fletcher 2001) |
| WIGGUM | <i>Arabidopsis</i> | (Running, Fletcher, & Meyerowitz 1998) |
| CYCLOIDEA | <i>A. majus</i> | (Luo et al. 1996) |
| JAGGED | <i>Arabidopsis</i> | (Dinneny et al. 2004; Ohno et al. 2004)4) |
| Aumento en el número de órganos-Control de la función C | | |
| AGAMOUS, PLENA | <i>Arabidopsis, A. majus</i> | (Bowman et al. 1989; Bradley et al. 1993)3) |
| POLYPETALA | <i>A. majus</i> | (McSteen et al. 1998)8) |
| Cambio en el número relativo de órganos | | |
| PLURIPETALA | <i>Arabidopsis</i> | (Running et al. 2004) |
| SUPERMAN | <i>Arabidopsis</i> | (Huang, H. and Ma, H. 1997; Jacobsen, S. E. and Meyerowitz, E. M. 1997) |
| PERIANTHIA | <i>Arabidopsis</i> | (Chuang et al. 1999; Running & Meyerowitz 1996)6) |
| ETTIN | <i>Arabidopsis</i> | (Sessions et al. 1997) |
| Disminución en el número de órganos | | |
| WUSCHEL | <i>Arabidopsis</i> | (Laux et al. 1996; Mayer et al. 1998)8) |
| STRUWELPETER | <i>Arabidopsis</i> | (Autran et al. 2002)a) |
| DEFICIENS | <i>A. majus</i> | (Sommer et al. 1990) |
| LEUNIG | <i>Arabidopsis</i> | (Liu et al. 1995) |
| STERILE APETALA | <i>Arabidopsis</i> | (Byzova et al. 1999) |
| APETALA2 | <i>Arabidopsis</i> | (Crone, W. and Lord, E. M. 1994, Kunst, L. et al. 1989, Maes, T. et al. 1999) |
| PIN FORMED-1 | <i>Arabidopsis</i> | (Bennett et al. 1995; Okada et al. 1991)1) |
| PINOID | <i>Arabidopsis</i> | (Bennett et al. 1995) |
| FLOOZY | <i>Petunia</i> | (Tobeña-Santamaría, R. et al. 2002) |
| AINTEGUMENTA | <i>Arabidopsis</i> | (Elliott et al. 1996; Klucher et al. 1996)6) |
| FILAMENTOUS FLOWER | <i>Arabidopsis</i> | (Chen et al. 1999; Sawa et al. 1999)9) |
| SKP | <i>Arabidopsis</i> | (Ni et al. 2004) |
| UNUSUAL FLORAL ORGANS | <i>Arabidopsis</i> | (Durfee et al. 2003) |
| Aumento en el tamaño del órgano floral | | |
| FORMOSA | <i>A. majus</i> | (Delgado et al. no publicado) |
| GRANDIFLORA | <i>A. majus</i> | (Delgado et al. no publicado) |
| SPLENDIDA | <i>A. majus</i> | (Delgado et al. no publicado) |
| 35S::ARGOS | <i>Arabidopsis</i> | (Hu et al. 2003) |
| 35S::AINTEGUMENTA | <i>Arabidopsis</i> | (Krizek 1999a; Mizukami et al. 2000)0) |
| 35S::UFO | <i>Arabidopsis</i> | (Lee et al. 1997) |
| KLUH | <i>Arabidopsis</i> | (Anastasiou et al. 2007a) |
| UPA20 | <i>Nicotiane benthamiana</i> | (Kay et al. 2007) |
| Disminución del tamaño del órgano floral | | |
| LIPLESS | <i>A. majus</i> | (Keck et al. 2003) |
| CINCINNATA | <i>A. majus</i> | (Crawford et al. 2004) |
| ERECTA and ERECTA-LIKE | <i>Arabidopsis</i> | (Shpak et al. 2004) |
| AIBRAHMA | <i>Arabidopsis</i> | (Farrona et al. 2004) |
| ECTOPIC LIGNIFICATION 1 | <i>Arabidopsis</i> | (Caño-Delgado et al. 2000) |
| FRAGILE FIBERS 2 | <i>Arabidopsis</i> | (Burk et al. 2002) |
| EXPANSIN | <i>Petunia</i> | (Zenoni et al. 2004) |
| GIBBERELLIC ACID 1 | <i>Arabidopsis</i> | (Olszewski, Sun, & Gubler 2002) |
| AUXIN RESISTANT1 | <i>Arabidopsis</i> | (Leyser et al. 1993) |
| KTANA | <i>A. majus</i> | (Delgado et al. no publicado) |
| NITIDA | <i>A. majus</i> | (Delgado et al. no publicado) |
| BIGPETAL | <i>Arabidopsis</i> | (Szecsi et al. 2006) |
| BIGBROTHER | <i>Arabidopsis</i> | (Disch et al. 2006) |
| GEG | <i>Gerbera hybrida</i> | (Kotilainen et al. 1999) |
| PROPORCIONES FLORALES | | |
| COMPACTA | <i>A. majus</i> | (Delgado et al. no publicado) |
| COMPACTA ÁHNLICH | <i>A. majus</i> | (Delgado et al. no publicado) |
| UNILABIATA | <i>A. majus</i> | (Delgado et al. no publicado) |
| OVATE | <i>Tomate</i> | (Liu et al. 2002b) |

MATERIALES Y MÉTODOS





II MATERIALES Y MÉTODOS

1 MATERIAL VEGETAL

Se utilizaron plantas cultivadas en invernadero analizándose las poblaciones F_2 obtenidas por cruces manuales mediante emasculación con una pinza fina y el depósito del polen de las plantas donantes en el pistilo receptor.

Las líneas silvestres utilizadas fueron Sippe50 (Schwarz-Sommer, *et al.*, 2003 ; Stubbe, 1966) y 165E (Sommer & Saedler, 1986) proporcionadas por la Dra. Zsuzsanna Schwarz-Sommer. La línea Sippe50 fue descrita por primera vez a principios de 1920 mientras la línea 165E fue construida en 1986. Desde entonces han sido mantenidas por auto polinización y son consideradas isogénicas.

Los mutantes analizados fueron aislados entre 1898 y 1974, forman parte de la colección de *A. majus* de Gatersleben y han sido previamente descritos por Stubbe (Stubbe, 1966), encontrándose en el fondo genético Sippe50.

Los análisis posteriores de cada uno de los mutantes se realizaron a partir de poblaciones F_2 de cruces con el silvestre 165E.

2 CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Las semillas de *A. majus* se hicieron germinar en vermiculita fina y se las transplantó después de aproximadamente dos semanas a macetas o bandejas con una mezcla de 1:1:1:1:0.25 de vermiculita, perlita, turba, fibra de coco y abono de ovejas. Se realizó riego automático con períodos variables dependiendo de la estación del año.

3 ENSAYOS DE HACINAMIENTO

Los ensayos de hacinamiento se realizaron transplantando las plantas, que habían crecido durante dos semanas, en macetas de 650ml disponiendo 1, 5 y 10 plantas por macetas. Los parámetros a analizar se determinaron cuando el 100% de las plantas control habían florecido. En las condiciones más extremas de hacinamiento muchos individuos no alcanzaron a florecer y fueron descartados para realizar las mediciones.

Los parámetros determinados fueron los siguientes:

- Número de hojas: contadas como el número de entrenudos producidos, considerando una hoja por cada par de hojas dispuestas de forma decusada en la parte vegetativa. Cuando la planta alcanza la etapa reproductiva la disposición de las hojas deja de ser decusada para ser espiralada. En este caso cada entrenudo corresponde a una hoja. Las bracteas no fueron consideradas.
- Área foliar: Se extrajeron tanto hojas como brácteas lo más cercano al tallo posible, luego se ordenaron y escanearon con un patrón de 1cm². El área total fue calculada utilizando una herramienta informática del programa Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).
- Tamaño de las hojas y altura de la planta: tanto el largo y ancho de las hojas fue medido manualmente con un calibre. El largo total de las plantas se midió mediante una cinta métrica.
- Medidas del tamaño floral: los órganos florales completamente desarrollados (Vincent y Coen, 2004), se midieron con un calibre, siguiendo el protocolo de Thompson (Thompson, 1986), considerando los diferentes órganos y partes de la flor, con las siguientes modificaciones: 1- longitud del tubo, 2- longitud total ventral, 3-ancho de la flor, 4- longitud del sépalo, 5- ancho del tubo, 6- longitud total del pétalo dorsal, 7- expansión del pétalo ventral, 8- expansión del pétalo dorsal, 9- longitud del estambre, 10- longitud del gineceo, 11- ancho del paladar (figura 10) (Bayo-Canha *et al.* 2007).
- Número de flores producidas: este parámetro fue determinado cuando las plantas completaron el período de floración y cesaron la producción de flores.
- Parámetros de las cápsulas: para determinar el peso se agruparon de a 5 individuos, el tamaño se midió con un calibre determinando el largo y el ancho de la cápsula.

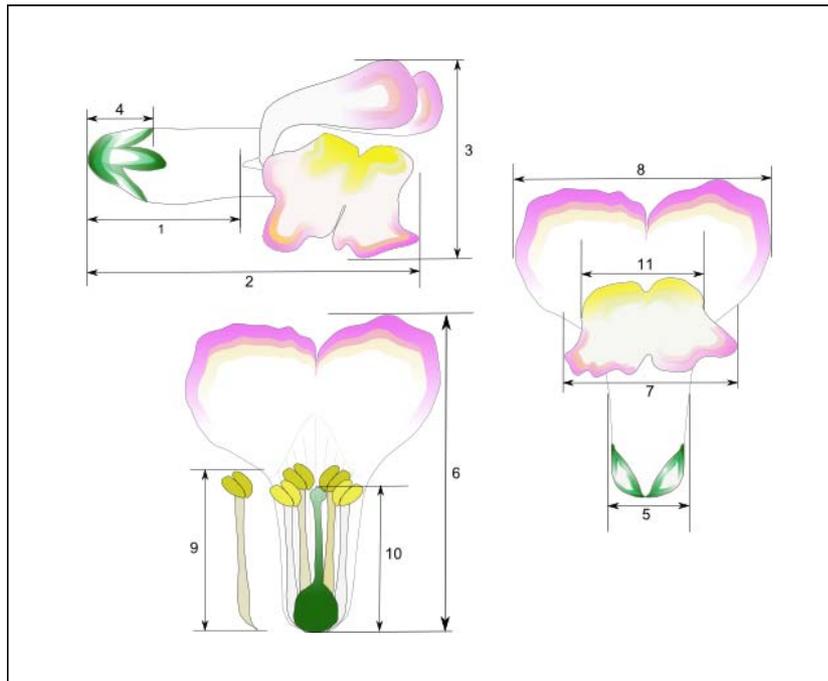


Figura 10: Descripción de los parámetros florales.

1- Longitud del tubo, 2- longitud total ventral, 3- ancho lateral de la flor, 4- longitud del sépalo, 5- ancho del tubo, 6- longitud total del pétalo dorsal, 7- expansión del pétalo ventral, 8- expansión del pétalo dorsal, 9- longitud del estambre, 10- longitud del gineceo, 11- ancho del paladar.

4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos se realizaron en STATGRAPHICS Plus 2.1, mediante test t o ANOVA en caso de parámetros múltiples. Se consideraron como diferencias significativas aquellas que presentaron un $p < 0,05$. En aquellos casos en que se produjeron desvíos de la normalidad los resultados se analizaron por el test Kruskal y Wallis. Los gráficos se realizaron en Excel y Stat View. Los análisis de área celular se basaron siempre en un número de datos superior a 30.

5 ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

5.1 GELES DE AGAROSA PARA ADN

Los geles se realizaron con agarosa BioRad 0,8%, 1,5% y 2% disuelta en TAE 1X (preparado en solución stock 50X: Tris-HCl 2 M; ácido acético 5,71%; EDTA 50 mM; pH 8,0) en presencia de bromuro de etidio a una concentración final de 1 $\mu\text{g/ml}$. Las muestras se sometieron a voltaje constante de 60-75 mV durante 30 minutos.

5.2 GELES DE AGAROSA PARA ARN

En este caso la agarosa (1,2%) se disolvió en tampón 1X FA (10X: 200 mM MOPS, 50 mM ácido acético, 10 mM EDTA, pH 7,0), agregando cada 100 ml de gel 1,8 ml de formaldehído 37% y 1 μ l de bromuro de etidio 10 mg/ml. Previamente a la electroforesis se equilibró el gel en el tampón FA 1X durante media hora.

Las muestras se mezclaron con tampón de carga 5X (4 mM EDTA, 0,26% formaldehído, 20% glicerol, 30,84% formamida, 2,5X FA, H₂O saturada en azul de bromofenol) y se incubaron a 65 °C durante 3-5 minutos luego fueron inmediatamente enfriadas en hielo. Para la electroforesis se utilizó un voltaje constante 5-7 V x cm durante 30 minutos.

En todos los casos el H₂O utilizada fue previamente tratada con 0,1% DEPC, se incubó durante toda la noche a temperatura ambiente y posteriormente se eliminaron los restos de dietilpírocarbonato (DEPC) por autoclavado durante 15 minutos.

6 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Los órganos florales fueron diseccionados con escalpelos para seleccionar las regiones a observar. Los pétalos se cortaron en secciones de 0,5x0,5 cm, tanto para los estambres como para los estilo se tomó una sección central de 0,5 cm de largo. Las muestras se lavaron en tampón fosfato (28% NaH₂PO₄ 0,4 M y 72% de Na₂HPO₄ 0,4 M, pH7,2), luego se fijaron en Glutaraldehído al 2%; diluido en el mismo tampón, durante 3 horas y se lavaron nuevamente en las mismas condiciones anteriores 4 o 5 veces. La deshidratación se realizó mediante incubación en una serie de concentraciones crecientes de etanol (30%, 50%, 70%, 90%) durante 15 minutos cada una. Luego se incubaron dos veces en etanol al 100% durante 30 minutos y por último dos veces en acetona al 100% durante 15 minutos.

Las muestras deshidratadas fueron secadas por punto crítico en CO₂ en Critical Point Dryer BAL-TEC CPC 030 y recubiertas con oro durante 120 segundos en SPUTTER COATER POLARON. La observación se realizó en el microscopio electrónico de barrido (Electronic microscope Hitachi S-3500N) y las imágenes fueron analizadas mediante el programa Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).



7 EXTRACCIÓN DE ARN

Las extracciones de ARN total de plantas se realizaron por medio del kit de "NucleoSpin RNA Plant Total RNA purification from plant" (Macherey-Nagel). El material de partida fue entre 100-300 mg para los órganos florales (pétalos, estambres y gineceos) y hojas. El ADN fue degradado mediante el tratamiento con DNAsa I libre de RNAsas. Finalmente el ARN puro se eluyó en condiciones de baja fuerza iónica en presencia de H₂O libre de RNAsas.

La calidad del ARN extraído se valoró en geles de agarosa en presencia de formaldehído como lo previamente descrito. Solo las muestras con ARNr 26S intacto fueron utilizadas para la preparación de ADNc.

La concentración del ARN se determinó con espectrofotómetro a $\lambda = 260$ nm ($\epsilon = 40 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Para garantizar la ausencia de RNAsas las cubetas y el material utilizado fueron lavados con una solución de: Na(OH) 0,1 M, EDTA 1 mM y enjuagados posteriormente con H₂O tratada con DEPC. La pureza del ARN se estimó evaluando el cociente de Absorbancia 260/280 considerándose óptimo entre 1,8 y 2,1.

Las muestras fueron precipitadas en presencia de 0,1 volúmenes de NaAc 3 M pH 7,2 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto, luego fueron lavadas con etanol 70% y resuspendidas en H₂O DEPC a una concentración final de 200 $\mu\text{g/ml}$.

El ARN fue mantenido a -20 °C y siempre utilizando guantes para evitar el contacto con RNAsas.

8 PREPARACIÓN DE PRIMERA HEBRA DE ADN

La síntesis de la primera hebra (ADNc) se realizó mediante el kit "SuperScript III First-Strand Síntesis System para RT-PCR", tomándose como material de partida 200 ng de ARN total en presencia de Oligo (dT)₂₀.

Para aumentar la sensibilidad de los análisis posteriores se eliminó el ARN del híbrido de ADN:ARN digiriendo la muestra con RNAsa H después de la síntesis de la primera hebra.

9 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

9.1 PCR

Las mezclas de reacción se realizaron con GoTaq Flexi DNA Polimerasa y su correspondiente tampón 5X, se añadió una concentración final de 1,5 mM de MgCl₂, 2 mM de cada cebador, 0,08 mM dNTPs, 1U de polimerasa, llevado a un volumen final de 25 µl con agua ultrapura. Para las reacciones de polimerización en cadena se utilizó un termociclador Perkin Elmer.

En el caso de amplificaciones a partir de ADNc se utilizaron 2 µl provenientes de la reacción de síntesis de simple hebra a partir de 200 ng ARN total.

9.2 PCR EN TIEMPO REAL (RT-PCR)

El ARN total fue preparado a partir de los órganos de las inflorescencias (pétalos, estambres y carpelos), en los estadios 10, 12 y 13 (Vincent & Coen 2004) según lo descrito en los puntos 7 y 8 de este mismo capítulo.

Cada muestra de ARN provino de una mezcla de entre 5-6 órganos pertenecientes a flores de plantas diferentes.

Las condiciones de la PCR se establecieron según lo descrito en la bibliografía (Manchado-Rojo, Weiss, & Egea-Cortines 2008) con las siguientes modificaciones: las reacciones fueron realizadas mediante SYBR Premix Ex Taq™ (Takara) de acuerdo a las instrucciones del fabricante en Rotor Gene 2000 (Corbett Research). En cada ensayo se realizaron tres repeticiones técnicas y dos experimentales utilizando el mismo ADNc de partida.

Los resultados fueron analizados mediante REST© (Relative Expression Software Tool) que utiliza una plataforma Excel (Michael W. Pfaffl 2001; Pfaffl, Horgan, & Dempfle 2002). El gen utilizado como referencia para la cuantificación relativa fue *Ran3* (Bey *et al.* 2004). La información detallada de los oligonucleótidos utilizados se encuentra en la tabla 1. Estos oligonucleótidos fueron diseñados según el programa OligoPerfect Designer (<http://www.invitrogen.com/>) con un contenido de GC entre 40 y 60%, una temperatura de fusión óptima de 60 °C y un tamaño entre 18 y 27 pb. Todos los oligos fueron sintetizados por Invitrogen.

Para distinguir los productos específicos de los inespecíficos y de los dímeros de oligonucleótidos se evaluó la curva de fusión obtenida inmediatamente después de la amplificación. Después del paso de desnaturalización a 95 °C se parte de una temperatura de 50 °C hasta alcanzar los 94 °C con una velocidad de incremento de 1 °C/segundo.

Cada muestra se analizó además por electroforesis en agarosa en presencia de bromuro de etidio verificando el tamaño esperado de los productos de amplificación.

Los genes seleccionados para determinar la actividad del ciclo celular fueron



CiclinaD3a (*CYCD3a*), *HISTONA 4* (*H4*) y *AINTEGUMENTA* (*ANT*) (Fobert *et al.* 1994; Gaudin *et al.* 2000; Riou-Khamlichi *et al.* 1999b).

Tabla 2: Información detallada de los cebadores utilizados

| Gen | Secuencia del oligonucleótido 5'-3' | Temperatura de hibridación | Tamaño del amplicón (bp) |
|---------------|--|----------------------------|--------------------------|
| <i>CYCD3a</i> | For: c a c t g c g g t t c t t g c a g t t a Rev: t g a a a t t g g g g t g a c t g g a t | 58 | 262 |
| <i>H4</i> | For: t t g g a g a a t g t g a t c c g t g a Rev: t a a c c c t a a c c c c c a a a t c c | 58 | 131 |
| <i>Ran3</i> | For: c g a a t c a a c a a a c g g t g Rev: g c c a a a t c a a t t t g c a c t | 58 | 574 |
| <i>BPe</i> | For: g a t g a t g a g t g a c g g t g g t g Rev1: g c g c t t a a c c g a a t t g t g a t Rev2: c g g g c a c t a a a t c t t g g a g a | 58 | 133 443 |
| <i>ANT</i> | For: t t g c t g c a a t c a a g t t c a g g Rev: c a a t g c c a a t c a a a t c a t g c | 58 | 325 |

10 ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Las búsquedas de homología de secuencias fueron realizadas utilizando el programa BLAST (Altschul & Gish 1996). La secuencia de *BPE* de *A. majus* fue identificada mediante la búsqueda en la base de datos de *A. majus* (www.antirrhinum.net) partiendo de la secuencia *BPEp* de *Arabidopsis* (*BPEp*, AM269754) utilizando el programa tBLASTn. La secuencia para *ANT* de *A. majus* (*AmANT*) fue cedida gentilmente por el Dr. Barry Causier (Centre for Plant Sciences, University of Leeds, UK, www.plants.leeds.ac.uk).

La construcción de los árboles se basó en el alineamiento de las secuencia de aminoácidos mediante el programa TCOFEE (Notredame, Higgins, & Heringa 2000). Los árboles filogenéticos fueron construidos basados en el método "Neighbour-joining method" (NJ) (Saitou & Nei 1987) generado mediante el programa PHYLIP 3.67 (Phylogeny Inference Package) (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/getme.html>). La robustez de los nodos fue obtenida por "bootstrap" (100 y 500) (Felsenstein 1985). Los árboles filogenéticos fueron editados utilizando el programa TreeView 1.6.6 (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>) y luego optimizados manualmente.

11 CITOMETRÍA DE FLUJO

11.1 MATERIAL VEGETAL

Se tomaron secciones de 0,5 cm² de hojas jóvenes. Para los pétalos se utilizaron 3-4 secciones de 0,5 cm² de flores diferentes provenientes de distintas plantas, en el caso del mapa del pétalo se tomaron las mismas regiones que las utilizadas para el mapa celular.

Las plántulas se utilizaron como estándares de contenido diploide (2C) y tetraploide (4C) característico de las células en división presentes en estos tejidos jóvenes, siendo "C" el contenido haploide de ADN nuclear. Se extrajeron los núcleos de 4-5 plántulas completas.

11.2 AISLAMIENTO Y TINCIÓN DE NÚCLEOS

El material vegetal fue tratado de acuerdo al kit de PARTEC "CyStain PI absolute P" con las siguientes modificaciones: los tejidos vegetales se disgregaron mediante ruptura mecánica dentro de un tubo eppendorf en presencia de 500 µl de tampón de extracción, después de 30-90 segundos se incubaron en hielo durante 15 minutos, posteriormente se filtraron a través de un filtro Partec 50 µm Cell trics.

Durante la tinción se agregaron 2 ml de la solución de tinción en presencia de 12 µl de la solución madre de Ioduro de propidio y 6 µl de la solución madre de RNAsa. Posteriormente se incubó en hielo durante 2-2,5 hs protegido de la luz.

El análisis se realizó el mismo día o el día posterior, manteniendo las muestras a 4 °C en oscuridad.

Todas las muestras analizadas fueron realizadas por duplicado y se tomaron en todos los casos 10.000 cuentas. Para obtener la posición del pico que corresponde a un contenido de ADN nuclear 2C, utilizado como estándar, se utilizaron hojas jóvenes para cada una de las muestras. Los núcleos fueron analizados en un citómetro de flujo FacsCalibur (Becton Dickinson) con excitación mediante láser de argon a 488 nm.



11.3 CALIBRACIÓN DEL CITÓMETRO

Los detalles de la calibración optimizada se describen en el siguiente cuadro:

| PARÁMETRO | DETECTOR | VOLTAJE | GANANCIA | MODO |
|-----------|--------------|---------|----------|------|
| P1 | FSC | E-1 | 7.53 | LOG |
| P2 | SSC | 300 | 1.98 | LOG |
| P3 | FL1 (530/30) | 437 | 1.00 | LOG |
| P4 | FL2 (585/42) | 535 | 1.00 | LIN |
| P5 | FL3 (670 LP) | 366 | 1.00 | LIN |
| P6 | FL2-Área | | 1.00 | LIN |
| P7 | FL2-Ancho | | 3.94 | LIN |

Se tomó como parámetro primario a FL2 imponiendo el valor 20 como valor umbral.

12 PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN A PARTIR DE GEL

Para la extracción de ADN a partir de gel se utilizó el kit "Núcleo Spin Extract II" y se procedió de acuerdo a las instrucciones con las siguientes modificaciones: se cortó el fragmento del gel entre 1,5-2% de agarosa, se pesó y se agregó el tampón NT en una proporción de 200 μ l cada 100 mg de gel. Posteriormente se incubó a 50 °C durante 5-10 minutos hasta disolver por completo el gel, dando golpes de vortex cada 2-3 minutos. Luego se purificaron las muestras en columna lavando con 600 μ l de la solución NT3 por duplicado y eluyendo en solución NE.

13 SECUENCIACIÓN

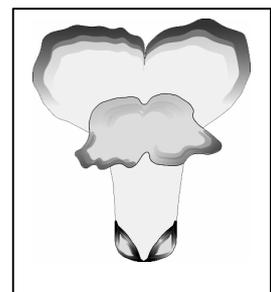
Los fragmentos secuenciados fueron amplificados por PCR, purificados de gel y enviados a Sistemas Genómicos S.L. Se llevó a cabo una reacción de secuenciación de cadena simple utilizando los oligonucleótidos específicos para el gen.

14 TRATAMIENTO CON CITOCALISINA D

Los tratamientos con citocalasina D se realizaron en estadios tempranos del desarrollo a partir de meristemas de inflorescencias. Se utilizó una concentración de 40 μ M de citocalasina en presencia de 0,5% DMSO. Los órganos florales fueron tratados dos veces por semana hasta alcanzar la madurez utilizándose como control las plantas tratadas con la solución de 0,5% DMSO. El tratamiento se realizó humectando los pétalos con las soluciones mencionadas mediante el uso de un pincel común. Las plantas fueron mantenidas bajo condiciones controladas con un fotoperíodo 16 hs de luz y 8 hs en oscuridad bajo un régimen de temperaturas de 25°C durante el día y 15°C durante la noche.

Los tejidos de los pétalos fueron visualizados sin tratamientos mediante microscopía óptica a una magnitud de aumento de 200.

RESULTADOS, DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN





III ESTABILIDAD DE LOS PARÁMETROS FLORALES FRENTE A CONDICIONES DE HACINAMIENTO

Consideramos que el contenido de este capítulo tiene una utilidad fundamental para los análisis posteriores realizados a lo largo de los capítulos siguientes. Aunque el presente trabajo de Tesis basa el análisis del tamaño floral en mutantes con segregación mendeliana, el tamaño de los órganos es un caso típico cuyo estudio se ha llevado a cabo como un carácter cuantitativo (Falconer & Mackay 1996; Kearsey, Pooni, & Syed 2003; Lynch 1998). Esto unido a la falta de conocimientos sobre el comportamiento del carácter y de los mutantes en condiciones de invernadero, nos llevó a plantear ensayos paralelos que permitiesen determinar si el tamaño floral sufría alteraciones cuantitativas importantes o no en diferentes condiciones de crecimiento. En los primeros ensayos se observó que el tamaño floral en las diferentes estaciones del año mostró una fuerte influencia de la temperatura. Por lo tanto todos los estudios de comparación fueron realizados en las mismas condiciones ambientales.

En la literatura se pueden encontrar tres definiciones diferentes para las condiciones impuestas en este experimento: la llamada competencia intraespecífica en el ámbito de la ecología, condiciones de marco de cultivo en los textos de fitotecnia y hacinamiento, en artículos recientes en los que se utiliza *Arabidopsis* como planta modelo. A lo largo del texto hemos utilizado el término hacinamiento y competencia intraespecífica de forma indistinta.

El interés que suscita este estudio incluye básicamente dos aspectos. Uno enteramente práctico ya que la influencia del entorno sobre los caracteres en estudio es un punto a tener en cuenta a la hora de analizar y fenotipar los diferentes mutantes. No podemos olvidar que desde el punto de vista de la mejora genética clásica, cualquier aspecto del manejo de un cultivo que influya en un carácter ha de formar parte del diseño experimental. Por otro lado la variación relativa de los parámetros vegetativos respecto a los florales nos dará información acerca de la interdependencia entre los mecanismos de respuesta de ambos y nos permitirá determinar si las condiciones de cultivo modifican o no el tamaño floral.

1 RESUMEN

En el presente trabajo se ha estudiado el efecto del hacinamiento y la reducción del área foliar en el desarrollo vegetativo y reproductivo de *A. majus*. Mediante los ensayos se propone determinar la variación en el tamaño floral frente a cambios en el entorno y en relación al cuerpo vegetativo de la planta.

El aumento en la densidad de siembra provoca la muerte prematura de las plantas. Aquellas que sobreviven presentan menor elongación total de la planta y el mismo número de hojas más pequeñas en comparación con las plantas utilizadas como control. Durante el crecimiento reproductivo la respuesta a las condiciones de estrés cambian, produciéndose menos flores de igual tamaño que en el control. La reducción artificial en el número de hojas también conduce a una disminución en el número de flores, con variaciones mínimas en el tamaño, y las plantas elongan menos que el control.

El comportamiento de *A. majus* frente a condiciones de hacinamiento parece ser modular respondiendo según el estadio de desarrollo de la planta (vegetativo o reproductivo) que afectan diferencialmente el tamaño o el número de los órganos laterales. Los tratamientos de hacinamiento y de defoliación demuestran, sin embargo, que ambos módulos no varían de forma independiente sino que existe una relación positiva entre el área foliar y el número de flores producidas. El tamaño floral no presenta reducciones importantes frente a los tratamientos realizados y por lo tanto se muestra prácticamente independiente de las condiciones experimentales.



2 INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos sésiles que se adaptan al las condiciones adversas del entorno cambiando los programas de desarrollo y crecimiento. Durante la evolución se han seleccionado aquellos genes que permiten la supervivencia de los individuos mejor adaptados a determinados entornos (Van Kleunen & Fischer 2005). Sin embargo, siempre hay un límite, e independientemente del entorno la competencia intra e interespecífica imponen una máxima cantidad de individuos por unidad de superficie.

2.1 PLASTICIDAD FENOTÍPICA EN PRESENCIA DE MODIFICACIONES DEL ENTORNO

En muchas circunstancias la integración de los cambios en el entorno conducen a variaciones en el crecimiento de la planta (Maloof 2003). Por ejemplo, la luz influye en la elongación del tallo a través de cambios en los niveles de giberelinas o en la señalización (Olszewski *et al.* 2002). El estrés abiótico puede causar reducción en el tamaño del cuerpo de la planta, lo que en muchos casos se relaciona con cambios en los niveles de ácido abscísico (Leon & Sheen 2003). Se ha demostrado que el estrés hídrico afecta directamente la actividad de las ciclinas en las hojas de trigo (Schuppler *et al.* 1998).

Entre los mecanismos mejor comprendidos se encuentran el tiempo de floración y la competencia causada por la cercanía entre las plantas (Smith & Whitelam 1997). En general, las condiciones de hacinamiento conducen a una mayor elongación debido a la escasa fuente de luz, como se ha observado para *Impatiens capensis*, *Nicotiana tabacum* y *Arabidopsis* (Ballare *et al.* 1994; Donohue & Schmitt 1999). La competencia por luz requiere la presencia de fotorreceptores funcionales (Pigliucci & Schmitt 1999) y las fitohormonas cumplen un papel fundamental. Así se ha demostrado por ejemplo en plantas de tabaco insensibles a etileno que son menos competitivas en entornos hacinados (Pierik *et al.* 2003; Pierik *et al.* 2004). Recientemente se ha identificado en *Arabidopsis* el gen *TAA1*, que participa en la biosíntesis de auxinas y se requiere para la respuesta a la competencia por luz. Este gen parece ser un mediador entre la vía de las auxinas y el etileno (Stepanova *et al.* 2008; Tao *et al.* 2008).

Los estudios de hacinamiento habitualmente tienen en cuenta parámetros relacionados con la elongación del tallo, el área foliar, número de hojas, peso específico total, número de entrenudos, número de flores, número de frutos, etc.,

sin embargo existe poca información respecto del tamaño de las flores. Tanto el número como el tamaño de las flores son los responsables de atraer a los polinizadores y por lo tanto son esenciales para una óptima reproducción en plantas alógamas. Existen modelos teóricos que proponen un balance entre el número y el tamaño de las flores. Avalan esta teoría experiencias realizadas en *Silene latifolia*. Sin embargo en el caso de *Narcissus dubius* no se observa un balance entre ambos caracteres (Delph *et al.* 2004b; Delph *et al.* 2004a; Worley *et al.* 2000).

Aunque existe una amplia bibliografía que describe procesos de desarrollo que presentan plasticidad fenotípica, en la mayoría de los casos no se considera el tamaño de los órganos florales.

2.2 INTEGRACIÓN MODULAR

La regulación a nivel genético del crecimiento en las plantas está integrada por los meristemas apicales (Brand, Hobe, & Simon 2001). Los órganos laterales se forman a través de eventos secuenciales que abarcan el establecimiento de los primordios, la identidad y por último el crecimiento de los órganos (Meyerowitz 1996; Weiss *et al.* 2005).

Cada tipo de órgano generado a través del desarrollo de la planta presenta diferentes grados de plasticidad, lo cual condujo a la implementación del concepto de plasticidad modular. Esta hipótesis indica que la plasticidad fenotípica global observada comprende la suma y la integración de las respuestas locales de los módulos que se entienden como las sub-unidades repetitivas de las plantas, a menudo estructural y funcionalmente semiautónomas (De Kroon *et al.* 2005; Weiner 2004; West-Eberhard 2003).

El objetivo del presente capítulo se enfoca principalmente en el análisis de la plasticidad fenotípica de los parámetros florales en estudio frente a variaciones del entorno, en este caso la competencia intraespecífica, y en relación con las variaciones en los parámetros vegetativos.

Para ello se analizan las variaciones de los parámetros vegetativos y reproductivos de *A. majus* bajo la competencia por hacinamiento y la reducción del área foliar. Se analizó además la interacción entre los módulos vegetativos y reproductivos, mediante un análisis de correlación entre los caracteres que responden al tratamiento y el análisis de la respuesta frente a una reducción del área foliar.



3 RESULTADOS

3.1 DESCRIPCIÓN DE PARÁMETROS VEGETATIVOS BAJO CONDICIONES DE HACINAMIENTO

Los efectos del hacinamiento han sido determinados analizando los parámetros vegetativos y florales en *A. majus* sometidas a dos tratamientos. Plantas crecidas con dos semanas de crecimiento, se plantaron en macetas de 650ml disponiendo 1 (control), 5 y 10 plantas por macetas. Los parámetros vegetativos fueron determinados en el momento en el que el 100% de las plantas control habían alcanzado la floración, al igual que la mayoría de las plantas sometidas a los tratamientos. Cabe aclarar que en algunas plantas sometidas a las condiciones más estrictas no se alcanza la floración. Esto ha sido considerado para evitar diferencias alométricas debidas a estadios de desarrollo diferentes y sólo se han analizado aquellas plantas que florecen. El número total de flores se determinó cuando las plantas habían cesado su producción.

El primer aspecto observado fue una marcada disminución en el tamaño de las plantas que habían crecido en condiciones de hacinamiento. Las medidas de la altura total de las plantas muestran una reducción cercana al 40% (figura 11-A, B). La elongación de los entrenudos se vió afectada de forma similar en los primeros tres entrenudos (figura 11-C; tabla 18 en anexo tablas)

La inspección de la población bajo la presión de una competencia extrema mostraba una muerte selectiva de algunas plantas en estadios tempranos del desarrollo. Esto ya se ha visto en experimentos realizados en *Impatiens capensis* en los que se observó una correlación entre el tamaño de las plantas sometidas a diferentes densidades y la supervivencia de las mismas, describiéndose el fenómeno como autoclareo (Schmitt, Eccleston, & Ehrhardt 1987). Dado que las plantas utilizadas son isogénicas, los eventos de muerte deberían estar causados por efectos de la posición o por eventos estocásticos que se producen en estadios tempranos en el desarrollo.

Los análisis del número de hojas con filotaxis decusada en el momento de la floración muestran constancia frente a los tratamientos y un incremento significativo en el número de hojas espiraladas en el tratamiento de 10 plantas por maceta (figura 11-D).

A simple vista se observó una reducción en el tamaño de las hojas de la planta, las que fueron más cortas y estrechas en las condiciones de competencia. Estas observaciones fueron verificadas en experimentos anteriores realizados en nuestro laboratorio, en los cuales se determinó la longitud y el ancho de los tres

primeros pares de hojas (Datos no mostrados). En esos experimentos se demostró que se producía una reducción significativa en el tamaño de las hojas del tercer entrenudo en ambas condiciones de hacinamiento, las que fueron de alrededor de un 14% en las condiciones más extremas.

Tabla 3: Medidas de las dimensiones de las tres primeras hojas de las plantas en condiciones de hacinamiento.

| | Hoja 1 | | Hoja 2 | | Hoja 3 | |
|----------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|
| | longitud | ancho | longitud | ancho | longitud | ancho |
| 1 | 25,52±10,16 | 14,04±5,64 | 35,95±13,54 | 18,53±6,76 | 39,23±14,84 | 16,00±5,95 |
| 5 | 25,47±7,77 | 13,38±4,20 | 34,30±10,66 | 17,99±5,35 | 34,59±11,65 | 13,87±4,75 |
| 10 | 23,42±8,34 | 12,59±4,30 | 32,27±10,72 | 16,92±5,47 | 33,80±11,37 | 13,77±4,71 |
| 1 vs. 5 | -0,17 | -4,69 | -4,59 | -2,94 | -11,82* | -13,35 |
| 1 vs. 10 | -8,23 | -10,32 | -10,24 | -8,72 | -13,82*** | -13,98*** |

¹promedio (mm) ± desviación estándar

² Diferencia expresada en % considerando al tratamiento control 100%

*P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001

Las medidas fueron realizadas en 10 individuos como mínimo.

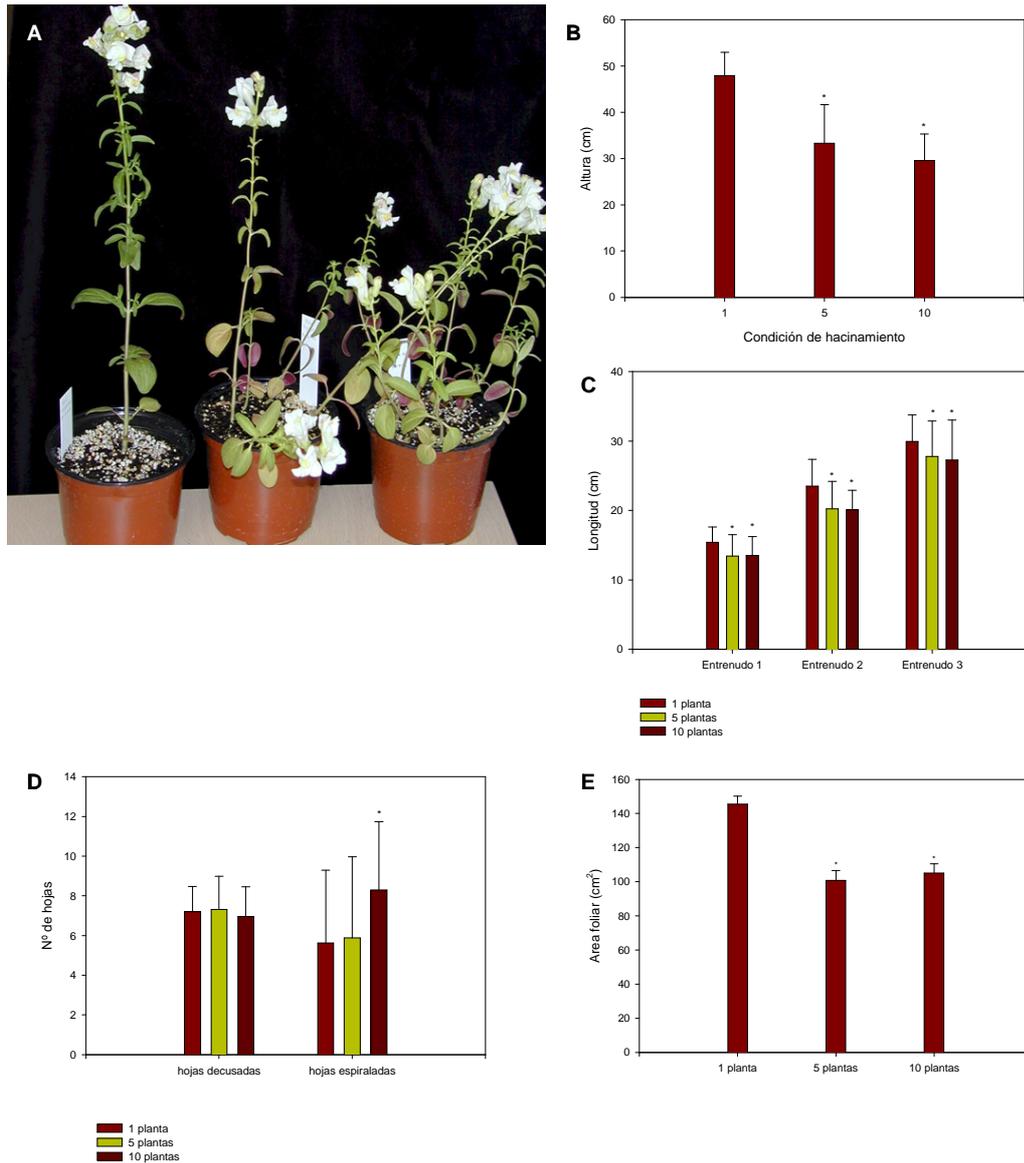


Figura 11: Efecto de los tratamientos de hacinamiento sobre los parámetros vegetativos.

A) Fotografía de plantas control, 1 planta por maceta (izquierda), 5 plantas por maceta (centro), 10 plantas por maceta (derecha). En las siguientes figuras se muestran los parámetros vegetativos de ambos tratamientos comparados con el control: B) altura total de las plantas; C) longitud de los tres primeros entrenudos; D) número de hojas con filotaxis decusada y espiralada; E) área foliar total entre el control y los tratamientos de hacinamiento. En caso de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) las barras se señalan con un “*”.

En cuanto al área foliar se encontró una reducción, frente a las condiciones de hacinamiento, de un 30% tanto en los ensayos de 5 como los de 10 plantas por maceta (figura 11-E).

Estos resultados manifiestan que la disminución en el área foliar y en la altura total de la planta se deben a un menor tamaño de las hojas y del largo de los entrenudos.

3.2 DESCRIPCIÓN DE PARÁMETROS FLORALES BAJO CONDICIONES DE HACINAMIENTO

Las condiciones de competencia intraespecífica en condujeron a una fuerte disminución en la producción de flores. En la figura 12-A se puede apreciar una inflorescencia típica de una planta control y otra sometida a altos niveles de competencia.

Muchas de las plantas en condiciones de hacinamiento abortan los primordios florales, 13% en el caso de 5 plantas y 23% en el caso de 10 plantas por maceta. Descartando aquellos individuos que no alcanzaron a florecer, el número promedio de flores producidas se redujo drásticamente en las dos condiciones ensayadas (aproximadamente un 50%, figura 12-B).

Los análisis de los parámetros florales se determinaron según se detalló en los materiales y métodos (Bayo-Canha *et al.* 2007). En contraste con los resultados obtenidos para las hojas, el tamaño floral parece ser muy estable frente a las condiciones de estrés planteadas en este ensayo. La mayoría de los parámetros que caracterizan el perianto de la flor no sufrieron variaciones ante ninguna de las condiciones de hacinamiento. De un total de nueve parámetros analizados sólo 3 (1, 2 y 5) presentaron reducciones significativas (todos relacionados con el tamaño del tubo de la flor). En el caso de los órganos sexuales se observó una reducción significativa en el largo de los estambres pero sólo bajo las condiciones más extremas. Los carpelos presentaron una variación leve, pero significativa, incrementando el largo un 3% sólo en el caso de 5 plantas por maceta (figura 12-C; tabla 19, anexo tablas).

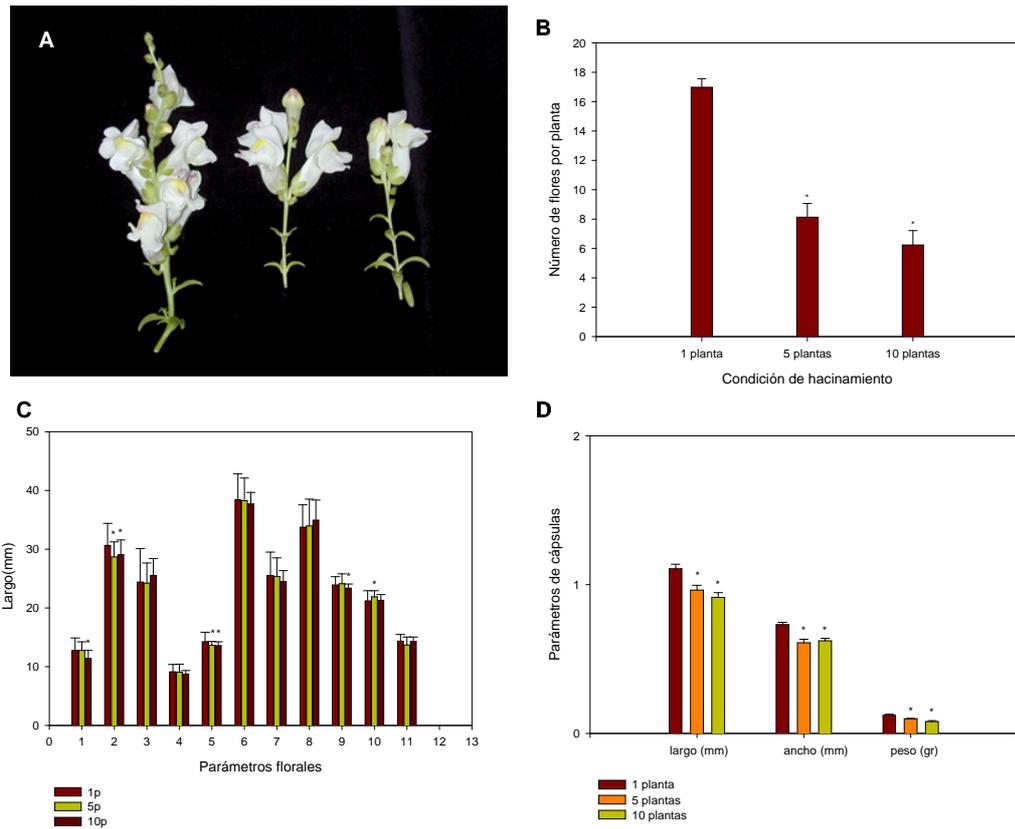


Figura 12: Efecto de los dos tratamientos de hacinamiento sobre los parámetros florales.

A) Fotografía de las inflorescencias de plantas control (izquierda), 5 plantas por maceta (centro), 10 plantas por maceta (derecha). En las figuras siguientes se muestran los gráficos de los parámetros vegetativos de ambos tratamientos comparados con el control: B) número total de flores producidas; C) parámetros florales; D) caracterización de las cápsulas según su largo, ancho y peso. En caso de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) las barras se señalan con un “*”.

Aunque los cambios a nivel del tamaño de la flor fueron moderados, el desarrollo de las cápsulas se vió afectado disminuyendo el rendimiento y el tamaño. El peso de las cápsulas decreció entre un 20 y un 35% según el grado de hacinamiento (5 y 10 plantas) y el tamaño disminuyó entre un 10 y 15% en largo y ancho (figura 12-D; tabla 20 en anexo tablas). En resumen, aunque las flores mantuvieron su tamaño y se presentaron parcialmente independientes ante las condiciones de hacinamiento, la capacidad reproductiva se vio afectada por la competencia intraespecífica.

3.3 ANÁLISIS DE CORRELACIÓN ENTRE PARÁMETROS REPRODUCTIVOS Y VEGETATIVOS

Con el propósito de analizar una posible relación entre la variación

producida en los parámetros vegetativos y las variaciones observadas en los órganos florales se realizó un análisis de correlación entre las variaciones en el área foliar y la altura de las plantas, frente al número de flores.

El área foliar presentó una correlación significativa ($p < 0,05$) con el número de flores frente a condiciones de hacinamiento pero no en condiciones normales (tabla 4).

Esto implicaría que a pesar de que los órganos laterales responden de forma diferente frente al tratamiento, unos afectando el número y otros el tamaño, existe una señalización entre ambos estadios de desarrollo de la planta

Tabla 4: Análisis de correlación entre el área foliar y el número de flores en condiciones de hacinamiento

| | cc ¹ | p ² |
|------------|-----------------|----------------|
| 1 planta | 0,0629 | 0,7393 |
| 5 plantas | 0,6076 | 0,0016 |
| 10 plantas | 0,5853 | 0,013 |

¹ coeficiente de Spearman

² valor de probabilidad que determina la significancia estadística para la correlación estimada

3.4 REDUCCIÓN DEL ÁREA FOLIAR

Dado que observamos una correlación entre la reducción del área foliar y el número de flores en condiciones de hacinamiento, se planteó analizar el efecto de una reducción artificial del área foliar en los parámetros florales. Se realizaron dos tratamientos cortando las hojas de plantas que habían alcanzado el desarrollo de seis entrenudos, en un caso se eliminaron todas las hojas (reducción total) y en el segundo caso se eliminaron las hojas a partir del cuarto entrenudo (reducción media). Posteriormente se dejaron crecer las plantas hasta alcanzar la floración, momento en que se analizaron los parámetros descriptos previamente.

En primer lugar se determinó el área foliar de las plantas sometidas a ambos tratamientos considerando el control como 100%. El tratamiento más drástico mantuvo un 34% del área foliar mientras el otro un 59% (figura 13-A). El análisis de los parámetros vegetativos mostró al igual que el tratamiento en condiciones de hacinamiento, una disminución en la altura total de las plantas en ambas condiciones (figura 13-B; tabla 21 en anexo tablas) lo que se debe principalmente a una reducción en la longitud de los entrenudos (figura 13-C). Sorprendentemente, las hojas que permanecieron en la planta en el tratamiento



menos severo se expandieron más de lo normal mostrando un incremento significativo tanto en largo (aproximadamente un 10%) como en ancho (alrededor del 15%), sugiriendo un mecanismo general de regulación a nivel del tamaño de las hojas en *A. majus* (figura 13-D).

El análisis de las inflorescencias de las plantas sujetas a la reducción artificial del área foliar mostró una disminución de la producción de flores que alcanzó el 50% (figura 14-A y B).

Las reducciones observadas en los parámetros florales analizados fueron más severas en el caso de la reducción del área foliar que las producidas en los experimentos de hacinamiento. La inspección visual no permitió distinguir diferencias de tamaño respecto a las plantas control. Sin embargo, el análisis estadístico evidenció que muchos de los parámetros del perianto y órganos reproductivos de la flor disminuyeron de forma estadísticamente significativa, aunque los porcentajes de variación fueron relativamente bajos (figura 14-C; tabla 22).

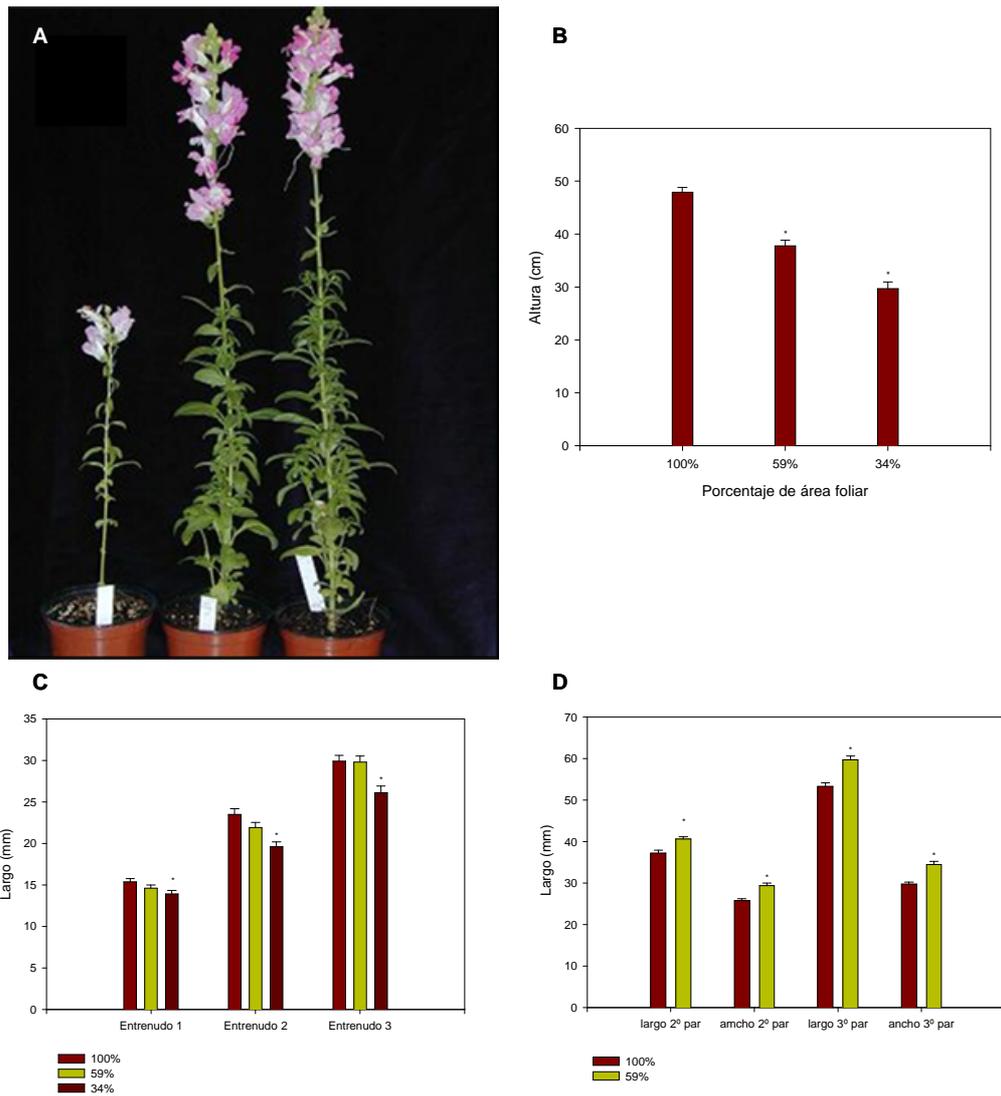


Figura 13: Efecto de la reducción del área foliar en los parámetros vegetativos.

A) Fotografía de las plantas con reducción total (izquierda), las plantas con reducción media (centro) y las plantas control (derecha). En las siguientes figuras se muestran los gráficos de los parámetros analizados comparando el efecto de los tratamientos con el control: B) altura total de la planta; C) longitud de los tres primeros entrenudos; D) dimensiones (largo y ancho) de los pares de hojas ubicados en el segundo y tercer entrenudo. En caso de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) las barras se señalan con un "**".

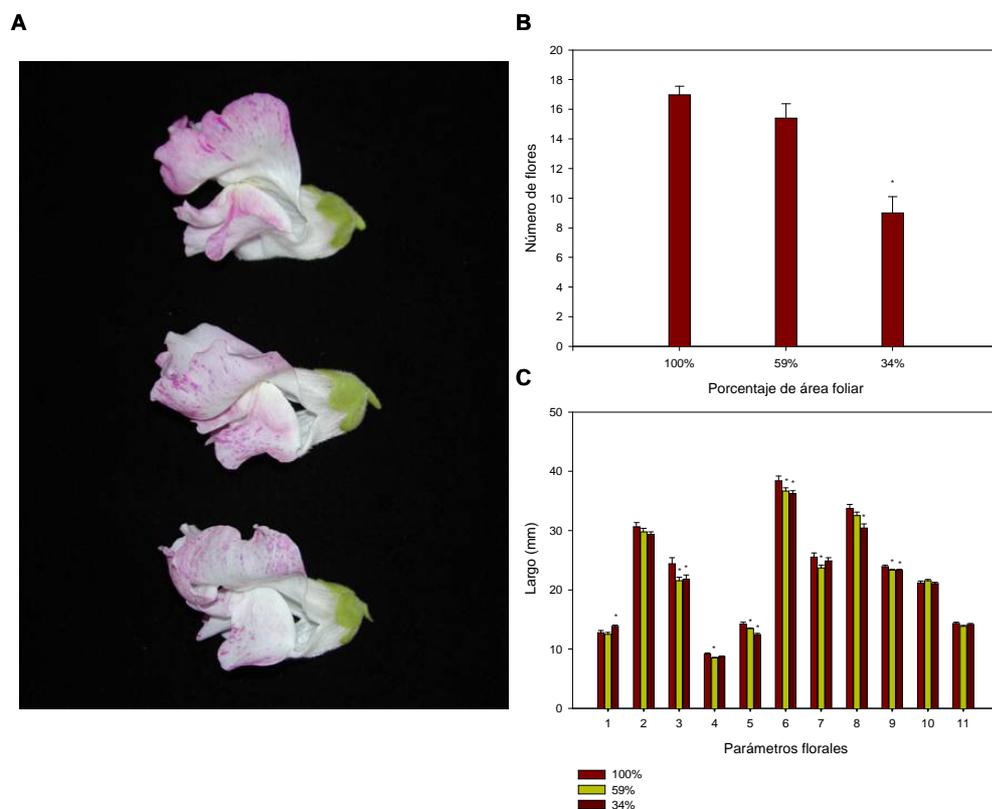


Figura 14: Efecto de la reducción del área foliar en los parámetros florales.

A) Fotografía de flores provenientes de plantas control (superior), plantas con reducción media (centro) y plantas con reducción total (inferior). En las figuras siguientes se muestran los gráficos de los parámetros analizados comparando el efecto de los tratamientos con el control: B) número total de flores producidas; C) parámetros florales. En caso de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) las barras se señalan con un " * ".

4 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

4.1 RESPUESTA ESPECÍFICA DEL ESTADIO DE DESARROLLO

Los análisis de los parámetros vegetativos y reproductivos de las plantas frente a condiciones de hacinamiento reflejan una tendencia a reducir la reducción de la biomasa total en todas las fases de desarrollo analizadas. Estas reducciones se debieron a diferentes aspectos, dependiendo de la fase de desarrollo. Se reduce el área foliar produciendo el mismo número de hojas, aunque estas son más pequeñas, y los tallos presentan una menor elongación a nivel de los entrenudos y por lo tanto son más pequeños. Las inflorescencias, en cambio, reducen drásticamente la producción de flores cuyo tamaño se ve disminuido ligeramente.

Esta respuesta local observada en los tratamientos sugiere que los órganos vegetativos y reproductivos pueden ser considerados como módulos independientes según la definición de De Kroon *et al.*, respondiendo de forma diferente frente a variaciones en el entorno (De Kroon *et al.* 2005).

Estudios previos realizados en tabaco, *I. capensis* y *Arabidopsis* detectaron que el hacinamiento conduce a una mayor elongación de los tallos (Donohue *et al.* 1999; Dudley & Schmitt 1996). Sin embargo otros trabajos realizados en *Brassica napus* muestran que en condiciones de hacinamiento se produce una reducción de la biomasa total de la planta así como una reducción en el número de flores, si bien mantienen el tamaño de todos los parámetros analizados (Cresswell, Hagen, & Woolnough 2001). También se observó reducción en el tamaño de las plantas de *Arabidopsis* sometidas a condiciones severas de hacinamiento (Weinig *et al.* 2006). Esto significa que un mismo tipo de estrés abiótico puede conducir a dos respuestas opuestas en plantas diferentes. *A. majus* se parecería más a *B. napus* que a *Arabidopsis*.

Existen trabajos previos que avalan la independencia genética de los mecanismos que regulan el tamaño de las hojas y el de las flores. En estudios de variación natural en *A. majus*, tomate y *Arabidopsis* se demuestra que los QTLs que afectan al tamaño de los pétalos y las hojas son diferentes (Frary, Fritz, & Tanksley 2004; Juenger *et al.* 2005; Langlade *et al.* 2005), sugiriendo que existe un grupo de genes que controlan el tamaño floral de forma específica.

La estabilidad en el tamaño de las flores respecto a la gran variación en número puede deberse a los posibles efectos secundarios sobre la supervivencia de las plantas, esto se ha observado también en experiencias de hacinamiento en *B. napus* (Cresswell *et al.* 2001). Sin embargo, tanto la disminución en el número como en tamaño de las flores reduce la visita de agentes polinizadores.

Existen evidencias experimentales en una amplia gama de especies dentro de las angiospermas, de una relación negativa entre número y tamaño de las flores producidas por las plantas (Delph *et al.* 2004a; Sargent *et al.* 2007; Worley *et al.* 2000). Otros trabajos demuestran una fuerte dependencia de las plantas polinizadas por insectos y las poblaciones de polinizadores (Biesmeijer, Hartfelder, & Imperatriz-Fonseca 2006). Más aún, se ha encontrado que diferencias mínimas a nivel celular tienen efectos en los polinizadores (Comba *et al.* 2000). Toda esta información sugiere la presencia de fuertes mecanismos que controlan la producción y el desarrollo de las flores debido a su importancia frente a la visita de polinizadores y al éxito reproductivo.

Sin embargo en este trabajo, a pesar de la estabilidad en el tamaño de las flores, la capacidad reproductiva se vió disminuida y por lo tanto no permite compensar completamente los efectos de las condiciones experimentales.



4.2 INTEGRACIÓN MODULAR

Las respuestas fenotípicas respecto a variaciones en el entorno componen la suma de las respuestas de cada módulo de la planta, sumado a los efectos producidos por la comunicación e integración de los mismos (De Kroon *et al.* 2005). Consideramos que la respuesta que se presenta frente a las condiciones de hacinamiento incluye los efectos inducidos en cada módulo por separado, así como la interacción entre ambos.

En este capítulo se ha considerado la correlación entre los caracteres como una medida de la integración entre los diferentes módulos analizados. La correlación entre caracteres fenotípicos puede reflejar procesos biológicos importantes producto de una relación genética, funcional, fisiológica o de desarrollo entre los caracteres (Murren, Pendleton, & Pigliucci 2002; Wagner 1995; Wagner & Schwenk 2000). Los análisis entre el área foliar (parámetro que caracteriza al módulo vegetativo) respecto al número de flores producidas (módulo reproductivo) sugieren que las condiciones del tratamiento inducen cambios e interacción entre ambos módulos.

Los experimentos de reducción del área foliar de forma artificial también ponen en evidencia la posible interacción entre los módulos vegetativos y reproductivos ya que provocan efectos comparables a los producidos por las condiciones de competencia intraespecífica en los órganos florales y la producción de flores.

En resumen, se puede concluir que las condiciones del entorno provocan cambios en el área foliar y en la calidad de la inflorescencia. Sin embargo, el tamaño floral parece ser prácticamente independiente de estas variaciones. Los resultados también demuestran que existen dos módulos independientes que regulan el tamaño o la producción de órganos laterales, dependiendo del estadio vegetativo o reproductivo de la planta. A su vez, parece que bajo las condiciones del tratamiento ambos módulos integran las respuestas de tal forma que el número de flores producida se relaciona positivamente con la masa foliar existente y probablemente sea esta uno de los responsables principales de los cambios en el número de flores.



IV CARACTERIZACIÓN CELULAR DEL PÉTALO DE *A. majus*

Las flores de *A. majus* poseen cinco pétalos que están unidos por la parte basal para formar un tubo, en el dorso de la flor se forman dos lóbulos ubicados en el labio superior y el labio inferior presenta tres lóbulos ventrales y un paladar (Güemes J 2008). La complejidad de los pétalos de *A. majus* parece ser el producto evolutivo de la polinización especializada mediada por insectos (Keck et al. 2003; Thompson DM 1986). En más del 80% de las angiospermas examinadas las células de los pétalos presentan formas especializadas. El tubo posee células planas, el lóbulo está constituido por células cónicas y planas mientras el paladar, a diferencia de las otras regiones, desarrolla tricomas (Perez-Rodriguez et al. 2005). En los lóbulos las células con morfología cónica poseen una cutícula gruesa que presenta estrías. Su forma, se cree, está asociada con un mayor aprovechamiento de la luz incidente, que será menos reflejada que en el caso de las células planas y dará a la superficie un aspecto más brillante (Martin et al. 2002).

En este capítulo se plantean dos objetivos de utilidad meramente práctica para los experimentos realizados en los trabajos posteriores. El primero es identificar las regiones celulares de los pétalos idóneas para la comparación de los mutantes en estudio y el silvestre, en función de la morfología y tamaño celular. El segundo es determinar si existen diferencias en los niveles de ploidía entre las distintas regiones de los pétalos.

1 DESARROLLO DEL MAPA CELULAR

Con el objetivo de describir el comportamiento a nivel de tamaño y número de células en los órganos florales de los mutantes en estudio, fue necesario desarrollar un protocolo de selección de las regiones a analizar. En el caso de estambres y estilos la morfología celular a lo largo de todo el órgano es homogénea, por lo tanto se tomaron las regiones centrales para ambos órganos (Davies et al. 1996a).

Los pétalos presentan una mayor complejidad dado que las células varían a lo largo de la superficie tanto en morfología como en tamaño. Para poder realizar comparaciones de tamaño celular se procedió a analizar minuciosamente la distribución de formas y tamaños celulares a lo largo de la superficie del pétalo. Para ello se seleccionó el lóbulo del pétalo considerando ambas caras, adaxial y

abaxial. El lóbulo se dividió en 8 regiones no solapantes de aproximadamente 5 x 5 mm tomando como línea de partida el surco presente entre el tubo y uno de los lóbulos del labio superior, como se muestra en la figura 15 A.

Las variaciones en morfología celular se evaluaron por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM) y la distribución de tamaños por cuantificación del área celular, a través de un programa de análisis de imágenes (Image-J) y posterior análisis estadístico. Se consideraron las variaciones entre las diferentes regiones y dentro de una misma región, para lo cual se consideraron dos subregiones: central y periférica.

En la cara abaxial, en principio, se descartó la región 2, dado que no se observaba homogeneidad en el tamaño celular entre las dos subregiones analizadas (tabla 16, en anexo de tablas). Las otras regiones analizadas aunque presentan una distribución homogénea en el tamaño celular, se observaron diferencias en la morfología dentro de una misma región. Como se ve en la figura 15-B y C, existen mezclas de células planas, ovaladas y de contornos suaves, que gradualmente cambian hasta alcanzar células con forma de pieza de puzzle. (figura 15-B, C). Esto dificultaría la selección de una misma región en los diferentes mutantes a analizar.

En el mapa celular de la cara adaxial de los pétalos se observó una distribución clara en cuanto a morfología celular y tamaño. Las regiones cercanas al tubo (3, 6) contienen solo células planas de forma ovalada. Los tamaños celulares son homogéneos entre las sub-regiones analizadas así como entre ambas regiones (figura 15-D, E, tabla 17, en anexo tablas).

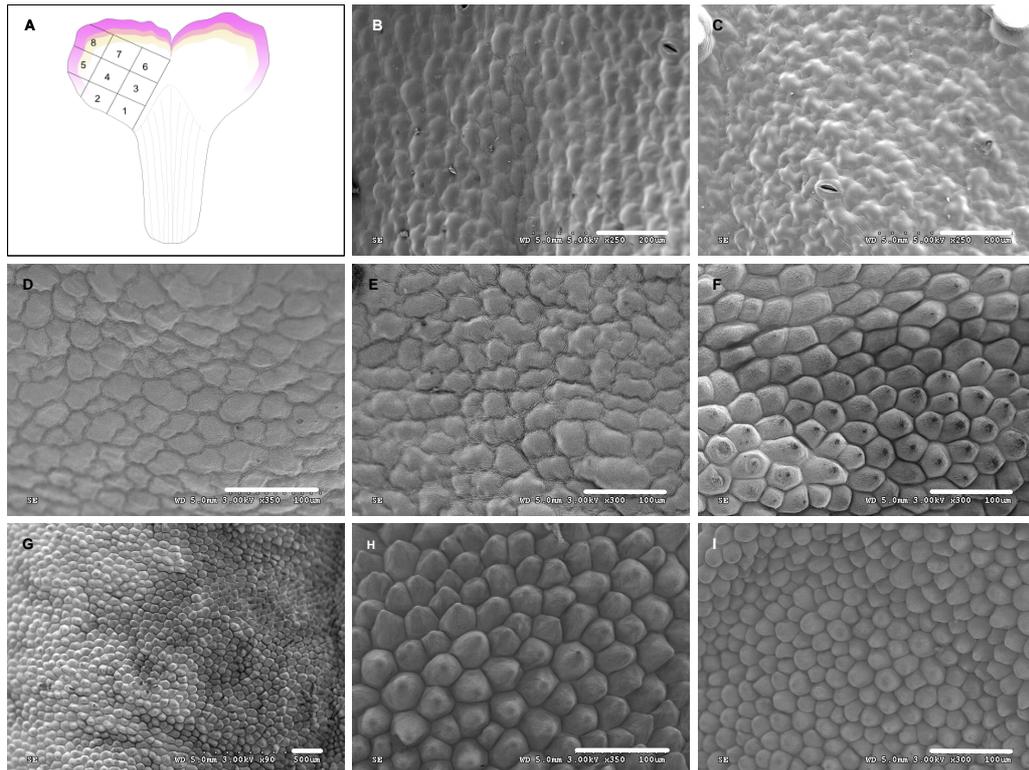


Figura 15: Micrografías electrónicas del mapa celular del pétalo.

A) Detalle de las regiones seleccionadas para la realización del mapa celular del pétalo dorsal. Las figuras siguientes muestran imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido de las diferentes regiones del pétalo: región 3 de la cara abaxial mostrando la heterogeneidad morfológica presente en una misma región B) células planas; C) células con forma de piezas de puzzle; diferentes regiones de la cara adaxial del pétalo D) región 3; E) región 6, F) región 4; G) región 7; H) región 5; I) región 8.

Las regiones intermedias, 2, 4 y 7, no presentan homogeneidad en morfología sino que se observa un gradiente entre formas planas y cónicas, y por lo tanto se descartaron (figura 15-F, G). Las regiones cercanas a los bordes, 5 y 8, están compuestas por células cónicas a lo largo de toda su superficie, debido a la expresión del factor de transcripción Mixta (Noda *et al.* 1994). El análisis de distribución de tamaños reveló la ausencia de variaciones tanto a nivel de las subregiones como entre las dos regiones que las contiene (figura 15 H, I, Tabla 17 en anexo tablas).

En función de los resultados de este análisis se seleccionaron las regiones de células cónicas (5 y 8) y las de células planas (3 y 6) de la cara adaxial del pétalo para caracterizar el comportamiento celular de los mutantes en estudio.

2 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE PLOIDÍA

Las variaciones a causa del incremento en el tamaño celular pueden deberse a diversas razones, entre ellas a un aumento en los niveles de ploidía por el fenómeno de endoreduplicación somática.

Dado que no existe información respecto a los niveles de ploidía por endoploidía somática en los pétalos de *A. majus*, se realizó un análisis previo en las células de los pétalos silvestres. Para ello se partió de las mismas regiones descritas en la sección del mapa celular. Los extractos de núcleos de las células de estas regiones fueron teñidos y sometidos a citometría de flujo para determinar los niveles de ploidía utilizando como parámetros diploides los extractos provenientes de hojas y brotes (figura 16)(Bennett, Bhandol, & Leitch 2000; Bennett & Leitch 1995; Dolezel et al. 1998). En todos los casos se realizó el análisis por duplicado. Para evitar variaciones instrumentales las medidas se tomaron tanto de forma independiente como conjunta, mezclando los extractos de las regiones de los pétalos con los extractos controles de plántulas.

En los resultados se observó un único pico para todas las regiones, que coincidió con el pico diploide de los núcleos provenientes de las plántulas. Esto permitió descartar la posibilidad de endoreduplicación en las células de los pétalos de *A. majus*.

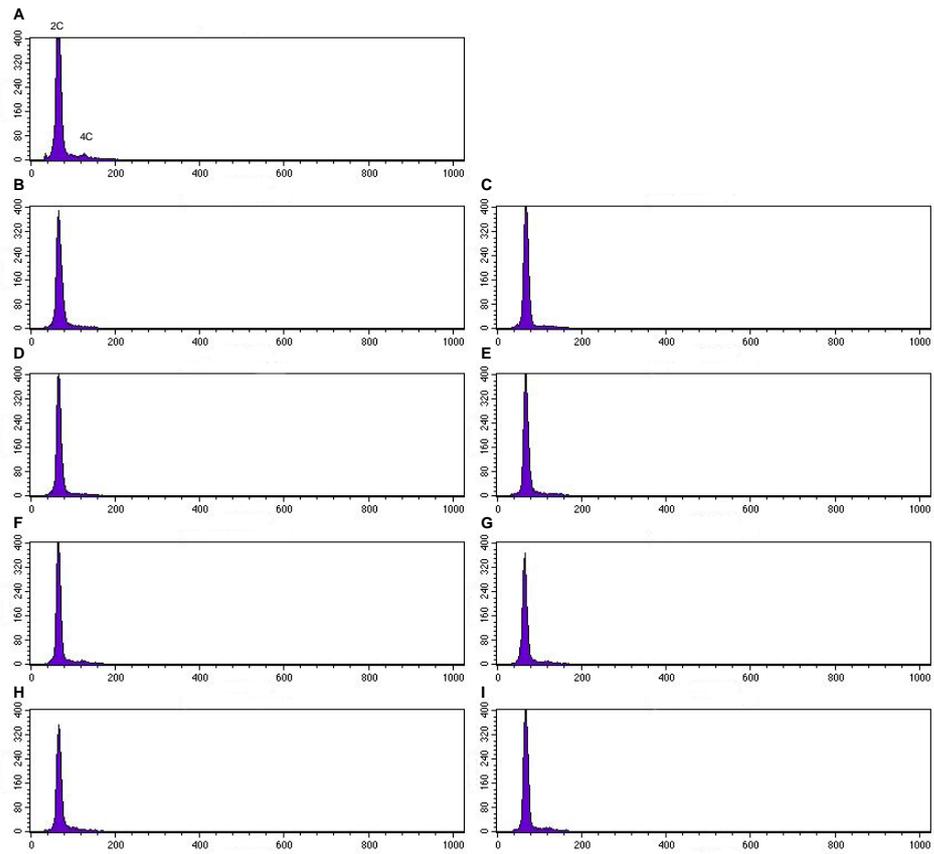


Figura 16: Citometría de flujo de las regiones del mapa celular del pétalo.

Histograma del contenido relativo de ADN después del análisis de núcleos celulares extraídos de diferentes tejidos de las plantas silvestres 165E A) plántulas, B) región 1 del pétalo, C) región 2 del pétalo, D) región 3 del pétalo, E) región 4 del pétalo, F) región 5 del pétalo, G) región 6 del pétalo, H) región 7 del pétalo, I) región 8 del pétalo. El eje de las ordenadas muestra la intensidad de la señal proporcional al número de núcleos y las abscisas el contenido relativo de ADN nuclear. C se refiere al contenido haploide de ADN.



V **INFLUENCIA DE COMPACTA EN EL TAMAÑO FLORAL Y EN LA IDENTIDAD DE ÓRGANO**

1 RESUMEN

En el presente capítulo se realizó una caracterización de los mutantes *compacta* (*co*) y *Grandiflora* (*Graf*) de *A. majus*. Dichos genes alteran principalmente la regulación del tamaño de los órganos de la flor teniendo *co* un efecto pleiotrópico en el tamaño de los órganos vegetativos. Se obtuvieron dobles mutantes *Graf co* y *def^{nic} co*. Se realizó un análisis fenotípico exhaustivo tanto del tamaño de los órganos como de las células de todos los órganos de la flor en los mutantes simples y en el doble mutante *def^{nic} co*. Se realizó un ensayo de inhibición de la expansión celular en flores del mutante simple y se analizaron los niveles de expresión del gen *DEF* comparando el silvestre con los mutantes simples *def^{nic}* y *co*.

Los resultados obtenidos demuestran que el gen *CO* tiene un efecto pleiotrópico sobre la regulación del tamaño de órganos vegetativos y reproductivos según los análisis de los parámetros estudiados. En las flores de los mutantes *co* y *Graf* se producen cambios a nivel de expansión y división celular dependiendo de la identidad y/o posición del órgano. En el caso de los órganos sexuales provocan cambios en la división celular. En pétalos, sin embargo, producen variaciones a nivel de la expansión celular y el análisis de los dobles mutantes *Graf co* sugiere que ambos genes actúan en una misma ruta en el control del tamaño de estos órganos. El gen *CO* interviene, además, en la determinación de la identidad del pétalo influyendo a nivel de la morfología celular, de los niveles de pigmentos y de la expresión del gen *DEF*. Esta expresión se encuentra reducida en *co* en un 20% respecto a silvestre lo que sugiere una función de *CO* en el establecimiento o mantenimiento de la expresión de los genes de función B. Los análisis de los dobles mutantes *def^{nic} co* sugieren que *DEF* y *CO* actúan en la regulación del tamaño de los órganos de la flor e identidad de los pétalos por vías aparentemente paralelas.

2 INTRODUCCIÓN

Los órganos de las plantas completan su desarrollo cuando finaliza la diferenciación celular y alcanzan su tamaño final. En los primeros estadios de desarrollo, el crecimiento se produce por división y expansión celular. En estadios tardíos, después de completarse el período de división, el crecimiento es causado exclusivamente por expansión celular (Anastasiou *et al.* 2007b). A partir de este modelo propuesto para *Arabidopsis*, se observan diferencias en sistemas como petunia, donde el desarrollo del pétalo ocurre por división celular hasta estadios avanzados (Reale *et al.* 2002) o *Gerbera*, donde parece existir un período de transición durante el cual no se produce ni división ni expansión celular (Laitinen *et al.* 2007).

2.1 COORDINACIÓN ENTRE EXPANSIÓN Y DIVISIÓN CELULAR

Los cambios en aquellos genes que participan en la regulación de la división celular o en los procesos de expansión celular pueden provocar variaciones de tamaño tanto a nivel de la parte aérea de la planta (*ANT*, *ARGOS*, *ER*, etc.) (Hu *et al.* 2003; Krizek 1999a; Mizukami *et al.* 2000; Torii *et al.* 1996), a nivel específico de órgano ya sean hojas u órganos de la flor (*AN*, *ROT*, *BPEp*). (Folkers *et al.* 2002; Kim *et al.* 2002; Kim *et al.* 1998b; Szecsi *et al.* 2006), y hasta en regiones específicas de los órgano (*CINCINNATA*, *DICHOTOMA*, *DIVARICATA*) (Galego & Almeida 2002; Luo *et al.* 1996; Luo *et al.* 1999; Nath *et al.* 2003). La división y expansión celular se encuentran estrechamente asociados, tanto que las células deben superar un volumen mínimo para completar la división (Mitchison, Novak, & Sveiczzer 1997).

Como se menciona en la introducción general se han postulado varias teorías respecto a la regulación del tamaño final de los órganos y existen evidencias que respaldan que división y expansión no son procesos independientes (Beemster, Fiorani, & Inze 2003; Horiguchi *et al.* 2006; Nijhout 2003a; Nijhout 2003b; Tsukaya 2003). Estudios recientes realizados en los mutantes *fugu 1-5* de *Arabidopsis* demuestran una relación entre proliferación y expansión celular. La mutación causa una disminución de la actividad mitótica que conduce a un incremento en la expansión celular post-mitótica en forma específica de la identidad del órgano e independiente de los niveles de ploidía (Ferjani *et al.* 2007; Gorou *et al.* 2006).



2.2 CAMBIOS EN DIVISIÓN Y EXPANSIÓN CELULAR DEPENDIENTES DE LA IDENTIDAD DEL ÓRGANO

Existe una amplia bibliografía que pone en evidencia la disparidad de las respuestas de los diferentes órganos de las plantas frente a interrupciones o modificaciones del ciclo celular o a cambios en la expansión celular. La expresión de un gen mutante *CDC2* en tabaco, como se mencionó en la introducción, provoca disminución en el número de células tanto en hojas como en flores. Sin embargo se observa una disminución en el tamaño de los órganos vegetativos con células más largas, mientras que los órganos reproductivos son más pequeños, disminuyen el número de células manteniendo el tamaño celular, demostrando un mayor acoplamiento de ambos procesos en flores respecto a hojas (Hemerly et al. 1995). Este efecto puede deberse a que el mantenimiento de las proporciones florales es esencial en plantas con polinización especializada. Para asegurar la polinización, ya sea por autopolinización o para permitir la dispersión del polen, es necesario que los órganos sexuales mantengan las proporciones (Galliot, Stuurman, & Kuhlemeier 2006; Thompson 2001).

De forma similar, se observa en *Arabidopsis* donde la expresión ectópica de *ANT* produce un aumento en el tamaño de los órganos debido a un mayor número de células en sépalos, mientras en pétalos, estambres y carpelos la variación no se atribuye solo a la división celular sino que las células presentan además mayor expansión (Krizek 1999a). En tomate el gen *OVATE* reprime el crecimiento en las frutas. Un aumento en el número de copias de dicho gen conduce a una disminución en el crecimiento de todos los órganos laterales incluyendo hojas y flores. Sin embargo el efecto en sépalos y estambres es más acentuado que el producido en pétalos y carpelos (Liu et al. 2002).

Estos datos sugieren una respuesta de crecimiento diferencial para cada órgano floral según su identidad que permite mantener las proporciones florales apropiadas.

Además de los estudios con mutantes se han realizado análisis con tratamientos exógenos que provocan la detención del crecimiento afectando la expansión celular. Por ejemplo la citocalasina D y la latrunculina depolimerizan los filamentos de actina que poseen funciones esenciales en el crecimiento de la pared celular. Los tratamientos provocan fenotipos enanos en *Arabidopsis*, sin interrupción del desarrollo (Baluska et al. 2001; Bannigan et al. 2005; Smith & Oppenheimer 2005). y son activos también en *A. majus* (Friedman et al. 2003).

2.3 MUTANTES EN GENES DE IDENTIDAD DE CLASE B

En el presente capítulo se utilizan alelos hipomórficos de *def*, para analizar el efecto del gen *CO*, por lo que resulta relevante una descripción detallada de su función y expresión.

Existen varios morfoalelos mutantes del gen silvestre *DEF A* con efectos graduales en cuanto al carácter homeótico de la mutación. Dichos mutantes presentan defectos en los verticilos 2 y 3, de tal forma que sus pétalos poseen características sepaloideas hasta producir, en el alelo más fuerte *def^{gii}*, pétalos indistinguibles de los sépalos. Los estambres son feminizados, desarrollan óvulos en la cara ventral de las anteras pero producen sacos de polen prácticamente normales. En el caso del alelo *def^{nic}*, la deformación es más acentuada; se producen filamentos más anchos con la superficie dorsal cubierta de tricomas y con sacos de polen deformados que, en algunos casos, contienen unos pocos óvulos. El alelo nulo *def^{gii}* es más drástico y por lo tanto los filamentos de los estambres están fusionados constituyendo un gineceo central cubierto por tricomas (Schwarz-Sommer *et al.* 1992; Trobner *et al.* 1992).

Los niveles de expresión de *DEF* varían entre los mutantes en los diferentes alelos y respecto a silvestre. Se presenta una disminución leve de los niveles de *DEF* en *def^{nic}*, decreciendo de forma más pronunciada en *def^{hlo}* y estando prácticamente ausente en *def^{gii}*. La transcripción del gen *def^{nic}* está aparentemente autorregulada por la proteína DEF A, sin embargo no se descarta la posibilidad de que proteínas haya proteínas adicionales. Además del control transcripcional, esta proteína cuya acción esta mediada por la formación de complejos ternarios con GLO y SQUA, sufre modificaciones post-traduccionales (Egea-Cortines, Saedler, & Sommer 1999; Schwarz-Sommer *et al.* 1992; Sommer *et al.* 1990; Sommer *et al.* 1991; Zachgo *et al.* 1995).

Todos estos datos revelan que los procesos de diferenciación y de crecimiento (expansión y división celular) están íntimamente ligados y sujetos a una regulación minuciosa específica, según los diferentes estadios de desarrollo, órganos y regiones dentro de los mismos.

Los objetivos que se plantean en este capítulo son: caracterizar los mutantes *co* y *Graf* en cuanto al tamaño de los órganos vegetativos y reproductivos. Estudiar la implicancia de los genes *CO* y *GRAF* en las rutas que controlan el tamaño floral. Dado que el mutante *co* provoca diferentes respuestas en los distintos órganos de la flor se determinará si la acción de *CO* es específica de órgano o de verticilo.



3 RESULTADOS

3.1 DESCRIPCIÓN FENOTÍPICA Y CELULAR DE LOS MUTANTES SIMPLES *GRAF* Y *CO*

Los análisis de caracterización fenotípica en los mutantes se realizaron sobre poblaciones F_2 segregantes, provenientes de los cruces parentales del mutante original (Gatersleben) en el fondo genético Sippe50 y la planta silvestre 165E (Sommer *et al.* 1985).

3.1.1 Caracterización morfológica del mutante *co*

El mutante *co* es recesivo según lo descrito previamente por Stubbe (1966) y lo observado en los análisis de segregación de poblaciones F_2 realizadas en estos trabajos. En una población de 192 plantas se observaron 42 plantas de fenotipo *co* y 150 silvestres, que según la prueba de χ^2 no presenta desviaciones estadísticamente significativas respecto a la segregación esperada 3:1 ($p > 0,3$).

El mutante *co* es pleiotrópico, produce una reducción significativa en la mayor parte de los parámetros analizados afectando tanto el cuerpo vegetativo como los órganos reproductivos. Los tres primeros entrenudos disminuyen entre un 30-45%, las hojas son más cortas y más estrechas y el número de hojas no varía respecto al silvestre (tabla 5).

Las flores de *co* son más pequeñas que las silvestres mostrando cambios en las proporciones florales (figura 17-A a C). Los órganos de la flor se ven reducidos a excepción de los estambres que mantienen su tamaño respecto al silvestre y por lo tanto sobresalen por encima del perianto. Esta particularidad no alcanza a impedir la polinización y permite distinguir fácilmente a los mutantes de los silvestres. Los sépalos de *co* son más cortos y el pétalo dorsal prácticamente no presenta expansión, con un lóbulo entre un 30-45% más estrecho y menos elongado. El pétalo ventral posee también menor expansión y el tubo y el gineceo muestran menor elongación (figura 17-A, B y C; tabla 6). En ningún caso se observaron defectos respecto a la identidad de los órganos y a la morfología celular.

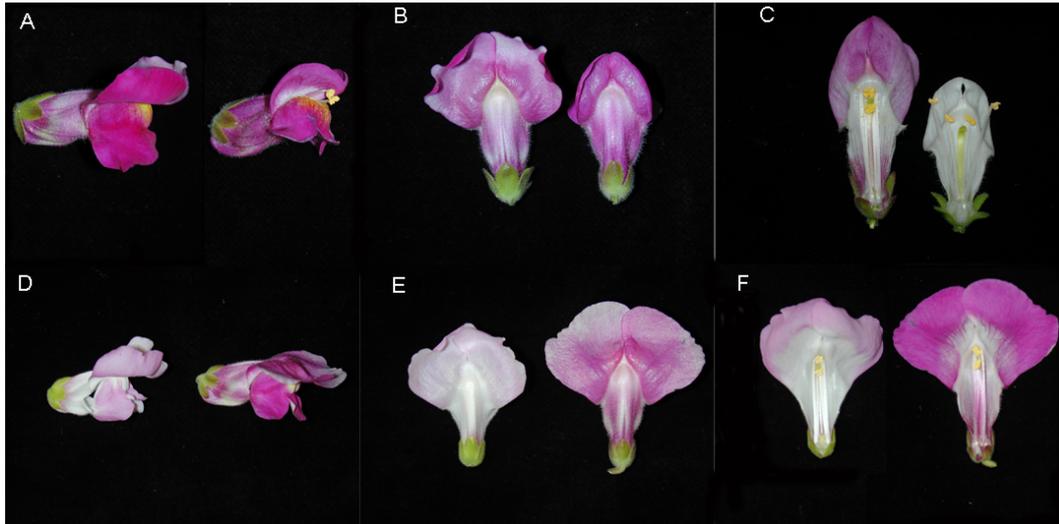


Figura 17: Fotografías de los mutantes simples *co* y *Graf*.

Se muestran las flores silvestres a la izquierda y las mutantes a la derecha. Mutante simple *co* A) vista lateral, B) vista dorsal, C) corte transversal; Mutante simple *Graf* D) vista lateral, E) vista dorsal, F) corte transversal.

3.1.2 Descripción celular del mutante *co*

Los órganos sexuales de los mutantes *co* presentan comportamientos celulares diferentes entre sí. Los estambres poseen células más pequeñas respecto a silvestre, mientras los estilos mantienen el tamaño celular (figura 18-A a D; tabla 7). En referencia a los cambios en los tamaños de los órganos se deduce que la proliferación celular se ve afectada en ambos órganos provocándose un aumento en el número de células en los estambres, mientras que los estilos lo disminuyen.

Las células de los pétalos presentan menor expansión que las de las plantas silvestres. Así tanto las células cónicas como las planas de la región 6 reducen sus áreas en un 43% y un 33% respectivamente. Sin embargo, las células planas de la región 3 no presentan diferencias respecto al silvestre (figura 18-E a H; tabla 7). Dado que el cambio en las proporciones celulares es comparable a las variaciones en el tamaño de los órganos se puede atribuir el menor tamaño del órgano a la disminución del tamaño celular pero no se puede descartar una posible variación a nivel del número de células.

Tabla 5: Comparación de parámetros vegetativos entre el silvestre y los mutantes co y Graf

| | Entrenudos (mm) | | | Hoja 1 (mm) | | Hoja 2 (mm) | | Hoja 3 (mm) | | Nº Hojas | | |
|---------------------|-----------------|----------|----------|-------------|----------|-------------|----------|-------------|----------|----------|---------|----------|
| | 1 | 2 | 3 | L | A | L | A | L | A | D | E | T |
| co ^{1,2} | 10,4±3,4 | 16,8±7,4 | 21,0±4,9 | 16,1±2,2 | 11,2±1,2 | 25,9±1,5 | 15,6±1,0 | 35,5±5,9 | 16,0±2,4 | 8,8±1,2 | 5,2±4,1 | 14,0±4,0 |
| silvestre | 18,9±1,9 | 27,2±3,2 | 31,8±4,3 | 24,1±2,1 | 13,4±0,8 | 39,0±2,9 | 19,4±1,6 | 46,1±4,9 | 18,9±2,9 | 8,1±1,3 | 3,7±2,7 | 11,8±1,8 |
| % | -45,2*** | -38,4*** | -33,9*** | -33,2*** | -16,4*** | -33,6*** | -19,4*** | -23,0*** | -15,5* | 8,6 | 40,5 | -15,7 |
| Graf ^{1,2} | 23,3±3,0 | 30,2±2,7 | 30,9±4,9 | 27,7±6,0 | 14,5±2,3 | 41,0±4,1 | 19,5±2,8 | 45,5±2,6 | 17,0±2,8 | 5,9±1,2 | 5,3±4,0 | 11,2±3,1 |
| silvestre | 18,6±2,7 | 27,4±3,9 | 30,5±2,8 | 24,1±2,5 | 12,9±1,3 | 37,3±2,6 | 18,0±3,2 | 39,9±6,8 | 15,7±2,9 | 6,1±1,2 | 3,6±2,8 | 9,7±2,5 |
| % | 24,9** | 10,3 | 1,4 | 15,3 | 12,3 | 9,9* | 8,4 | 14,1* | 8,1 | -3,3 | 47,2 | 15,5 |

1 Número total de mediciones para cada parámetro = 15

2 valores promedio ± la desviación estándar

% comparación tomando como referencia al silvestre de cada población F2

* P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001.

L: largo; A: Ancho; D: Decusadas; E: Espiraladas; T: totales

Tabla 6: Comparación de parámetros florales entre el silvestre y los mutantes *co* y *Graf*

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|----------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| <i>co</i> ^{1,2} | 15,3±0,8 | 23,5±1,3 | 17,1±2,3 | 6,6±0,5 | 10,4±0,7 | 28,3±1,4 | 19,2±2,7 | 16,4±2,3 | 26±1,8 | 20,1±1,0 | 10,8±1,2 |
| silvestre | 17,9±0,7 | 30,8±2,7 | 26,4±2,7 | 7,9±0,8 | 12,1±0,8 | 39,5±0,9 | 26,2±1,6 | 29,9±2,0 | 25,6±0,9 | 22±0,7 | 14,±1,1 |
| % | -15,1*** | -23,6*** | -35,0*** | -16,5*** | -14,0*** | -28,4*** | -26,9*** | -45,1*** | 1,4 | -8,7*** | -24,4*** |
| <i>Graf</i> ^{1,2} | 17,2±0,9 | 30,1±0,9 | 21,7±3,5 | 7,2±0,5 | 11,0±0,5 | 36,6±1,7 | 22,4±2,4 | 29,6±2,0 | 24,7±1,1 | 20,2±1,1 | 14,3±1,0 |
| silvestre | 16,1±0,9 | 27,2±1,9 | 19,3±2,7 | 7,2±0,8 | 9,9±0,6 | 31,8±1,7 | 19,2±2,8 | 23,2±1,7 | 21,9±0,9 | 17,9±1,3 | 12,6±1,0 |
| % | 6,3* | 10,8*** | 12,2 | 0,7 | 11,2*** | 15,0*** | 16,8* | 27,6*** | 12,8*** | 12,7*** | 13,3*** |

1 Número total de mediciones para cada parámetro = 15

2 valores promedio (mm) ± la desviación estándar

% comparación tomando como referencia al silvestre de cada población F2

* P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001.

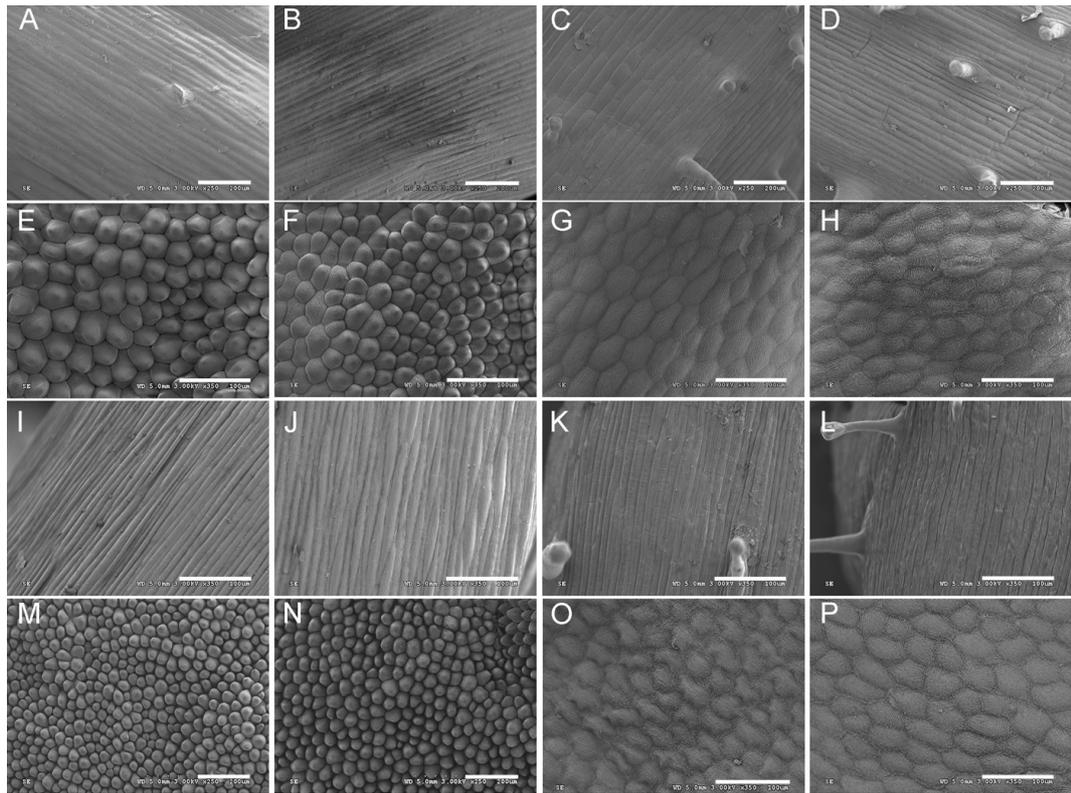


Figura 18: Micrografías electrónicas de barrido de células de los órganos florales de los mutantes *Graf* y *co* comparados con los silvestres.

Células de los órganos florales del silvestre (izquierda) y el mutante *co* (derecha) A, B) estambres, C, D) estilos, E, F) células cónicas de los pétalos dorsales, G, H) células planas de los pétalos dorsales. Células de los órganos florales del mutante *Graf* (derecha) y el silvestre (izquierda) I, J) estambres, K, L) estilos, M, N) células cónicas de los pétalos dorsales, O, P) células planas de los pétalos dorsales. Las barras en el margen inferior derecho de cada imagen equivalen a 100 μ m.

En resumen se observa que *co* produce un efecto pleiotrópico reduciendo el tamaño de todos los órganos laterales de la planta. Además de las diferencias a nivel de órganos se observan distintos comportamientos celulares entre las regiones de los pétalos afectando la expansión celular en los pétalos y principalmente la división celular en los órganos sexuales.

Tabla 7: Comparación de áreas celulares entre el silvestre y los mutantes *co* y *Graf*

| | Estambres | Estilos | Pétalo cónicas | Pétalo planas |
|----------------------------|--------------|-------------|----------------|---------------|
| <i>co</i> ^{1,2} | 2948,4±103,9 | 2123,1±85,1 | 756,9±29,0 | 1609,66±52,19 |
| silvestre | 3568,1±76,4 | 2221,9±70,5 | 1346,5±43,3 | 2101,24±55,83 |
| % | -17,4*** | -4,4 | -43,8*** | -23,4*** |
| <i>Graf</i> ^{1,2} | 2265,7±75,9 | 1763±67,6 | 881,4±28,0 | 1961,7±56,5 |
| silvestre | 2061,8±76,5 | 1775,9±83,1 | 694,5±24,2 | 1476,4±57,0 |
| % | 9,9 | -0,7* | 26,9*** | 32,8*** |

¹ Número total de mediciones = 50

² Valores promedio (μm^2) \pm Error típico

% comparación tomando como referencia al silvestre

* P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001

3.1.3 Caracterización morfológica del mutante *Graf*

Los mutantes *Graf* se diferencian fácilmente de los silvestres en una población segregante F_2 por poseer flores de mayor tamaño (figura 17-D a F). En una población de 25 plantas (21 *Graf* y 4 silvestres) la prueba de χ^2 indicó que la segregación observada no se desvía significativamente ($p>0.1$) de los valores esperados para una segregación 3:1 (*Graf*:silvestre) de un alelo dominante. Este análisis de segregación coincide con el descrito por Stubbe, (1966).

El cuerpo vegetativo de estos mutantes prácticamente no presenta diferencias respecto a silvestre. Solo mostraron variaciones significativas la elongación del primer entrenudo y la longitud de la segunda y tercera hoja (tabla 5). Los parámetros de la flor sin embargo sí mostraron diferencias estadísticamente significativas en casi todos los parámetros evaluados, con aumentos de entre el 6% y el 30% respecto del silvestre (figura 17-D a F; tabla 6). Se podría decir que el mutante *Graf* produce un incremento en el tamaño de los órganos de la planta que es prácticamente exclusivo de la flor.

3.1.4 Descripción celular del mutante *Graf*

Se ha estudiado el efecto de *Graf* en la división y la expansión celular comparado con los individuos de fenotipo silvestre dentro de la misma población F_2 . Los análisis estadísticos realizados sobre los órganos sexuales no evidencian diferencias significativas de tamaño celular, de lo que se deduce que el incremento en el tamaño de los órganos se debe exclusivamente a un incremento en el número de células (figura 18-I a L, tabla 7). En cuanto a los pétalos, el área



de las células planas y cónicas de *Graf* es de entre un 25% y un 35% más grande que en silvestre, sugiriendo que el incremento en el tamaño observado en los pétalos se debe al menos en parte, al incremento en el tamaño celular (figura 18-M a P, tabla 7).

Las variaciones a nivel del tamaño celular en pétalos pueden deberse, entre otras razones, a cambios en los niveles de ploidía por el fenómeno de endoreduplicación. Las caracterizaciones previas descritas en el capítulo de la sección IV (Caracterización celular del pétalo de *A. majus*), demuestran que las células de los pétalos no presentaron diferencias en los niveles de ploidía entre las distintas regiones. Se analizaron los niveles de ploidía en diferentes regiones del pétalo dorsal del mutante *Graf* siguiendo el procedimiento descrito previamente. La comparación de los niveles de ploidía entre silvestre y mutante de núcleos de células provenientes de las distintas regiones de los pétalos (8, 3 y 6) no evidenció diferencias entre sí ni respecto al control de hojas silvestres. Estos resultados indican que el incremento en la expansión celular observado en el mutante *Graf* no se debe a aumentos en los niveles de ploidía (figura 19).

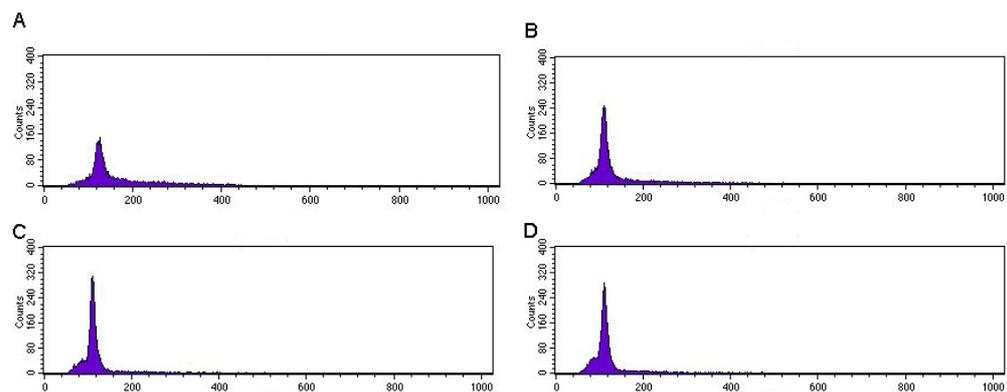


Figura 19: Citometría de flujo de células de los pétalos del mutante *Graf*.

Histograma del contenido relativo de ADN después del análisis de núcleos, teñidos con Ioduro de propidio, aislados desde las diferentes regiones de los pétalos de *Graf* comparados con los núcleos de hojas silvestres A) hojas silvestres, B) región 8 del pétalo, C) región 3 del pétalo y D) región 6 del pétalo dorsal del mutante simple *Graf*. El eje de las ordenadas muestra la intensidad de la señal proporcional al número de núcleos y las abscisas el contenido relativo de ADN nuclear (FL2-A). 2C indica los núcleos con contenido diploide de ADN.

3.1.5 Interacción entre los genes *Graf* y *co*

Los mutantes *Graf* y *co* muestran fenotipos conceptualmente opuestos. *Graf* exhibe un incremento en el tamaño de los órganos florales así como en el de las células de los pétalos, *co* sin embargo posee órganos más pequeños y el área celular de los pétalos disminuye de forma significativa.

En los órganos sexuales ambos mutantes provocan variación en el número de células. Paralelamente, en el caso de los estilos, también se observan fenotipos opuestos en ambos mutantes. Mientras en *Graf* se produce un aumento en el número de células, en *co* hay una reducción. En contraste los estambres de ambos mutantes presentan un incremento en el número de células. Los resultados sugieren que estos genes están relacionados con la regulación de la expansión celular en los pétalos, y con la división celular en los órganos sexuales.

Con el propósito de dilucidar si ambos genes participan en una misma vía de regulación se procedió a obtener dobles mutantes entre *co* y *Graf*. Para ello se partió de una población F₂ proveniente del cruce entre los parentales *co* en fondo genético Sippe50 y el mutante *Graf* proveniente de una F₃ en fondo genético 165E. En la población segregante de 21 plantas totales se obtuvieron 13 plantas con fenotipo *Graf*, 4 de fenotipo silvestre, 1 de fenotipo compacta y 3 de fenotipo nuevo, putativo doble mutante.



Figura 20: Fotografías de los dobles mutantes *Graf co*.

De izquierda a derecha: flores silvestres, mutante simple *Graf*, mutante simple *co* y doble mutante *Graf co*: A) vista lateral, B) vista dorsal; C) vista frontal del silvestre (izquierda) y el doble mutante *Graf co* (derecha).

Las pruebas de χ^2 no indican diferencias significativas ($p > 0.95$) respecto a los valores esperados para una segregación normal. Estos dobles mutantes fueron identificados dado que presentan un perianto silvestre, sin embargo, los estambres sobresalen por encima de los pétalos al igual que *co* (figura 20). Este resultado evidencia que se produce un rescate del fenotipo de la expansión del pétalo aunque los estambres y el tubo mantuvieron las proporciones prácticamente como en *co*. De estos resultados podemos concluir que *Graf* es epistático para *co* en cuanto al tamaño de los pétalos. En relación con los otros órganos sería necesario un análisis más detallado de los parámetros para determinar la posible relación entre ambos genes.



3.2 FUNCIÓN DE *CO* ANTE EL CAMBIO DE IDENTIDAD DE ÓRGANO

El análisis de los dobles mutantes entre *CO* y el gen de identidad *DEF* en esta sección permitió analizar dos aspectos, uno relacionado con la especificidad de la acción de *CO* respecto a identidad o ubicación de los órganos, el otro con la participación de ambos genes en la regulación del tamaño de los órganos.

El análisis del mutante *co* sugiere que el efecto de este gen varía dependiendo de los órganos analizados. Para determinar si la especificidad del gen depende de la identidad del órgano o de su posición, se realizó un doble mutante con un gen de identidad de órgano de clase B, el morfoalelo nicotianoides del gen *DEFICIENS* (*def^{nic}*) (Schwarz-Sommer *et al.* 1992). Este mutante afecta la identidad del segundo y tercer verticilo de la flor y además reduce significativamente el tamaño de los órganos florales. El gen mutado presenta un cambio puntual en el dominio de unión a ADN que no provoca una pérdida total de función y la expresión de *DEF* se reduce (Schwarz-Sommer *et al.* 1992). Dado que *DEF* no solo produce cambios de identidad en los órganos florales sino que además provoca variaciones en el tamaño de los órganos, los dobles mutantes permitirán analizar la relación, si existe, entre los genes *CO* y *DEF* respecto a la regulación del tamaño.

El doble mutante *co def^{nic}* fue obtenido a partir de la autopolinización de una planta *co*, heterocigota para *def^{nic}*, proveniente de una población F₂ de un cruce *co* x *def^{nic}*. Las plantas obtenidas, 252, (de las cuales 54 presentaron el fenotipo del doble mutante y 198 el de *co*) segregaron en una proporción 3:1 (*co*: *co def^{nic}*) y las pruebas de χ^2 indicaron que no hay diferencias significativas entre la segregación observada y la esperada para una segregación al azar ($p > 0.1$) (figura 21).

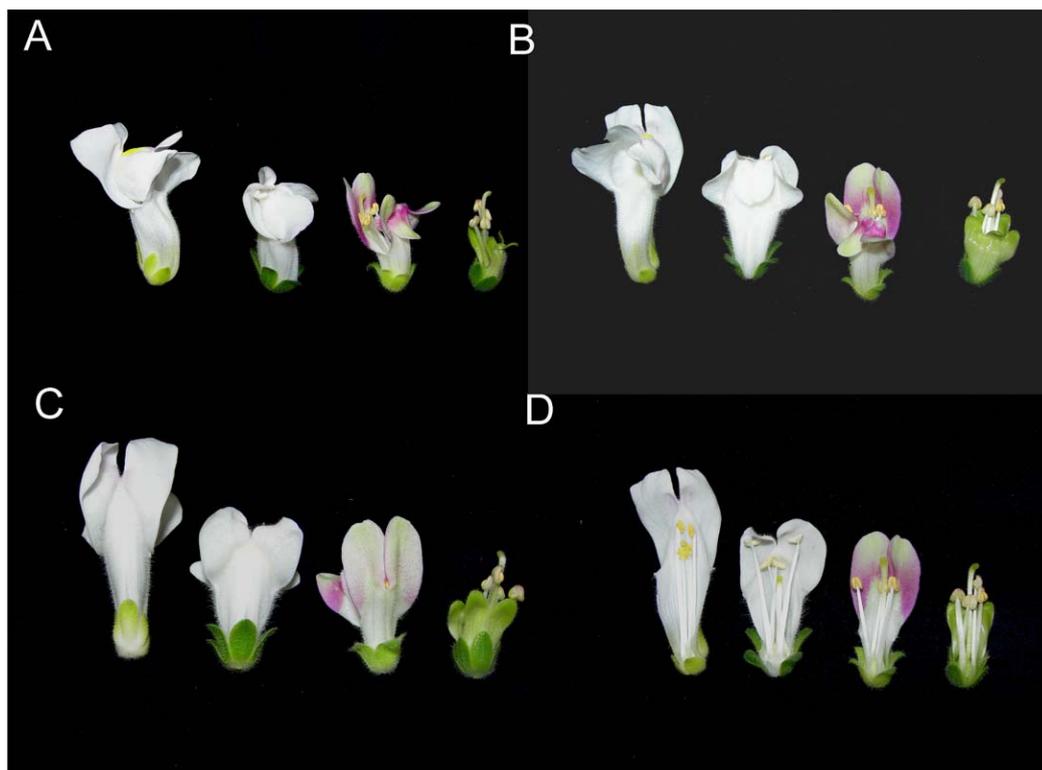


Figura 21: Fotografías de los dobles mutantes $def^{nic} co$.

De izquierda a derecha se muestran: flor silvestre, mutante simple co , mutante simple def^{nic} , y doble mutante $def^{nic} co$. A) Vista Lateral, B) Vista frontal, C) Vista dorsales y D) Corte transversal.

3.2.1 Análisis de tamaño de órganos y células

Los parámetros florales fueron analizados comparando el fenotipo del doble mutante $co def^{nic}$ con el mutante simple def^{nic} y el efecto producido por el mutante simple co frente a silvestre (Tabla 8). Los análisis morfológicos del mutante def^{nic} realizados por Schwartz-Sommer *et al.* (1992) demostraron que los pétalos presentan cambios de identidad con características sepaloideas, mientras los estambres son carpeloideas. Además los mutantes def presentaron flores más pequeñas, el morfoalelo def^{nic} provocó una reducción mayor respecto a los otros morfoalelos en el tamaño de los pétalos.

i. Sépalos

En el doble mutante el efecto de co se vio influenciado por la mutación def^{nic} , se observa un incremento en el tamaño de los sépalos respecto al mutante simple def^{nic} . Sin embargo, los mutantes simples co reducen el tamaño de estos órganos comparados silvestre (Tabla 8).



ii. Segundo verticilo pétalos-sepaloides

A simple vista puede observarse una reducción en el lóbulo del perianto (figura 21). En la mayoría de los parámetros analizados en los pétalos la reducción de tamaño causada por *co* en el doble mutante fue sinérgica respecto a la del mutante simple *co*. Es decir, que la reducción de los parámetros de los pétalos causada por *co* es mucho más pronunciada en presencia de la mutación *def^{nic}* (Tabla 8). Esto sugiere que ambos genes pueden participar en un mismo proceso en la regulación del tamaño de estos órganos pero en vías paralelas.

Consideramos que el análisis de los órganos que presentan cambios de identidad en el doble mutante (segundo y tercer verticilo) nos permiten definir la especificidad del gen *CO* respecto a identidad o ubicación de los órganos. Por otro lado, el órgano que realmente dará esa información será el que cumpla los siguientes requisitos: En primer lugar que sea afectado por la mutación simple *co*; en segundo lugar que cambie de verticilo en el doble mutante; por último, que el efecto de la mutación en este verticilo sea diferente a la provocada en el verticilo normal. Estas condiciones se cumplen para el tercer verticilo del doble mutante. En este se encuentra erróneamente un órgano carpeloide normalmente ubicado en el cuarto verticilo siendo el efecto de *co* diferente en los verticilos tres y cuatro.

iii. Tercer verticilo-estambres carpeloides

El efecto de *co* en el tamaño del órgano carpeloide del tercer verticilo del doble mutante fue el mismo que en el carpelo del mutante simple *co* (tabla 8). Esto significa que el efecto de *co* en los carpelos es independiente del verticilo en que se encuentren y por lo tanto es específico de la identidad de órgano (tabla 8).

Sin embargo, de los análisis del tamaño celular no se desprende la misma conclusión. El efecto de *co* en el doble mutante fue el de reducir el área celular en los órganos carpeloides del tercer verticilo, el mismo efecto observado en los estambres del mutante simple *co* (tabla 9, figura 22-A, B). Por esta razón, el cambio de identidad no pareció tener influencias en el efecto a nivel celular causado por la mutación *co*.

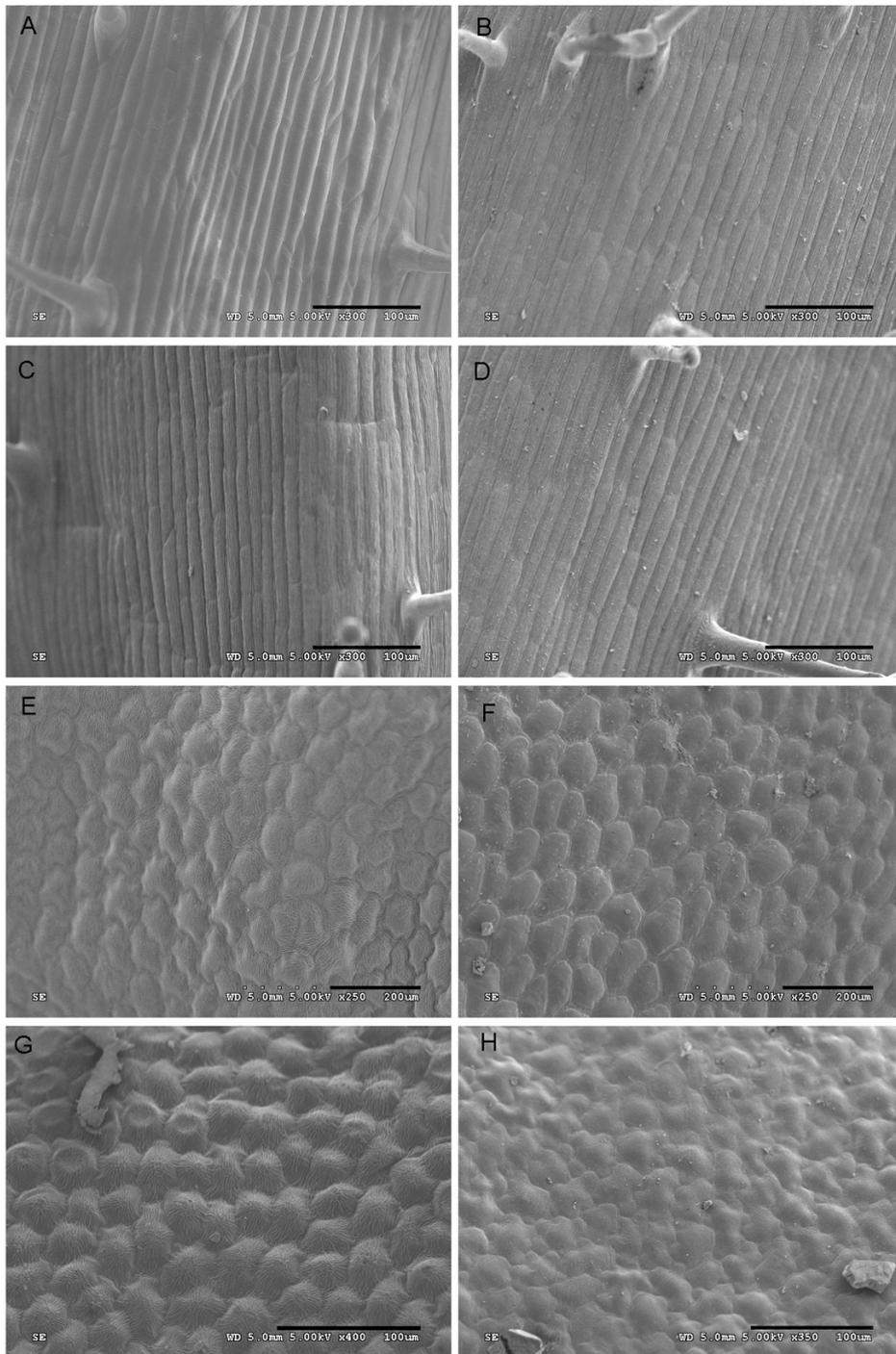


Figura 22: Micrografías electrónicas de células de los órganos de la flor de *def^{nic}* y *def^{nic} co*

Células de los mutantes *def^{nic}* (izquierda), y *def^{nic} co* (derecha) de A, B) tercer verticilo; C, D) gineceo; E, F) región 6 del pétalo dorsal, G, H) región 5 del pétalo dorsal. Las barras en el margen inferior derecho equivalen a 100μm.



iv. Gineceo

El mutante simple *co* reduce alrededor de un 10%, el tamaño de estos órganos respecto a silvestre, el doble mutante también presenta reducciones similares, por lo que la mutación *co* no parece verse afectada por el fondo genético de *def^{nic}* (tabla 8). El análisis del área celular reveló que la mutación *def^{nic}* provoca cambios en los efectos de la mutación simple *co*. Los estilos en el doble mutante *def^{nic} co* incrementan el área celular sin embargo, no se observaron variaciones en el mutante simple *co* (tabla 9, figura 22-C, D).

3.2.2 Análisis de identidad de órganos

El análisis del mutante simple *co* sólo reveló cambios en las proporciones florales, pero la identidad de los órganos no se vió afectada. Sin embargo, en el caso de los pétalos del doble mutante, se observó mayor pérdida de identidad que la producida por el mutante simple *def^{nic}*. Estos órganos mostraron un fenotipo sinérgico respecto a *def^{nic}*, con mayor identidad sepaloide por presentar un color verdoso semejante a los sépalos y ausencia absoluta de otros pigmentos (figura 21).

En cuanto a la morfología celular *def^{nic}* presenta en el segundo verticilo células similares a las piezas de puzzle típicas de los sépalos. Sin embargo, se observa, al igual que en pétalos normales, un gradiente dorso-ventral de células ovaladas y planas que gradualmente aumentan su volumen hasta formar células cónicas aunque estas son menos pronunciadas que las silvestres. En el caso del doble mutante la pérdida de identidad fue aún más acentuada (figura 22-E a H). No se encontraron células cónicas a lo largo de toda la expansión del lóbulo del pétalo. La morfología de las células cónicas está relacionada con la expresión de el gen *MIXTA* y por lo tanto *co* podría provocar cambios en la expresión de estos genes (Martin *et al.* 2002; Noda *et al.* 1994).

En el caso de los órganos sexuales la mutación *co* no afectó la identidad, puesto que no se observaron diferencias a nivel de identidad entre el doble mutante y el mutante simple *def^{nic}*. Tanto *def^{nic}* como *def^{nic} co* causaron el mismo efecto en la identidad celular del filamento del estambre con células rectangulares similares a las del carpelo.

Tabla 8: Comparación de los parámetros florales entre el silvestre y los mutantes *def^{nic}*, *co* y *def^{nic}-co*¹.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---|-----------|-------------|------------|-----------|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|
| <i>def^{nic}</i> ² | 8,66±4,86 | 20,52±2,037 | 11,19±1,93 | 6,35±0,57 | 7,07±0,51 | 20,80±2,26 | 15,82±2,92 | 11,69±2,33 | 16,60±1,30 | 19,31±2,32 |
| <i>def^{nic}-co</i> | 5,34±0,52 | 11,36±1,67 | 8,06±1,03 | 7,16±0,84 | 5,71±0,51 | 12,01±1,92 | 7,62±1,46 | 8,13±0,83 | 14,84±0,64 | 16,96±0,89 |
| % ³ <i>co</i> vs. silvestre | -15,07*** | -23,64*** | -35,01*** | -16,48*** | -14,03*** | -28,37*** | -26,93*** | -45,09*** | 1,40 | -8,68*** |
| % ⁴ <i>def^{nic}-co</i> vs. <i>def^{nic}</i> | -38,38* | -44,64*** | -27,93*** | 12,80* | -19,26*** | -42,25*** | -51,82*** | -30,37** | -10,62** | -12,17* |

1 Número total de mediciones para cada parámetro = 10

2 Valores promedio (mm) ± Desviación Estándar

3 Comparación tomando como referencia al silvestre

4 Comparación tomando como referencia al mutante

simple *def^{nic}*

* P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001

Tabla 9: Comparación del área celular de estambres y estilos entre el silvestre y los mutantes *def^{nic}*, *co* y *def^{nic-co}*¹.

| | estambre ² | estilos ² |
|---|-----------------------|----------------------|
| silvestre | 3568,09±154,43 | 2221,99±70,49 |
| <i>co</i> | 2948,34±107,46 | 2123,15±73,44 |
| <i>def^{nic}</i> | 2213,40±96,5 | 1466,90±76,20 |
| <i>def^{nic-co}</i> | 1940,5±76,6 | 1842,2±70,3 |
| % ³ <i>co</i> vs. silvestre | -17,37** | -4,45 |
| % ⁴ <i>def^{nic-co}</i> vs. <i>def^{nic}</i> | -12,33* | 25,58*** |

1 Número total de mediciones = 50

2 valores promedio (μm^2) \pm el error típico

3 Comparación tomando como referencia al silvestre.

4 Comparación tomando como referencia al mutante simple *def^{nic}*

* P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001

Resumiendo destacamos que *co* participa en la regulación del tamaño de los órganos de la flor sépalos, pétalos, estambres y gineceo, causando cambios principalmente a nivel de la expansión celular (pétalos y estambres) y división celular (estambres y estilos). Los análisis del doble mutante permiten deducir que su función en cuanto al control del tamaño de gineceo es específica de identidad. Sin embargo, los cambios observados a nivel de expansión y división celular no presentaron un patrón específico. Se observó además un efecto sinérgico de compacta en la identidad y tamaño del pétalo respecto al fenotipo de *def* lo que sugiere que ambos genes pueden afectar la identidad y el tamaño por rutas paralelas. El análisis del tamaño de los sépalos y gineceos sugiere una posible interacción entre ambos genes en cuanto a la regulación del tamaño de los órganos.

3.3 EFECTO FENOTÍPICO Y MOLECULAR DE LA INHIBICIÓN DE LA EXPANSIÓN CELULAR EN PÉTALOS

Aunque es bien conocido que los genes de identidad de órgano son los principales responsables de la morfología final de los órganos, no está claro, al menos en el caso de las plantas, que haya genes blancos que sean los responsables de la modulación del tamaño y forma. Tomando como paradigma la maduración del tomate, en la que diversos programas genéticos discretos y paralelos se activan como consecuencia de la señal de etileno (Giovannoni 2004), se planteó la pregunta de cuantos programas genéticos existen que dan lugar a la organogénesis y que relaciones existen entre ellos. En este contexto, tanto división celular como expansión se consideran programas subrogados a la identidad del órgano. Pero experimentos en células animales han demostrado una relación de control mutuo entre la transcripción de genes MADS y la dinámica de actinas proceso relacionado con expansión y división celular (Posern, Sotiropoulos, & Treisman 2002; Sotiropoulos *et al.* 1999).

Como se deduce de los resultados descritos previamente, el gen *CO* afecta la expansión celular y la identidad del pétalo. Estas funciones podrían ejercerse por vías independientes o por una misma vía.

Por lo tanto se propuso analizar el efecto de la inhibición de la expansión celular, por tratamientos bioquímicos con citocalasina D, sobre la identidad. Este compuesto interrumpe la polimerización de los filamentos de actina y su efecto es reversible. Dado que los únicos órganos afectados por *co*, tanto en área celular como en tamaño total e identidad, fueron los pétalos, se analizó el efecto en estos órganos.

Los tratamientos se realizaron diez veces consecutivas desde las inflorescencias emergentes. En cuanto a la morfología no se observaron cambios



de identidad en los pétalos, pero sí una reducción en el tamaño de los órganos (Figura 23-A y B). El pétalo dorsal es más corto y más estrecho en un 14% y un 24% respectivamente, también el pétalo ventral es más angosto en casi un 40% respecto del control. Sin embargo se observó un incremento significativo en el ancho del tubo de un 34% respecto al control. Los otros parámetros florales no cambiaron respecto al control (tabla 10).

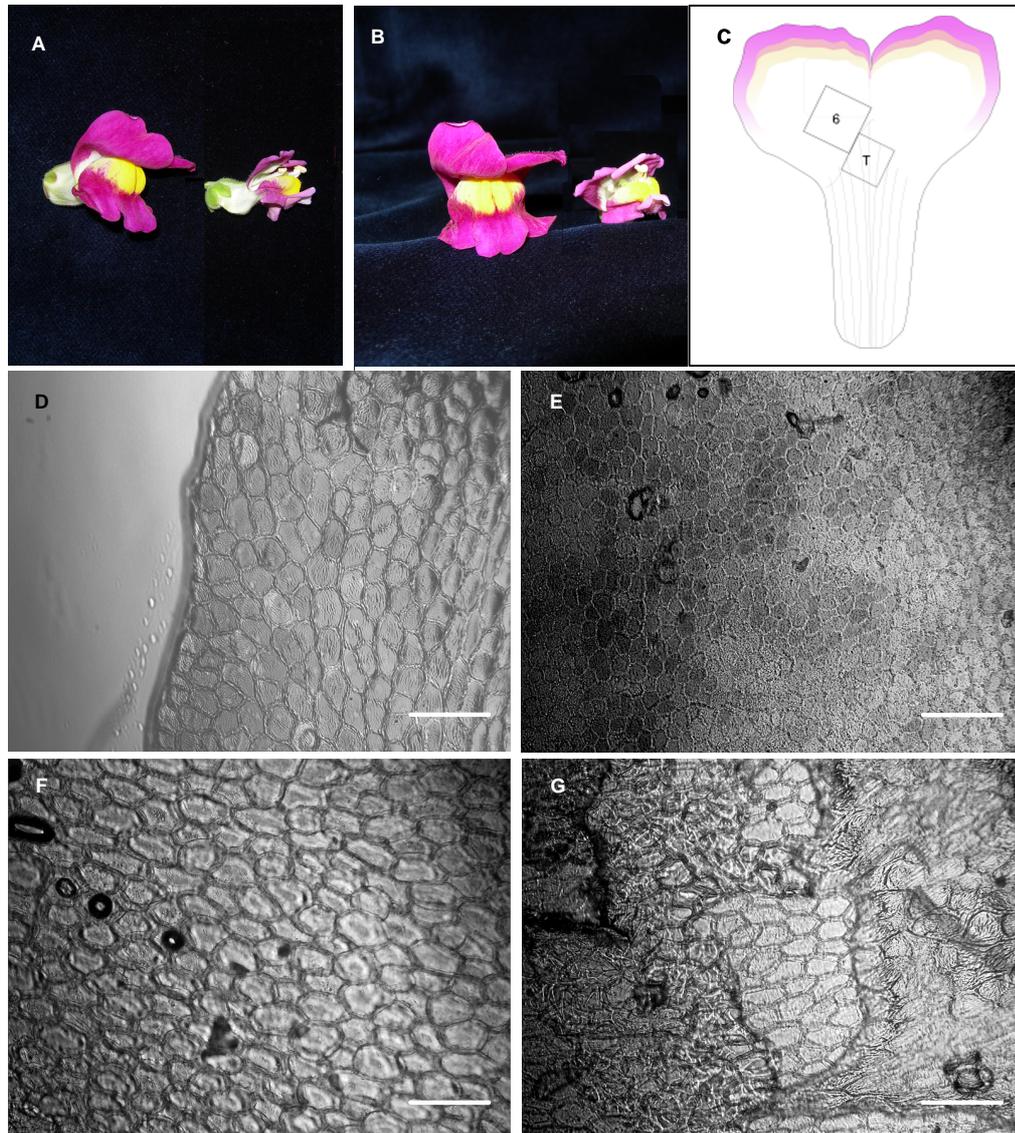


Figura 23: Efectos del tratamiento de inhibición de la expansión celular.

Fotos de flores silvestres control (izquierda) y tratadas con citocalasina D (CD) (derecha) A) vista lateral, B) vista superior; C) Esquema de las regiones celulares analizadas: 6, indica la región de células planas del lóbulo del pétalo y T la región de células del tubo del perianto. Fotografías de microscopía óptica de las células de la región 6 del pétalo en D) flores silvestres control, E) flores tratadas con CD; región T del tubo del perianto en F) flores silvestre control; G) flores tratadas con CD. Todas las imágenes de microscopía fueron observadas al mismo aumento (200X), la barra inferior es equivalente a 100 μm

Para confirmar el funcionamiento del tratamiento se analizó el área celular en la superficie de los pétalos seleccionando la región 6 de células planas del pétalo dorsal, según lo descrito en el capítulo anterior, y en una región del tubo (figura 23-C), observándose una disminución significativa de un 50% aproximadamente como se muestra en la figura 23-D, E y la tabla 11.

Los resultados indican que la inhibición de la expansión celular de forma exógena no produce cambios visibles en la identidad de los pétalos, provocando la disminución en el tamaño de los órganos. Estos experimentos sugieren que la identidad de los pétalos es independiente de las variaciones en la expansión celular.

Tabla 10: Comparación de los parámetros florales entre las plantas silvestres control y las tratadas con citocalasina D 1.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|---------------------------|------------|------------|------------|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| control ² | 16,50±1,10 | 31,65±2,24 | 21,17±3,10 | 6,92±0,53 | 11,23±0,37 | 37,23±2,08 | 23,67±1,87 | 28,47±1,67 | 23,48±1,13 | 21,48±1,65 | 14,48±1,18 |
| silvestre+cd ² | 15,55±0,82 | 30,03±2,20 | 19,93±2,45 | 7,50±0,56 | 15,13±1,39 | 31,65±1,32 | 17,88±2,61 | 17,38±2,08 | 22,90±0,93 | 20,53±0,86 | 10,68±0,81 |
| % ³ | -5,76 | -5,11 | -5,83 | 8,43 | 34,72*** | -15,00*** | -24,44** | -38,93*** | -2,48 | -4,42 | -26,24*** |

1 Número total de mediciones para cada parámetro = 10

2 valores promedio (mm) ± la desviación estándar

3 considerando las plantas control 100%

***p<0,001, **p<0,01

cd: citocalasina D

Tabla 11: Comparación del área celular del pétalo entre plantas tratadas con citocalasina D y plantas control¹.

| | Lóbulo del pétalo | Tubo |
|-------------------------------|-------------------|----------------|
| control ² | 6104,15±301,55 | 7755,25±307,45 |
| CD ^{2,3} | 3106,13±180,88 | 3678,73±206,08 |
| % ⁴ CD vs. control | -49,11*** | -52,56*** |

1 Número total de mediciones = 30

2 valores promedio (µm²) ± error típico

3 Plantas sometidas al tratamiento con citocalasina D

4 considerando las plantas control 100%

***p<0,001

3.4 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE IDENTIDAD DEF^{nic}

Dado que el análisis fenotípico sugiere que tanto DEF como CO participan en la regulación del tamaño y en la identidad de los órganos florales, se realizaron análisis de los niveles de transcripción de DEF con el propósito de indagar en la posible interacción entre las vías que regulan ambos genes.

Por medio de PCR en tiempo real se ha cuantificado la expresión del gen DEF en inflorescencias en el estadio 12 de desarrollo (Vincent *et al.* 2004). Los ensayos se realizaron en diferentes fondos genéticos: en silvestre, mutante simple co y diferentes morfoalelos de DEF : def^{nic} , def^{chlo} y el heterocigoto para ambos alelos $def^{nic/chlo}$, tomando como referencia al gen $RAN3$ (Bey *et al.* 2004; Gandikota *et al.* 2007; Hackbusch *et al.* 2005). Se observó una reducción significativa de la expresión de DEF en el mutante co con un factor de expresión de 0,18 respecto al silvestre. El alelo def^{nic} causó una reducción más pronunciada con un factor de expresión de 0,09, el alelo def^{chlo} fue aún más drástico con un factor de expresión de 0,05. El mayor efecto reductor se observó en el doble heterocigoto para ambos alelos def^{nic} y def^{chlo} con un factor de expresión igual a 0,03 (figura 24).

ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE DEF

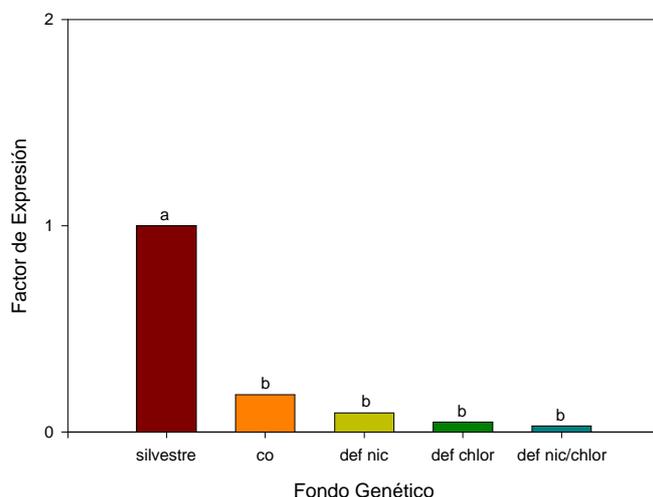


Figura 24: Niveles de expresión de DEF .

Gráficos correspondientes a los factores de expresión de DEF , respecto al control utilizando el gen de referencia $RAN3$ en inflorescencias de plantas silvestres, plantas silvestres tratadas con CD, mutantes simples co , def^{nic} , def^{chlo} y $def^{nic/chlo}$. (Las letras diferentes indican un cambio de expresión significativo).

Estos resultados coinciden con los análisis realizados previamente mediante Northern (Schwarz-Sommer *et al.* 1992).

El análisis de estos resultados y de los doble mutantes def^{nic} co sugiere



que el gen compacta interviene en la identidad de los pétalos por una vía paralela a la de *DEF*. Sin embargo, parecen interactuar dada la variación en los niveles de transcripción de *DEF* presente en el mutante simple *co*. La mutación simple *co* no exhibe cambios de identidad, aunque los niveles de transcripción de *DEF* disminuyeron de forma significativa. Probablemente esta disminución no fue suficiente para provocar cambios fenotípicos dado que se requiere superar un umbral mínimo de reducción (Zachgo *et al.* 1995)

4 DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

4.1 ACCIÓN DE *GRAF* Y *CO* EN EL TAMAÑO DE LOS ÓRGANOS DE LAS PLANTAS

Los análisis del cuerpo vegetativo y reproductivo de los mutantes *Graf* y *co* muestran que ambos genes participan en la regulación del tamaño de los órganos florales afectando de forma variable la división y la expansión celular, dependiendo del órgano y/o verticilo. El efecto de *co* es pleiotrópico y afecta a todos los órganos laterales analizados. *Graf* no parece ser pleiotrópico, dado que en los parámetros vegetativos solo produce variaciones puntuales.

El análisis de segregación de ambos mutantes confirma que la mutación *Graf* es dominante y *co* es recesiva. El gen *CO* sería un inductor del crecimiento y *GRAF*, al ser dominante, puede ser de pérdida o ganancia de función y por lo tanto promotor o represor del crecimiento. Ambos genes son modificadores de la expansión celular en los pétalos. En el caso de *Graf* se ha confirmado que el aumento en la expansión celular observado en los mutantes no es el resultado de incremento en los niveles de ploidía. Aunque los aumentos en los niveles de ploidía pueden provocar incrementos en el tamaño celular, no necesariamente las células con mayor expansión son poliploides (Castellano *et al.* 2001; Melaragno *et al.* 1993). El incremento en el tamaño celular puede ser causado por diversas razones incluyendo aumento del volumen vacuolar (Kondorosi *et al.* 2000), modificación en genes relacionados con la biosíntesis de la pared celular, como es el caso de la expansina (Fleming *et al.* 1997; Lee & Kende 2001; Link & Cosgrove 1998) y defectos en la biosíntesis y/o percepción de hormonas como giberelinas (Cheng *et al.* 2004), brasinosteroides (Azpiroz *et al.* 1998), etc.

El doble mutante entre ambos genes presenta un fenotipo similar al silvestre, con excepción de los estambres que sobresalen por encima del perianto al igual que en el mutante simple *co*. El rescate del fenotipo de la expansión del pétalo se puede interpretar como una epistasis de *Graf* sobre *co*

y, por lo tanto, indica que ambos genes participan en una misma vía en el control del tamaño de estos órganos. Dado que el mutante *Graf* es dominante, el gen *CO* podría ser tanto regulador positivo como negativo de *Graf*, dependiendo de la función de éste último.

Para comprender la posible interacción entre ambos genes en los órganos sexuales sería necesario un análisis más detallado de los parámetros.

4.2 ¿CO ESPECÍFICO DE IDENTIDAD O VERTICILO?

Para determinar si la acción de *CO* es específica de la identidad de órgano se analizó el fenotipo de los estambres en el doble mutante. En el mutante simple *def*, los estambres sufren una pérdida de identidad adquiriendo características carpeloides. La mutación *co* tiene efectos diferentes en estambres y gineceo, tanto a nivel de tamaño de órgano como celular.

Los órganos carpeloides en el tercer verticilo del doble mutante disminuyen su tamaño de la misma manera que los carpelos con ubicación correcta. Esto sugiere que la mutación *co* afecta al órgano independientemente de su ubicación, y por lo tanto responde a la identidad del mismo. Sin embargo, cuando se analiza el comportamiento celular, los órganos carpeloides no responden a la identidad sino a la ubicación presentando una menor expansión celular comparable a la producida en los estambres del mutante simple *co*. Por lo tanto, para poder deducir la especificidad de este gen, se requiere tener mayor conocimiento de la forma de acción del gen *co*.

4.3 *CO* Y *DEF* CONTROLAN EL TAMAÑO DE LOS PÉTALOS POR VÍAS PARALELAS

Como se ha mencionado anteriormente los mutantes *def^{nic}* no sólo presentan cambios en la identidad de los órganos florales sino que afectan el tamaño floral, produciendo flores más pequeñas (Schwarz-Sommer *et al.* 1992).

Los análisis fenotípicos y celulares de gineceo y sépalos muestran que el efecto de *co* se ve afectado por la presencia de la mutación *def^{nic}*. En cuanto a los pétalos, se observó un efecto sinérgico en el doble mutante de reducción en el tamaño de los órganos. Estos resultados por lo tanto indican que *DEF* y *CO* podrían participar en rutas paralelas en la regulación del tamaño de los pétalos.

Sin embargo, los análisis de cuantificación de los niveles de expresión de *DEF* muestran una regulación negativa del gen *DEF* en meristemas florales jóvenes de los mutantes *co* lo que sugiere que ambas vías, aunque paralelas, están relacionadas.

Existen evidencias de genes que afectan tanto la expresión de los genes



de identidad de órganos florales como la de genes involucrados en la regulación de la expansión, polaridad e identidad de los órganos. Por ejemplo el gen *UFO* regula la expresión de los genes de clase B y C y su sobre-expresión incrementa el tamaño de los órganos por una mayor proliferación celular, sin embargo ambas vías son independientes (Krizek *et al.* 1996). El gen *SUP*, otro ejemplo de genes que regulan tanto la identidad como la proliferación y/o expansión celular, es un represor de *AP3* y *PI* en el cuarto verticilo (Bowman *et al.* 1992; Sakai *et al.* 1995; Schultz *et al.* 1991) y además su sobre-expresión produce plantas enanas y disminución en el tamaño de las flores en *Arabidopsis*, petunia y tabaco. La causa de la reducción en el tamaño es diferente dependiendo de la planta modelo utilizada. Así, *Arabidopsis* reduce el número de células mientras tabaco y petunia muestran variaciones tanto a nivel de la elongación como de la proliferación celular (Bereterbide *et al.* 2001; Kater *et al.* 2000; Nakagawa *et al.* 2004). Otros genes relacionados con la determinación de la polaridad de los órganos *SEU* y *LEU* intervienen en el control de los genes *AG* en *Arabidopsis* así como en el control de la proliferación celular de forma independiente (Franks *et al.* 2002; Franks *et al.* 2006; Liu *et al.* 1995). Por lo tanto la acción de *CO* en la regulación del tamaño de los órganos florales y la modificación en los niveles de expresión de *DEF* podrían producirse por vías independientes.

4.4 *CO* AFECTA LA IDENTIDAD DE LOS PÉTALOS POR UNA VÍA PARALELA A LA DE *DEF*

El gen *DEF*, por ser un gen de identidad de clase B, afecta la identidad del segundo y tercer verticilo de la flor, pétalos y estambres. La acción de *CO* en los análisis de los dobles mutantes revela que el mutante *co* es sinérgico sobre *def^{nic}* en cuanto a la identidad de los pétalos. Presentando una conversión homeótica más pronunciada que el mutante simple *def^{nic}* y careciendo de células cónicas en los pétalos. Esto sugiere que el gen *CO* además de intervenir en la regulación del tamaño de los órganos participa, en una vía paralela a *DEF*, en la determinación identidad de los pétalos.

Estudios previos de recuperación de la función del gen *DEF* en mutantes *def^{nic}* muestran que éste gen influye en la transformación de células planas y verdes en cónicas y pigmentadas en estadios tardíos del desarrollo. Por lo tanto *DEF* no solo interviene en la identidad de los órganos sino en la especificación de la morfología celular probablemente a través de la regulación de los genes *MIXTA* (Coen ES & Carpenter R 1992; Martin *et al.* 2002). La disminución en la cantidad de transcritos *DEF*, en los mutantes *co*, muestran que el gen *compacta* es capaz de regular la expresión de los genes de identidad. Sin embargo, la ausencia de cambios de identidad observada en los mutantes *co*

puede deberse a que el gen *DEF* regulado transcripcional y post-transcripcionalmente requiere niveles mínimos de expresión por encima de los cuales no causa cambios fenotípicos (Zachgo *et al.* 1995).

Los tratamientos con citocalasina D no evidenciaron cambios en la identidad de los pétalos lo que proponen que las vías que definen la identidad de los pétalos son independientes de la regulación de la expansión celular. Así, probablemente, los cambios de identidad producidos por el mutante *co* sean independientes de las variaciones en la expansión celular.

El crecimiento de los pétalos, así como el de cualquier órgano se produce en las primeras fases del desarrollo por división y expansión celular y se completa por la expansión celular (Anastasiou *et al.* 2007b). El tamaño del pétalo se ve afectado tanto por cambios en la expansión celular como por la división. Así lo demuestran los mutantes del gen *CINCINNATA* (*CIN*) los cuales regulan el crecimiento del pétalo a través del control de la proliferación celular. Curiosamente los mutantes *cin* también tienen defectos en la morfología de las células de los pétalos con células planas en lugar de las típicas células cónicas (Crawford *et al.* 2004). Esto conduce a pensar que ambos genes: *CIN* y *CO*, relacionados con el crecimiento de los órganos, formarían parte de la coordinación necesaria entre crecimiento y desarrollo de los órganos.

En el caso de identidad de estambres *def^{nic}*, parece ser epistático para *co* y por lo tanto o bien *co* no está involucrado en la identidad de estos órganos o su acción está aguas abajo de *deficiens*.

En resumen se pueden plantear dos grandes vías en relación con los pétalos, en las cuales está involucrado *CO*: regulación del tamaño e identidad de los órganos florales. La sinergia observada para el fenotipo en pétalos sugiere la presencia de vías redundantes en el control de tamaño e identidad mediadas por *DEF* y *CO*. Sin embargo, debido al cambio observado en los niveles de transcripción de *DEF* en los mutantes simples *co*, cabe suponer que ambos genes y/o las rutas reguladas por ellos interactúan entre sí. Los tratamientos de inhibición exógena de la expansión celular proponen que la identidad es independiente de las variaciones del tamaño celular y por lo tanto sugiere que la vía que afecta la expansión celular es independiente de la que regula la identidad. En el esquema de la figura 25 mostramos un posible modelo para el control de tamaño e identidad de los pétalos que se ajusta a estas observaciones.

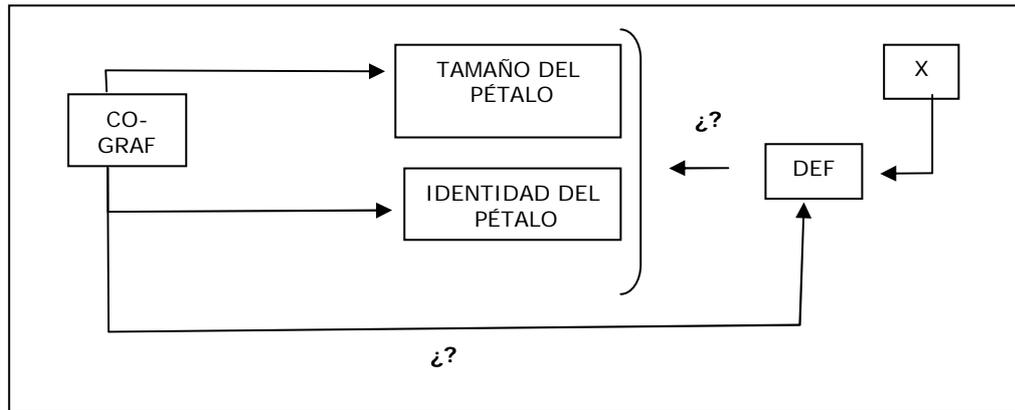


Figura 25: Hipótesis de interacción entre *DEF*, *GRAF* y *CO*.

Esquema explicativo de la posible interacción entre los genes analizados en el presente capítulo en el control del tamaño y la identidad del pétalo. *GRAF* y *CO* actuarían en una misma vía de regulación del tamaño la que parece ser independiente de la vía que controla la identidad de los pétalos. *DEF* afecta tanto el tamaño como la identidad sin embargo no podemos afirmar si ambas vías son independientes. Aunque los análisis de los dobles mutantes sugieren que las vías de control de tamaño e identidad mediadas por *CO* son paralelas a las reguladas por *DEF*, se destaca una interacción entre ambas vías, dado que los niveles de transcripción de *DEF* varían de forma significativa en los mutantes simples *co*.



VI EI GEN FORMOSA RESTRINGE EL CRECIMIENTO DE LOS ÓRGANOS FLORALES MODIFICANDO LA ACTIVIDAD DE LA DIVISIÓN CELULAR.

1 RESUMEN

En el presente capítulo se analiza el efecto fenotípico del mutante *fo* con el propósito de comprender la función del gen *FO* en la regulación del tamaño floral.

El análisis de poblaciones segregantes demuestra que el mutante *fo* es recesivo, asumiendo pues que es un alelo de pérdida de función. Afecta únicamente a los órganos florales sin producir variaciones en los parámetros vegetativos analizados.

Los análisis de tamaño de órgano florales y de área celular muestran que el mutante *fo* afecta tanto a la regulación del tamaño de los órganos como a la expansión celular, de forma variable según el órgano y/o verticilo. El gen *FO* reprime la expansión celular en pétalos y estilos, pero no afecta los estambres. En el caso del segundo verticilo, se observó además, que el mutante *fo* solo afecta a la zona de las células cónicas y se demostró que tal reducción esta relacionada con el aumento en la expresión del gen *BIGPETALp* (*BPEp*). Por otro lado, se observó que *fo* provoca un incremento en el número de células de todos los órganos de la flor. Esto podría ser consecuencia de un aumento observado de los niveles de expresión de *AINTEGUMENTA* en los meristemas de inflorescencia, así como de una inducción de genes relacionados con la actividad del ciclo celular en los pétalos.

Los análisis de los dobles mutantes *ple fo* sugieren que *FO* no es específico de identidad de órgano. Además, se observa que el fenotipo de *fo* presenta es sinérgico en el fondo genético de *ple* lo implicaría la participación de ambos genes en vías paralelas que controlan el tamaño de la flor.

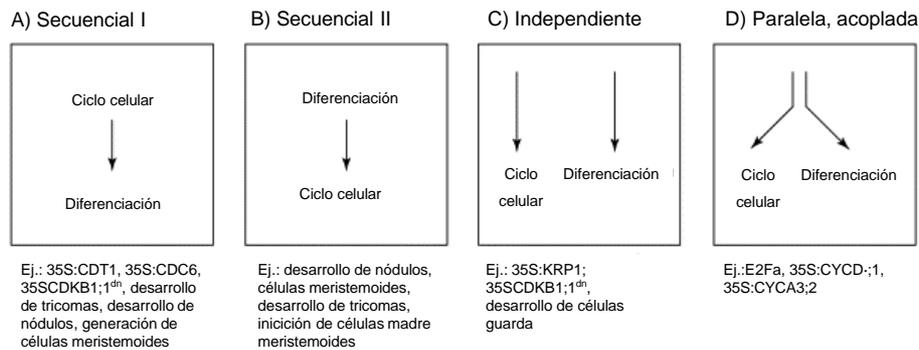
2 INTRODUCCIÓN

2.1 RELACIÓN ENTRE LA DIVISIÓN CELULAR Y LA DIFERENCIACIÓN

Los modelos sobre mecanismos de compensación mencionados en la introducción general postulan que tras la inhibición y/o reducción de la división celular se produce una mayor expansión celular que compensa el defecto, dando lugar a tamaños normales. Son pues, modelos que postulan una relación estrecha entre los procesos de división, desarrollo y diferenciación (Doonan 2000; Hemerly *et al.* 1995; Horiguchi *et al.* 2005; Potter & Xu 2001).

La relación entre el control de la actividad del ciclo celular con respecto a la diferenciación puede producirse de diferentes maneras. Así, trabajos relativos al desarrollo de estomas y sus células guarda, evidencian que la diferenciación celular puede ser tanto un paso previo o posterior a la división celular. También ponen de manifiesto que ambos procesos pueden formar parte de dos vías total o parcialmente independientes (figura 26) (Jakoby *et al.* 2004).

Otro proceso que evidencia la relación entre división y diferenciación es la endoreduplicación. Durante este proceso el ciclo celular transcurre sin división celular y por lo tanto la célula duplica el contenido genómico, causando un incremento del volumen celular. Este evento es promovido por el factor de transcripción E2F, que también participa en la inducción de la diferenciación celular y origina una disminución de la actividad de las CYCD. Finalmente, las células abandonan el ciclo, lo que conlleva a la madurez y diferenciación celular (De Veylder *et al.* 2002).



Current Opinion in Plant Biology

Figura 26: Sinopsis de las posibles relaciones entre el ciclo celular y la diferenciación.

A) La progresión del ciclo celular conduce a la diferenciación; B) las señales del desarrollo conducen a la progresión del ciclo celular; C) el ciclo celular y la diferenciación pueden producirse de forma independiente uno de otro; D) el ciclo celular y la diferenciación pueden ser regulados por el mismo factor o la misma vía. Figura modificada de Jakoby & Schnittger, 2004

2.2 TAMAÑO DE LOS ÓRGANOS DE LA FLOR

En los capítulos anteriores se detallan aquellos genes involucrados en la regulación de la expansión y la división celular que participan en el control del tamaño de los órganos. La mayoría de estos genes producen además cambios pleiotrópicos en la planta.

Por ejemplo el gen *ANT* de *Arabidopsis* es el responsable de mantener la competencia meristemática de las células del SAM y su sobre-expresión conduce a un aumento en el tamaño de los órganos de la flor debido a un incremento en el número de células (Krizek 1999a; Mizukami *et al.* 2000). Sin embargo, su efecto es pleiotrópico, dado que interviene también en la regulación del tamaño de todos los órganos laterales, en el desarrollo de los óvulos y en la identidad de los pétalos (Baker *et al.* 1997; Elliott *et al.* 1996; Klucher *et al.* 1996). Además, interactúa con genes de identidad promoviendo la expresión de *AP3* (clase B) (Nole-Wilson *et al.* 2006) y previniendo la expresión del gen *AG* (clase C) (Krizek *et al.* 2000) en inflorescencias en estadios tempranos del desarrollo de la flor.

Sin embargo, en *Arabidopsis* se han descrito genes que participan exclusivamente en la regulación del tamaño de los órganos florales. En estambres y pétalos el gen *NAP* es regulado por los genes *AP3/PI* y parece estar relacionado con la transición entre el crecimiento por división y el causado por expansión celular, (Sablowski & Meyerowitz 1998). En el caso del gen *BPEp*, con dominio bHLH (*basic-Helix-Loop-Helix*), se observa su participación, exclusivamente en pétalos restringiendo la expansión celular (Szecsi *et al.*

2006). Otro estudio realizado en *Gerbera* demuestra la presencia de un gen (*GEG*) que parece participar de forma específica en corola y carpelo interviniendo en la regulación de la expansión celular mediada por fitohormonas (Kotilainen *et al.* 1999).

2.3 ACTIVIDAD DEL CICLO CELULAR EN *A. majus*

La regulación del ciclo celular en eucariotas se produce en múltiples niveles, la mayoría de ellos implican proteínas quinasas dependientes de ciclinas (CDKs). Estas proteínas son a su vez controladas por otros factores mediante fosforilación (Dewitte & Murray 2003).

Las ciclinas constituyen un grupo de proteínas diversas, que fluctúan a lo largo del ciclo celular, en eucariotas se encuentran agrupadas según su función en al menos cinco clases (A, B, C, D y H). Las ciclinas de clase A y B aparecen en las fases S y G2 respectivamente y son degradadas posteriormente. Las de tipo D, sin embargo, (a excepción de las CYCD4; 1 y CYCD5; 1) están presentes a lo largo de todo el ciclo mientras se produzcan señales de inducción de la división (de Jager *et al.* 2005; Dewitte *et al.* 2003). En el caso de CDKB, los niveles de expresión fluctúan a lo largo del ciclo celular en varias de las especies analizadas, entre las que se encuentra *A. majus*, alfalfa, tabaco y *Arabidopsis*. La regulación de CDKA en *Arabidopsis* es principalmente post-traducciona l y su sobre-expresión no provoca cambios fenotípicos (Dewitte *et al.* 2003; Fobert *et al.* 1996).

Dada la asincronía presente en las células en división los marcadores más adecuados para determinar la actividad del ciclo celular son aquellos presentes en todas las fases del ciclo. Por lo tanto, la determinación de los niveles de transcripción de las CYCD parece ser el parámetro más adecuado para analizar la actividad del ciclo celular en un tejido, por medio de la determinación de los niveles de transcripción.

En *A. majus* se ha analizado la expresión de tres tipos de ciclinas: CYCD1, CYCD3a (CYCD3; 1) y CYCD3b (CYC3; 2). CYCD1 y D3b se expresan en los meristemos vegetativos, de inflorescencia y florales (Gaudin *et al.* 2000). CYCD3b se expresa en la región central del meristemo y cuando las células se desplazan a la periferia, sus niveles disminuyen a medida que las células reducen la actividad del ciclo celular. Por el contrario, CYCD3a no se expresa en la región central pero su expresión se activa cuando las células se incorporan en los primordios de órganos. Su expresión parece estar asociada con la formación de órganos laterales y es regulada a nivel de transcripción, estabilidad de proteína y actividad quinasas (Gaudin *et al.* 2000). Un incremento en los niveles de expresión provoca la entrada inmediata en la fase S, provocando un



acortamiento de la fase G1, y consecuencias visibles en el desarrollo de las hojas. Durante el ciclo celular los niveles de ARN transcrito se corresponden con los niveles de proteínas (de Jager *et al.* 2005).

La modulación local de los niveles de expresión de CYCD3 se evidencia en la región dorsal de las anteras durante el plegamiento de los pétalos lo cual apoya la hipótesis de que la expresión localizada de CYCD3 se corresponde con zonas de proliferación celular diferencial en los tejidos de las plantas (Gaudin *et al.* 2000; Vincent, Carpenter, & Coen 1995).

Los objetivos de este capítulo son básicamente dos. El primero, es la caracterización del mutante *fo* en su comportamiento fenotípico y celular. El segundo, es comprender el modo de acción de *fo* a nivel molecular y su comportamiento relativo a la identidad de los diferentes órganos de la flor.

3 RESULTADOS

3.1 ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LOS MUTANTES *fo*

Los análisis de segregación de una población F₂ proveniente de un cruce entre el mutante *fo* (Sippe50) y el silvestre 165E, muestran que la mutación *fo* es recesiva. La prueba de χ^2 sobre un total de 119 (92 plantas silvestres y 27 de fenotipo mutante) no presenta desviación significativa respecto de los valores esperados para una segregación al azar 3:1 ($p > 0,5$).

Los mutantes *fo* procedentes de una población segregante se diferencian fácilmente por tener flores de mayor tamaño que las silvestres (figura 27). Los parámetros vegetativos del mutante no presentaron diferencias significativas en ninguno de los órganos estudiados respecto al silvestre (tabla 12).



Figura 27: Flores del mutante *fo*.

Fotografías de flores silvestres (izquierda) y *formosa* (derecha): A) vista lateral; B) vista dorsal; C) corte transversal.

Los análisis estadísticos de las medidas de todos los parámetros florales (tabla 13) mostraron que los sépalos no se diferencian del silvestre. En el caso

del segundo verticilo, se observó un aumento significativo del pétalo dorsal tanto en longitud total como en anchura respecto al silvestre. El tubo es más ancho y mantiene su longitud (parámetros 1 y 5) mientras el pétalo ventral presenta un paladar más ancho (parámetro 11). El resto de los parámetros que describen la corola no presentaron cambios significativos. En cuanto a los órganos reproductivos de la flor se observaron estambres más largos en *fo*, mientras los estilos no presentaron diferencias respecto al silvestre.

En el análisis del área celular de los pétalos se observó que *fo* produce diferentes efectos según la morfología de las células. La región de las células cónicas presentó variación significativa respecto a las células silvestres, mientras las células planas mantuvieron el mismo tamaño que las silvestres. El comportamiento de las células cónicas es llamativo dado que, a pesar del incremento en el tamaño de los órganos, el área celular disminuyó casi un 30%. Este hecho indica que el aumento en el tamaño del pétalo se debe exclusivamente a un mayor número de células (figura 28-A a D; tabla 14).

En el caso de los estambres, el incremento de tamaño observado en el órgano no se correspondió con la expansión celular. No se detectaron diferencias significativas entre el área celular del mutante *fo* y la planta silvestre, por lo que se deduce que es el aumento en el número de células el que provoca órganos de mayor tamaño (figura 28-E, F; tabla 14).

Por último los estilos de *fo*, que mantienen su tamaño respecto a silvestre, presentan células de menor área y por lo tanto también aumentan el número de células (figura 28-G, H; tabla 14).

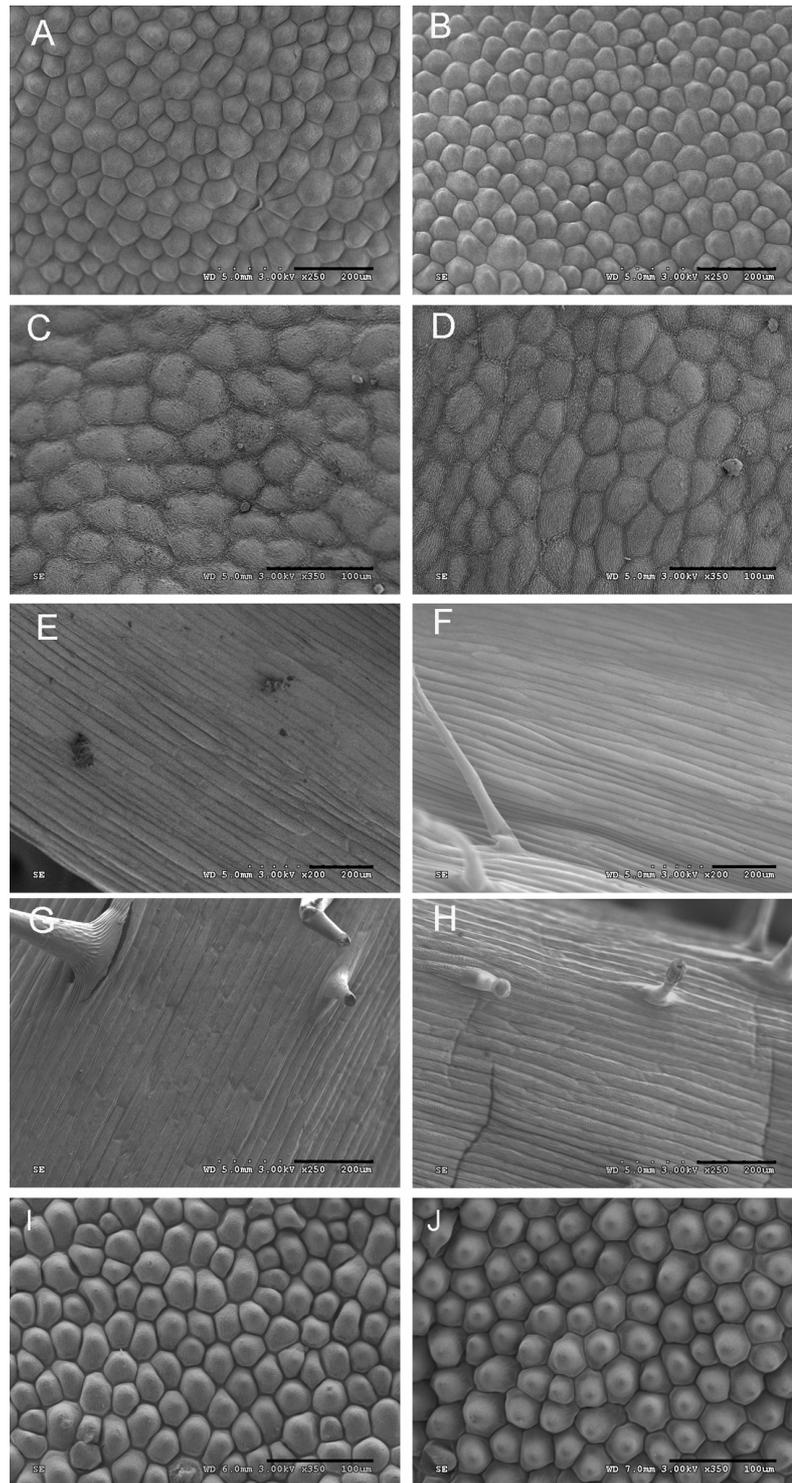


Figura 28: Micrografías electrónicas de células de los órganos de la flor de *fo* y silvestre.

Se muestra silvestre (izquierda) y mutantes *formosa* (derecha): A, B) células cónicas de los pétalos; C, D) células planas de los pétalos; E, F) células de estambres; G, H) células de gineceos. Células cónicas de los pétalos de I) mutantes *ple* y J) dobles mutantes *ple fo*.

Tabla 12: Medidas de los parámetros vegetativos del mutante fo comparado con silvestre

| | Entrenudo (mm) | | | Hojas 1 (mm) | | Hojas 2 (mm) | | Hojas 3 (mm) | | Nº Hojas | | |
|------------------------|----------------|-----------|----------|--------------|----------|--------------|----------|--------------|----------|-----------|-------------|----------|
| | 1 | 2 | 3 | L | A | L | A | L | A | Decusadas | Espiraladas | Total |
| fo ¹ | 16,5±6,6 | 23±5,4 | 33,4±3,2 | 22,4±4,8 | 12,9±2,8 | 33,9±3,9 | 17,8±2,7 | 46,0±8,5 | 19,7±1,9 | 7,6±1,6 | 8,2±2,2 | 15,8±1,9 |
| silvestre ¹ | 19,2±7,6 | 24,1±10,9 | 34,3±5,4 | 20,0±7,8 | 11,4±3,2 | 33,0±7,3 | 17,8±2,9 | 47,9±6,8 | 19,6±4,1 | 9,0±1,4 | 5,4±4,2 | 11,2±7,1 |
| % ² | -14,2 | -4,8 | -2,5 | 12,0 | 13,8 | 2,9 | -0,2 | -3,9 | 0,8 | -16,0 | 51,5 | 40,6 |

¹promedio ± desviación estándar

² Diferencia expresada en % considerando al silvestre 100%

*P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001

Las medidas fueron realizadas en 15 individuos totales.

Tabla 13: Medidas de los parámetros florales del mutante fo respecto a silvestre

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| fo ¹ | 17,7 ±0,3 | 32,5 ±2,1 | 25,0 ±3,4 | 7,3 ±0,2 | 12,9 ±0,5 | 38,8 ±1,5 | 24,5 ±2,7 | 32,9 ±1,3 | 26,2 ±0,6 | 22,1 ±0,8 | 15,4 ±1,3 |
| silvestre ¹ | 16,9 ±0,9 | 29,8 ±3,7 | 20,1 ±4,0 | 6,9 ±0,7 | 11,8 ±0,9 | 35,1 ±2,3 | 23,0 ±3,9 | 28,5 ±2,4 | 24,0 ±1,3 | 21,7 ±1,5 | 13,4 ±1,2 |
| % ² | 4,7 | 9,1 | 24,3** | 6,3 | 8,9** | 10,6*** | 6,9 | 15,4*** | 9,0*** | 1,9 | 14,9** |

¹ promedio (mm) ± desviación estándar

² Diferencia expresada en % considerando al silvestre 100%

*P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001

Las medidas fueron realizadas en 15 individuos totales.



Tabla 14: Medidas del área celular de los órganos florales de los mutantes *fo* respecto a silvestre

| | estambres | estilos | pétalo región 6-3 | pétalo región 8 |
|------------------------|----------------|---------------|-------------------|-----------------|
| <i>fo</i> ¹ | 3274,28±104,42 | 1988,60±63,17 | 1436,35±66,2 | 1011,67±27,85 |
| <i>wt</i> ¹ | 3468,34±212,05 | 2292,72±81,13 | 1540,06±38,09 | 1393,76±59,51 |
| % ² | -5,59 | -13,26** | 6,73 | -27,41*** |

¹ promedio (μm^2) \pm error típico

² Diferencia expresada en % considerando al silvestre 100%

* P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001

El área celular fue determinada en 50 células de 5 individuos totales.

En resumen, se observó que *fo* afecta sólo a los órganos florales, sin provocar variaciones en los órganos del cuerpo vegetativo de la planta. Los análisis de segregación del mutante indicaron que *fo* podría ser un alelo de pérdida de función y por lo tanto el gen *FO* actuaría restringiendo el crecimiento de los órganos florales. Por otra parte, los órganos de la flor de los mutantes *fo* no responden todos de la misma manera en cuanto a tamaño total y a expansión celular. Más aún, en el caso de la expansión celular, los efectos difieren entre regiones de un mismo órgano. Sin embargo los tres verticilos internos incrementan el número de células de forma uniforme.

3.2 ANÁLISIS FENOTÍPICO DEL DOBLE MUTANTE *ple fo*

Dadas las observaciones anteriores el comportamiento del mutante *fo* varía según los órganos de la flor. Para determinar si la función de *fo* es específica de órgano o de verticilo se planteó analizar el comportamiento de *fo* en órganos que, por mutaciones homeóticas, han cambiado de verticilo. Una posibilidad sería analizar aquellos órganos que son afectados por *fo*, como pétalos y estambres ubicándolos en verticilos que no son influenciados por la mutación, es decir el primer y cuarto verticilo. Sin embargo dado que las mutaciones homeóticas disponibles no incluyen tales posibilidades se utilizó un mutante en un gen de clase C. En este se obtendrán pétalos en verticilos internos adicionales que nos permitirán analizar si la identidad de órganos es suficiente para que *fo* exprese su fenotipo.

Los mutantes simples *ple* presentan una mutación en un gen de identidad de clase C, en el fondo genético 165E. Estos muestran un cambio de identidad en los órganos del tercer y cuarto verticilo y un aumento en el número de verticilos. Los dos primeros verticilos del mutante *ple* son similares a silvestres, mientras que el tercero consta de estructuras petaloides que están unidas a lo largo con los pétalos del segundo verticilo. El cuarto verticilo consiste en dos miembros de estructuras variables, con características sepaloides, petaloides y

carpeloides. Dentro del cuarto verticilo se forman nuevos verticilos con órganos petaloideos (Bradley *et al.* 1993).

Los dobles mutantes *fo ple*, se obtuvieron a partir de una población F_2 . Los parentales utilizados fueron mutantes *fo*, procedentes de una población F_3 de un cruce original entre 165E y *fo* (en el fondo genético Sippe50), y *ple-1* homocigota (en el fondo genético 165E). Este alelo de *ple* en ocasiones es capaz de producir polen en los órganos petaloideos del tercer verticilo. En la población segregante de 110 individuos totales se observaron 27 individuos *ple* y 6 individuos con fenotipo nuevo, putativos dobles mutantes, coincidiendo con el valor esperado para una segregación 9:3:3:1. A simple vista pudo observarse epistasis de *ple* sobre *fo* en cuanto a la identidad de los órganos de los dobles mutantes, sin embargo las flores fueron de mayor tamaño (figura 29-B a D).

Para realizar las comparaciones fenotípicas se seleccionaron los siguientes parámetros: 1-longitud del sépalo del primer verticilo, 2- expansión del pétalo dorsal del segundo verticilo, 3- longitud total dorsal, 4- longitud total ventral, 5- longitud del tubo del quinto verticilo, 6-anchura del tubo del quinto verticilo (figura 29-A).

Como se mencionó antes los parámetros de interés para comprender la especificidad respecto a identidad o verticilo de *fo* son los relacionados con el tamaño del órgano petaloide del quinto verticilo (parámetros 5 y 6). En este órgano no se observaron diferencias entre los dobles mutantes y el mutante simple *ple* (parámetros 5 y 6) lo que sugiere que la identidad del órgano no es suficiente para que *fo* produzca un aumento de tamaño (tabla 15).

Los parámetros florales analizados en el mutante simple *ple* para el primer y segundo verticilo son comparables con los parámetros medidos en los silvestres. En la tabla 15 se detalla una comparación entre los efectos del mutante simple *fo* y el doble mutante *fo ple*.

La mutación en el gen *fo* en el fondo genético *ple*, al igual que en el mutante simple, causa un incremento en la expansión y en la longitud del pétalo dorsal, sin producir cambios en el tamaño de los sépalos ni en la longitud del pétalo ventral (figura 28-I, J, tabla 15).

Sin embargo, las variaciones en la expansión del pétalo dorsal provocadas por el doble mutante son mucho más pronunciadas, prácticamente el doble, que las del mutante simple. En cuánto al tamaño celular, el doble mutante provoca un incremento de un 25% en el área celular de la región distal del pétalo dorsal, a diferencia de la disminución de la expansión observada en los mutantes simples *fo*. Por lo tanto, el fondo genético del mutante *ple* parece afectar al fenotipo de *fo* respecto a la regulación de la expansión del pétalo dorsal y a la expansión celular, lo que sugiere sinergia entre ambas mutaciones (tabla 15).

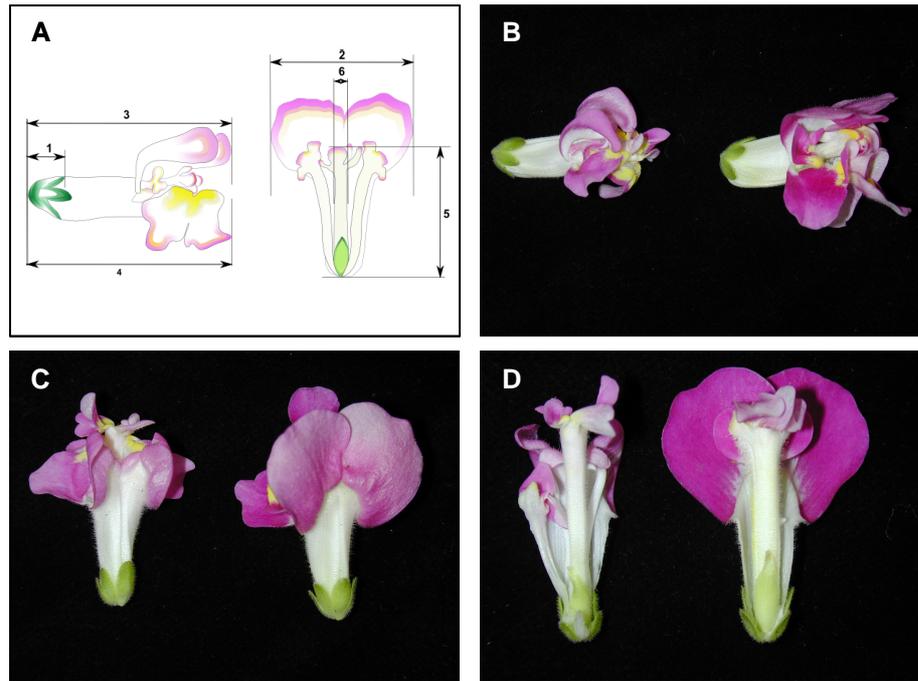


Figura 29: Morfología de los mutantes *ple* y *ple fo*.

A) Detalle de los parámetros florales en el mutante *ple*: 1-largo del sépalo del primer verticilo, 2- expansión del pétalo dorsal, 3- largo total dorsal, 4- largo total ventral, 5- largo del tubo del quinto verticilo, 6-ancho del tubo del quinto verticilo. Fotografías de las flores del mutante *ple* (izquierda) y del doble mutante *ple fo* (derecha) B) vista lateral, C) vista dorsal, D) sección transversal con verticilos cuarto y quinto expuestos.

Tabla 15: Medidas de parámetros florales y celulares de silvestre, *fo*, *ple* y *ple fo*

| | PARÁMETROS FLORALES ¹ | | | | | | ÁREA CELULAR ² |
|---|----------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|---------------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | Pétalo región 8 |
| silvestre | 6,9 ±0,7 | 28,5 ±2,4 | 35,1 ±2,3 | 29,8 ±3,7 | | | 1393,8±59,5 |
| <i>fo</i> | 7,3 ±0,2 | 32,9 ±1,3 | 38,8 ±1,5 | 32,5 ±2,1 | | | 1011,7±27,8 |
| <i>ple</i> | 6,7±1,1 | 28,5 ±2,4 | 30,7±2,2 | 30,7±2,63 | 25,9±1,1 | 3,73±0,9 | 826,3±32,1 |
| <i>ple, fo</i> | 6,4±0,4 | 27,2±2,3 | 33,4±1,5 | 31,7±2,9 | 25,32±3,5 | 3,95±0,8 | 1057,5±35,9 |
| <i>fo</i> vs. silvestre ³ | 6,3 | 15,4*** | 10,6*** | 9,1 | | | -27,4*** |
| <i>ple fo</i> vs. <i>ple</i> ⁴ | -5,2 | 39,4*** | 8,9* | 3,4 | -2,3 | 5,8 | 27,9*** |

¹ promedio (mm) ± desviación estándar

² promedio (µm²) ± error típico

³ Diferencia expresada en % considerando al silvestre 100%

⁴ Diferencia expresada en % considerando al mutante simple *ple* 100%

* P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001

Los parámetros florales fueron medidos en 10 individuos.

El área celular fue determinada en 50 células de 5 individuos.

3.3 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES QUE AFECTAN EL CICLO Y LA EXPANSIÓN CELULAR EN EL MUTANTE *fo*

De la descripción fenotípica y el análisis celular del mutante *fo* se deduce que la mutación causa un aumento en el número de células en pétalos, estambres y estilos. Este efecto puede producirse bien por el aumento en la actividad del ciclo celular a lo largo de los diferentes estadios de desarrollo de la flor, o por un aumento en la competencia meristemática.

Con el propósito de comprender el mecanismo de acción del gen *FO* se determinó la actividad de genes involucrados en el ciclo celular. Por medio del análisis de PCR cuantitativa se compararon los niveles de transcripción de genes relacionados con la actividad del ciclo celular en los diferentes órganos de inflorescencias silvestres y del mutante *fo*. Además, dado el efecto que ejerce *fo* en el tamaño de las células, se analizó un gen relacionado con la regulación específica de la expansión celular de los pétalos de la flor.

Debido a que algunos de los genes de interés en esta sección no han sido descritos para *A. majus*, se ha realizado una búsqueda de similitud y análisis filogenéticos con el propósito de identificarlos.

3.3.1 Análisis filogenético de *ANT* y *BPE* en *A. majus*

i. *AINTEGUMENTA*

ANT ha sido clonado y descrito en *Arabidopsis* (Krizek 1999b) sin embargo, no se ha caracterizado en *A. majus*. El Dr. Barry Causier (University of Leeds) cedió gentilmente la secuencia de *ANT* de *A. majus* (*AmANT*), obtenida en un experimento de híbrido simple utilizando el primer intrón de *Plena* como cebo. Partiendo de esta secuencia con el propósito de corroborar las homologías con los genes *ANT* se realizó una búsqueda de homología y se construyó un árbol filogenético mediante el programa PHYLIP.

Los análisis filogenéticos se realizaron sobre la base de búsquedas BLASTp de la secuencia de aminoácidos de *AmANT* frente a todas las secuencias no redundantes de la base de datos del NCBI. Para la construcción del árbol se seleccionaron las 30 secuencias que presentaron mayor similitud y se agregaron las secuencias de las proteínas *LIPLESS 1* y *2* con dominio AP2 de *A. majus*. Se utilizó además una secuencia de *Chlamidomonas reinhardtii*, AV622151 como grupo externo, empleada previamente en análisis filogenéticos de genes *ANT-Like* (*AIL*) (Morcillo *et al.* 2007).

Las proteínas *ANT* pertenecen a la familia de factores de transcripción



AP2/ERF (AP2/ethylene responsive-element-binding-factor). Estas proteínas presentan dominios de unión a ADN, AP2, conservados y están divididas en subfamilias dependiendo del número y características de estos dominios (Riechmann et al. 2000; Riechmann & Meyerowitz 1998).

Trabajos realizados sobre la subfamilia AP2 de *Arabidopsis* han clasificado sus miembros en tres grupos, entre ellos el grupo *AIL*, con dos dominios AP2 que incluye las proteínas *PLETORA 1 y 2 (PLT1, 2)* y *BABYBOOM (AtBBM)* (Nole-Wilson, Tranby, & Krizek 2005). Otros estudios que abarcan los dominios AP2 en diferentes especies de plantas han fraccionado la subfamilia AP2 en dos grandes linajes, *euAP2* y *ANT*. El primer linaje se caracteriza por carecer de una inserción típica de 10 aminoácidos dentro del dominio R1 y de una inserción de un aminoácido en el dominio R2. Además el linaje *ANT* incluye un subgrupo *euANT* al que pertenece *ANT* de *Arabidopsis*. En este subgrupo las proteínas poseen tres inserciones que se ubican 5' de los dominios AP2 y que están incluidas en un región relativamente larga respecto de las otras proteínas que pertenecen al linaje *ANT* (Kim et al. 2006). Todas estas particularidades se cumplieron tanto en la secuencia *AmANT* como en la mayoría de las secuencias utilizadas para la construcción del árbol. La inserción de 10 aminoácidos dentro del dominio R1 y de un aminoácido en el dominio R2 se observa en la figura 30-A. De las inserciones ubicadas 5' de los dominios R1 y R2 en *AmANT* sólo se encontraron dos, de las tres características, presumiblemente debido a que el extremo 5' de la secuencia de *AmANT* está incompleto.

El árbol filogenético obtenido es muy robusto, como se deduce de los valores de *bootstrap* obtenidos para cada rama, con valores que en muy pocos casos están por debajo de 100 (Figura 30-D). Básicamente se observó un reparto de las proteínas seleccionadas en dos grandes grupos uno que incluye a *AmANT*, más cercana a proteínas *AIL* de *N. tabacum* y *O. sativa* y a la secuencia *ANT* de *Arabidopsis*. El otro grupo incluye entre otras a las secuencias *AIL PLT 1 y 2* de *Arabidopsis* y proteínas *AIL* de otras especies.

Las proteínas *LIP1 y 2* de *A. majus* también pertenecen a la familia AP2, su función parece estar relacionada con la identidad de los órganos del segundo verticilo de la flor y pertenecen al linaje *euAP2* (Keck et al. 2003; Kim et al. 2006). En el árbol obtenido, ambas proteínas se encontraron evolutivamente distanciadas del resto, lo que concuerda con los análisis previos de Kim et al. (2006).

Tanto los análisis filogenéticos como los análisis de conservación de dominios y otras características típicas dentro de la secuencia sugieren que *AmANT* responde a las particularidades de las proteínas *AIL*, más aún del linaje *euANT* dentro del cual se incluye *ANT* de *Arabidopsis*. Esto apoya una posible similitud en la funcionalidad de ambas proteínas.

Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de *AmANT* amplifican una secuencia que se encuentra 3' (aguas abajo) de los dominios AP2 (figura 30-B). El producto de amplificación presentó un único pico obtenido de la curva de fusión (figura 30-C) verificándose además el tamaño esperado del fragmento mediante electroforesis en geles de agarosa.

ii. *BIG PETAL*

El gen *BPEp* de *Arabidopsis* actúa impidiendo la expansión celular de forma específica en los pétalos de la flor. Para determinar los niveles de expresión del gen *BPEp* en *A. majus* se realizó una búsqueda del EST homólogo al de *Arabidopsis*. Para ello se utilizó la herramienta informática tBlastn usando como cebo el gen AM269754, correspondiente a *BPEp* de *Arabidopsis*, en la base de *A. majus*. Esto permitió identificar aquellos ESTs con mayor homología al gen *BPEp*. El EST de *A. majus* con mayor similitud (AJ806353, EST, 018_6_03_k19), presentó un 81% de identidad respecto a *BPEp* de *Arabidopsis* y se denominará en adelante como *AmbPE*. Con el objeto de establecer si el clon obtenido realmente era un ortólogo putativo de *BPE*, se llevó a cabo un estudio filogenético exhaustivo.

Para los análisis filogenéticos los datos fueron obtenidos sobre la base de búsquedas BLASTp con la secuencia de *A. majus* seleccionada (*AmbPE*) utilizada como cebo, frente a todas las secuencias no redundantes de la base de datos del NCBI. Estas presentan estructura "basic Helix loop Helix" (bHLH) del dominio de unión a ADN (figura 31-A).

Además, se tuvieron en cuenta trabajos previos realizados en *Arabidopsis* sobre los genes con dominio bHLH (Heim et al. 2003; Toledo-Ortiz, Huq, & Quail 2003). De estos genes se seleccionaron aquellos que pertenecen a la misma subfamilia que el gen *BPE* de *Arabidopsis* (Grupo 18 según Heim et al. y Grupo XII según Toledo-Ortiz et al.) así como un gen perteneciente a cada uno de los grupos adyacentes en el árbol filogenético obtenido por Toledo-Ortiz et al. (G 15, 16, 17, 19 y 20). Para la construcción del árbol se seleccionó como grupo externo a un individuo perteneciente al Grupo 1 del árbol obtenido por Toledo-Ortiz et al. (2003), que se encuentra evolutivamente lejos del Grupo 18 al que pertenece *BPE* de *Arabidopsis*.

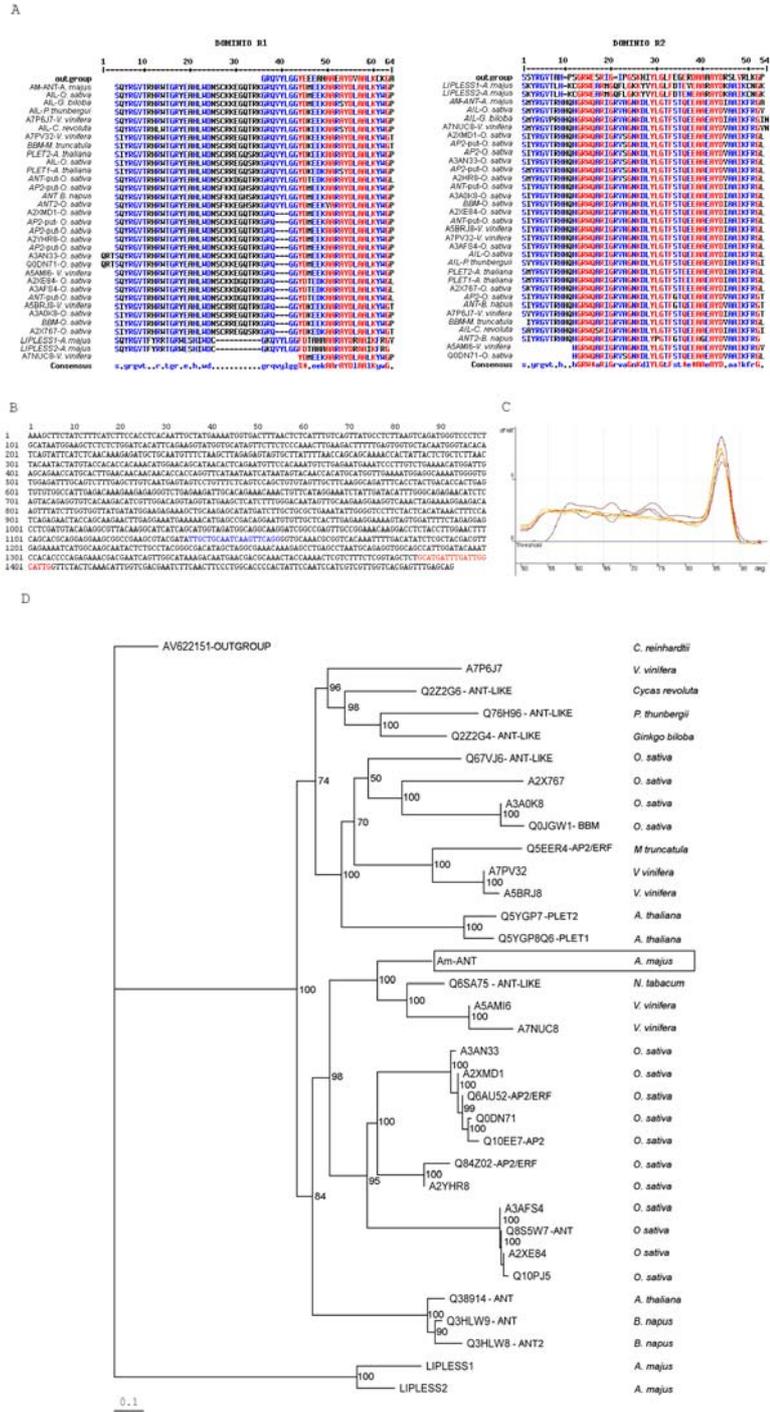


Figura 30: Análisis filogenético de *AmANT*.

A) Apilamiento de los dominios R1 y R2 de las secuencias utilizadas para generar el árbol; B) secuencias de los cebadores ubicados en la secuencia de *AmANT*, (letras azules, en sentido 5', letras rojas sentido 3'); C) curva de fusión del fragmento obtenido para la PCR en tiempo real; D) árbol filogenético en forma de filograma construido mediante el programa PHYLIP utilizando el método *Neighbor-Joining*, con un *bootstrap* de 100. Los valores que se detallan en los nodos corresponden a los valores de *bootstrap* para esa rama, siendo el largo de cada una proporcional a la distancia entre las secuencias. Solo se muestran los valores de *bootstrap* mayores a 50. Para aquellas secuencias que codifican para proteínas conocidas se ha detallado el nombre, adyacente al número de accesión, así como el nombre de la especie a la cual corresponde. La secuencia de *AmANT* se encuentra enmarcada.

El árbol filogenético se observa una separación clara de dos grandes grupos que ubican a *AmBpe* en el mismo grupo que el gen de *Arabidopsis* (figura 31-E). Esta cercanía evolutiva entre ambos genes avala la similitud funcional. En los estudios realizados tanto en *Arabidopsis* como en arroz se ha encontrado que las proteínas con dominios bHLH se agrupan según las similitudes de secuencias en cuanto al dominio, a motivos presentes fuera del dominio, así como a la disposición de intrones y exones. Generalmente, los miembros de un mismo subgrupo que comparten similitudes estructurales pueden compartir semejanzas funcionales (Heim *et al.* 2003). Estudios comparativos entre *Arabidopsis* y arroz sugieren que las funciones de la mayoría de los genes bHLH estén posiblemente conservadas durante la evolución de las angiospermas (Baker *et al.* 1997; Xiaoxing Li *et al.* 2006).

Para evitar amplificaciones no deseadas los oligonucleótidos específicos para amplificar *AmBPE* (AJ806353) se diseñaron teniendo en cuenta las secuencias de aquellos ESTs que resultaron también homólogos al ARN *BPEp* de *Arabidopsis* en *A. majus* (figura 31-B a D).

Se diseñaron dos pares de oligonucleótidos. Un par para amplificar un producto de 133 pb (BPe-R1), que no incluye el dominio bHLH para evitar amplificaciones inespecíficas, adecuado para realizar los análisis de PCR en tiempo Real. El otro permitió amplificar un fragmento más grande (443 pb) que fue posteriormente secuenciado (BPe-R2). En ambos casos el oligonucleótido que amplifica en sentido 3´ es el mismo (BPe-F). La amplificación por PCR en tiempo real con el oligo BPE-R1 presenta un único producto, así como un único pico a 84,6°C en la curva de fusión dada por el termociclador (figura 31-B, C).

Los análisis por electroforesis de ambos productos son del tamaño esperado (figura 31-B) y las secuencias del fragmento de mayor tamaño se correspondieron en un 100% con las secuencias de la base de datos.

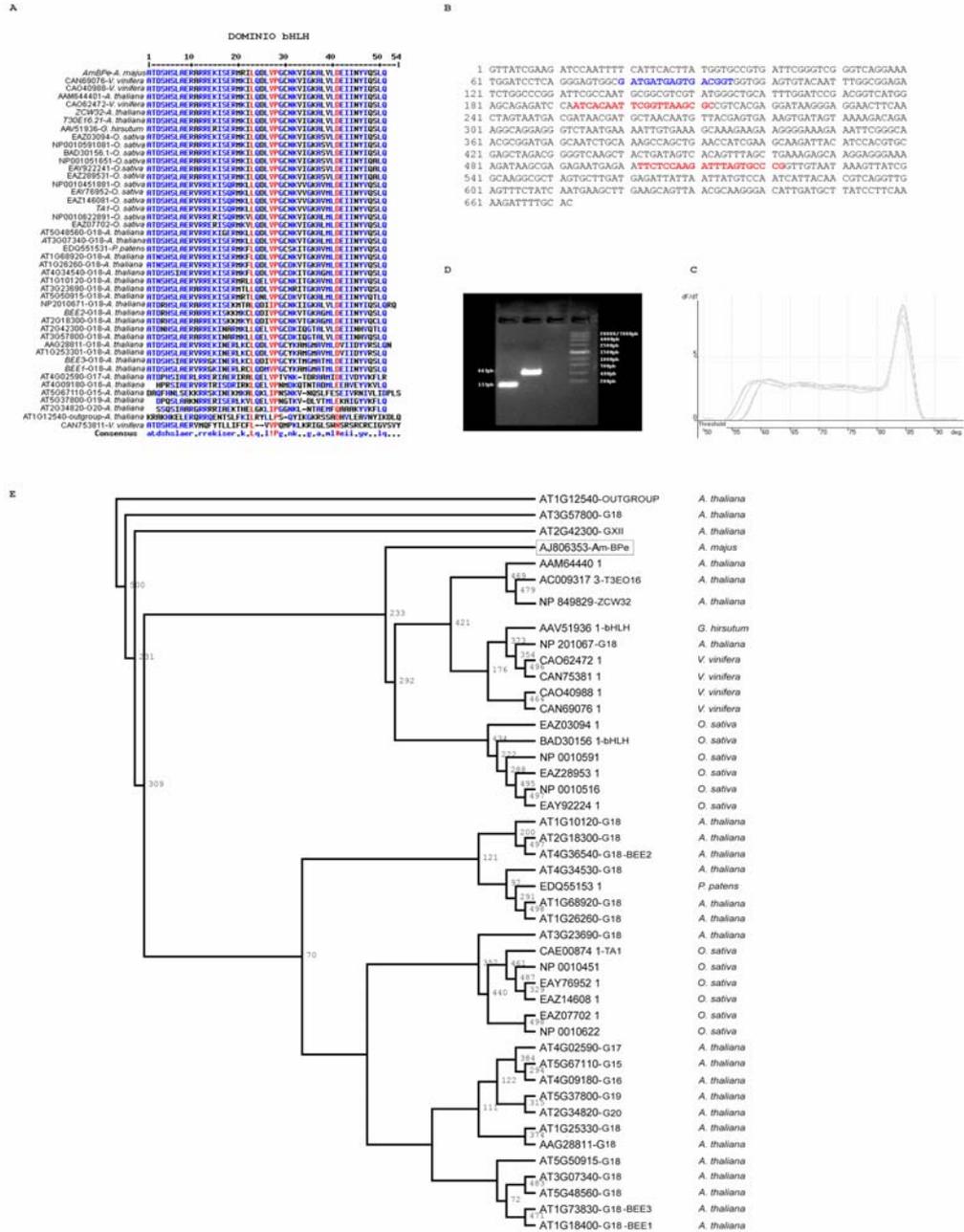


Figura 31: Análisis filogenético de *AmbPE*

A) Apilamiento de los dominios bHLH de las secuencias utilizadas para la construcción del árbol; B) secuencias de los cebadores ubicados en la secuencia de *AmBPE*, (letras azules, en sentido 5', letras rojas sentido 3'); C) electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación por PCR con los dos pares de cebadores; D) curva de fusión del fragmento obtenido para la PCR en tiempo real; E) árbol filogenético en forma de cladograma rectangular construido mediante el programa PHYLIP utilizando el método *Neighbor-Joining*, con un *bootstrap* de 500. Los valores que se detallan en los nodos corresponden a los *bootstrap* obtenidos para esa rama no siendo el largo de cada una proporcional a la distancia entre las secuencias. Sólo se muestran los valores de *bootstrap* mayores de 50. Para aquellas secuencias que codifican para proteínas conocidas se ha detallado el nombre adyacente al número de accesión así como el nombre de la especie a la cual corresponde. Las secuencias extraídas de análisis previos están marcadas según la nomenclatura original con una G seguida del número de grupo. La secuencia de *AmbPE* se encuentra enmarcada en un recuadro.

3.3.2 Expresión de genes relacionados con la división celular

Los genes seleccionados para determinar la actividad del ciclo celular en los mutantes *fo* fueron *CYCD3a*, *H4* (Fobert et al. 1994; Gaudin et al. 2000; Riou-Khamlichi et al. 1999a). También se estudió la expresión del gen *AmANT* como controlador de la división celular (Elliott et al. 1996; Klucher et al. 1996; Krizek 1999a). A diferencia de las ciclinas los transcritos de *H4* se encuentran solamente en células que están en la interfase del ciclo celular (Fobert et al. 1994). La normalización de las reacciones de PCR se realizaron con el gen *Ran3* (EST 018_6_06_k11), dado que según lo descrito por Bey et al (2004) este gen que codifica para una pequeña GTPasa se expresa de forma invariable en los diferentes órganos de la flor. Además ha sido utilizado como gen de referencia en *Arabidopsis* tanto en órganos diferenciados como en inflorescencias (Gandikota et al. 2007; Hackbusch et al. 2005). Los análisis se realizaron en tres estadios diferentes de desarrollo (10, 12 y 13) de la flor según los descrito por Vincent & Coen (Vincent et al. 2004), en los tres órganos que componen los verticilos 2, 3 y 4 (pétalos, estambres y estilos).

Los pétalos de *fo* presentaron diferencias significativas en los niveles de transcrito tanto de *CYCD3a* como de *H4* en el estadio 12 del desarrollo. Se observó una sobre-expresión de ambos genes con un factor de expresión de 1,7 para *CYCD3a* y de 2,5 para *H4* (figura 32-A). Con estos resultados se puede afirmar que, en pétalos, el incremento en el número de células se debe, al menos en parte, a un incremento en la actividad del ciclo celular en el estadio 12 de desarrollo de la flor.

Los análisis realizados en estambres y carpelos mostraron que no hay diferencias significativas en ninguna de las enzimas relacionadas con la actividad del ciclo celular entre el mutante *fo* y el silvestre (figura 32-B, C). En estilos se observa una tendencia a incrementar los niveles de *H4* en estadios 10 y 12, pero estos cambios no son estadísticamente significativos.

Dado que los genes relacionados con el ciclo celular no presentaron variaciones significativas en estambres y estilos, los cambios en el número de células podrían responder a un incremento en la división celular en estadios tempranos del desarrollo. Por esta razón se procedió a la determinación de los niveles de transcripción de *AmANT* en los meristemas de inflorescencia.

Se observó que los transcritos de *AmANT* incrementan de forma significativa en los meristemas del mutante simple *fo* respecto a silvestre (figura 32-D). En estilos, donde se observó una tendencia de aumento en los niveles de transcripción de *CYCD3a* y *H4*, estadísticamente no significativa, también se



realizaron análisis de PCR cuantitativa para *AmANT* y se observó el mismo patrón con un leve aumento de la transcripción pero sin significancia estadística (figura 32-C).

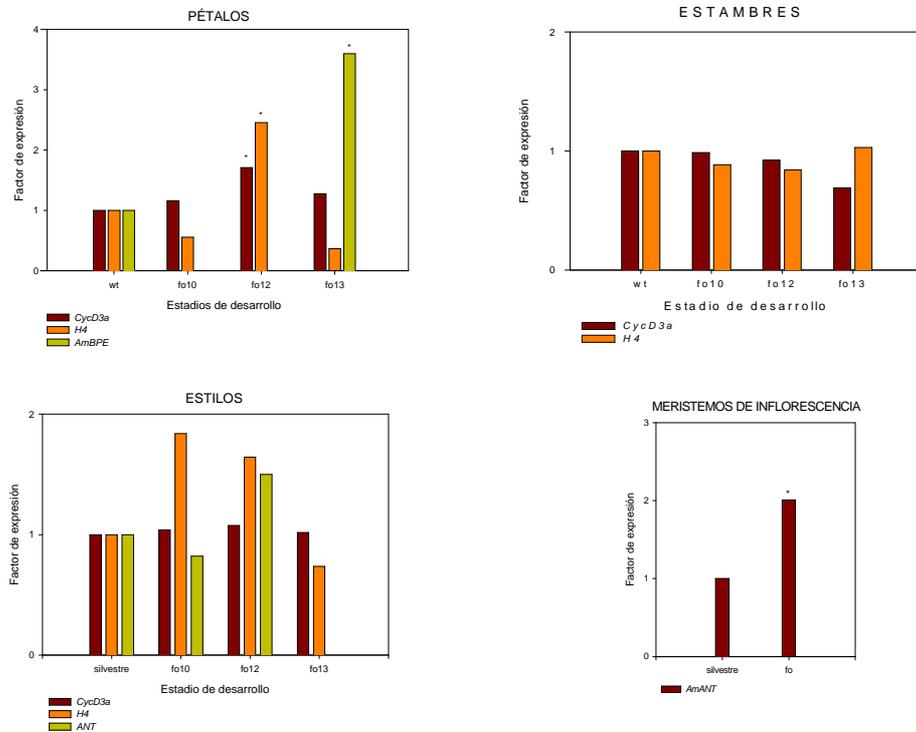


Figura 32: Cuantificación relativa de los niveles de expresión de genes relacionados con la actividad del ciclo y la expansión celular en *fo*.

Gráficos correspondientes a los factores de expresión (respecto al silvestre) de los genes *CYCD3a*, *H4*, *ANT* y *BPE*, utilizando como referencia al gen *Ran3*, en diferentes estadios de desarrollo (10, 12 y 13) en los diferentes órganos de la flor: A) pétalos, B) estambres; C) estilos; D) meristemos de inflorescencia. El factor de expresión del silvestre es igual a 1. Aquellas barras marcadas con un "*" significa que las diferencias son significativas respecto a silvestre con $p < 0,05$.

Podemos resumir que los mutantes *fo* provocan un incremento en el número de células de los órganos florales influyendo en los niveles de expresión de *AmANT* en los meristemos. En pétalos se observa además un incremento en la actividad del ciclo celular en el estadio 12.

3.3.3. Expresión de genes relacionados con la expansión celular

En los pétalos además del incremento en el número de células provocado por la mutación *fo* se observó una reducción en la expansión celular, al igual que en estilos. Dado que el gen *BPEp* se ha caracterizado en *Arabidopsis* (Szecsi

et al. 2006) y tiene un efecto específico en pétalos restringiendo la expansión celular se determinaron los niveles de expresión del gen *AmBPE*

En los análisis de cuantificación relativa realizados por RT-PCR se detectó una sobre-expresión del gen *AmBPE* en pétalos de *fo* respecto a silvestre, en el estadio 13 de desarrollo, con un factor de 2,5 (figura 32-A). Estos resultados justifican la reducción en la expansión celular observada en los pétalos de los mutantes *fo*.

4 DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

4.1 EL GEN *FO* RESTRINGE ESPECÍFICAMENTE EL CRECIMIENTO DE LOS ÓRGANOS FLORALES

Los análisis fenotípicos de los parámetros vegetativos y florales de los mutantes *fo* muestran que este alelo es recesivo y que su acción afecta exclusivamente a las flores. De esta manera se infiere que el gen *FO* interviene en la inhibición del crecimiento de estos órganos.

Cuando se estudian en forma detallada los parámetros de la flor, en el mutante simple *fo* se observa que, tanto a nivel de órgano como a nivel celular, su acción difiere según el órgano y/o verticilo de la flor. Los estilos de *fo* no muestran variación de tamaño total, y ponen en evidencia un mecanismo de compensación entre el aumento en el número de células y la menor expansión celular. Este modelo de compensación sólo se ha encontrado recientemente en los integumentos de óvulos que sobre-expresan *KNAT1*. Este proceso provoca ciclos adicionales de división celular que son compensadas por una menor expansión celular permitiendo una morfogénesis apropiada (Truernit & Haseloff 2008).

Los dobles mutantes *fo ple* demuestran que la mutación de *fo* en el fondo genético de *ple* solo afecta el tamaño de los pétalos del segundo verticilo. En el doble mutante *fo ple*, aquellos órganos petaloides generados en verticilos internos no varían su tamaño, indicando que *FO* no es específico de la identidad de órganos. Para comprobar realmente si la acción de *FO* es específica de verticilo se debería analizar el efecto en dobles mutantes con genes de identidad de clase B.

El análisis de los dobles mutantes *fo ple* mostró una particularidad respecto al efecto de *fo*, en los órganos que no cambian de identidad. Tanto a nivel de expansión del pétalo dorsal como de las células, se observó sinergia entre *fo* y *ple*. Por otra parte, existen evidencias de que los genes homeóticos además de determinar la identidad de los órganos florales intervienen en



eventos posteriores coordinando la diferenciación y crecimiento de estos, aunque aún no se conozcan estos mecanismos con detalles (Soltis *et al.* 2002). En el caso específico del gen *BPEp*, implicado en la regulación de la expansión celular específicamente en pétalos, se ha descrito que los genes de identidad regulan su expresión (Szecsi *et al.* 2006). Esto sugiere que ambos genes pueden actuar en la regulación de la expansión de los pétalos por vías redundantes, sin embargo, dicha función no ha sido descrita para *PLE* hasta el momento.

4.2 EFECTOS DE FORMOSA SOBRE LA EXPANSIÓN Y LA DIVISIÓN CELULAR

El incremento en el tamaño de los órganos florales en el mutante *fo* se debe exclusivamente a un aumento en el número de células. Esta variación puede ser la consecuencia de cambios a nivel de la competencia meristemática, como es el caso de *AmANT* (Mizukami *et al.* 2000), de los cambios producidos por diferencias en la velocidad del ciclo celular (Cockcroft *et al.* 2000) o de una diferencia en la actividad del ciclo celular (Hemerly *et al.* 1995).

En el caso del mutante *fo*, se observa un efecto a nivel del meristemo floral con un incremento en la expresión de *AmANT*, lo que significa una prolongación del período en que las células se están dividiendo activamente en el meristemo. Los pétalos en estadios más avanzados mantienen una mayor actividad de división tal y como lo demuestran los aumentos en los niveles de expresión de *CYCD3a* y *H4*. Los estambres y el gineceo parecen estar afectados sólo en los estadios tempranos.

Aunque los cambios producidos a nivel de la división celular no siempre tienen consecuencias morfológicas, existen diversos mutantes descritos que presentan cambios a nivel de órgano. Principalmente en hojas, se ha observado que variaciones en el número de células pueden conducir a cambios a nivel de órgano, como son los casos *curly leaf (clf)* (Kim, Tsukaya, & Uchimiya 1998a), el mutante *pointed first leaf2 (pfl2)* (Ito, Kim, & Shinozaki 2000), el *grf interacting factor 1 (atgif1)* (Kim & Kende 2004), *struwweelpeter (swp)* (Autran *et al.* 2002), *rotundifolia4 (rot4)* (Narita *et al.* 2004) y *angustifolia3 (an3)* (Horiguchi *et al.* 2005). Mas específicamente en los órganos florales de *Arabidopsis* se ha encontrado el gen *BIG BROTHER (BB)*, cuyos mutantes poseen flores con órganos de mayor tamaño debido a un mayor período de proliferación por una prolongación del tiempo de división celular en pétalos.

Además de la función de *FO* en la división celular, también se observa en los mutantes una variación en el tamaño de las células. La función de *FO* como promotor de la expansión celular podría estar mediada por una represión de la

expresión del gen *AmBPE*, dado que este presenta incrementos significativos en los niveles de transcripto en los pétalos de los mutantes simples *fo*. Existen evidencias de otros genes que actúan tanto en la regulación de la división como la expansión celular en los órganos de la flor. Esto es el caso de *SUP* que actúa reduciendo el número de células y la expansión celular lo que se ha comprobado en *Arabidopsis*, petunia y tabaco (Bereterbide *et al.* 2001; Bowman *et al.* 1992; Kater *et al.* 2000; Sakai *et al.* 1995)

Para resumir, se puede proponer que el gen *FO* restringe la actividad del ciclo celular en los meristemas de inflorescencia y en los pétalos de las flores, y podría provocar mayor expansión celular en los pétalos mediante la represión de la expresión del gen *AmBPE* encargado de restringir la expansión celular (Szecsi *et al.* 2006) (figura 33).

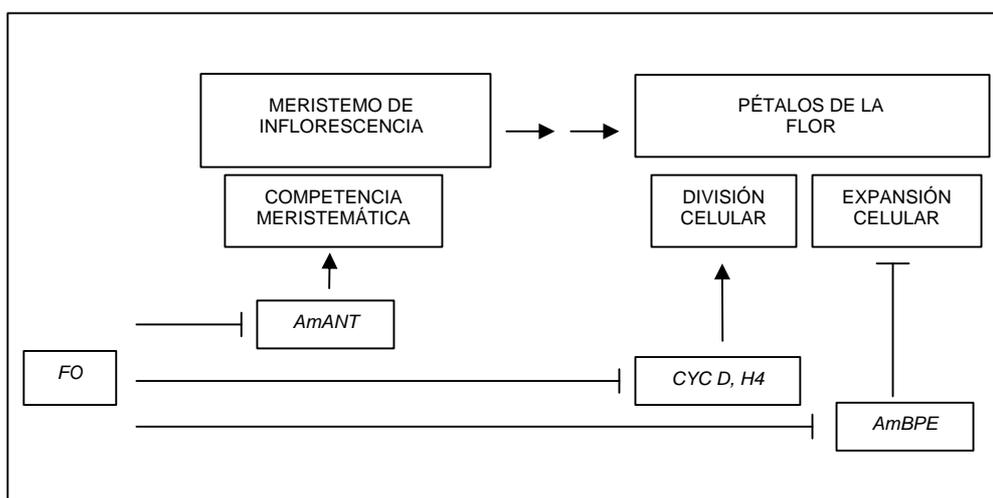
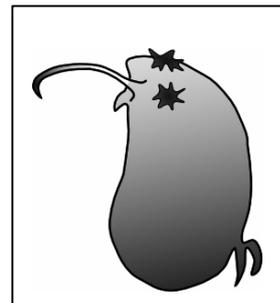


Figura 33: Esquema putativo de la acción de *FO* respecto a expansión y división celular.

Según los análisis de PCR en tiempo real se puede deducir que *FO* actúa en los meristemas apicales reprimiendo la expresión de *AmANT*, encargado de mantener la competencia meristemática de las células. En estadios posteriores en el desarrollo se ha detectado que *FO* puede intervenir tanto en la regulación de la división como la expansión celular en pétalos, reprimiendo *CYCD3a*, *H4* y *AmBPE*. Estos experimentos no nos permiten determinar, sin embargo, si *FO* actúa directa o indirecta sobre estos genes o si se producen cambios adicionales en otros órganos que componen la flor en estadios diferentes a los analizados

CONCLUSIONES GENERALES





VII CONCLUSIONES GENERALES

1 Los ensayos de hacinamiento demuestran la presencia de dos módulos independientes, uno vegetativo y otro reproductivo, que regulan el tamaño o la producción de órganos laterales dependiendo del estadio de desarrollo de la planta.

2 El tamaño floral parece ser estable frente a las condiciones de hacinamiento.

3 Ambos módulos, vegetativos y reproductivos, integran la respuesta, bajo las condiciones de hacinamiento, de tal forma que se produce una relación positiva entre el número de flores y el área foliar, siendo probablemente éste último uno de los principales responsables de los cambios en el número de flores.

4 Las células cónicas y planas, correspondientes a la cara adaxial de los pétalos, presentan homogeneidad tanto en morfología como en tamaño y son aptas para la caracterización de los mutantes.

5 Las células de las diferentes regiones del pétalo de *A. majus* no presentan diferencias en los niveles de ploidía ni entre sí ni respecto a los niveles de ADN de núcleos de hojas jóvenes.

6 El gen *CO* afecta el tamaño de los órganos vegetativos y reproductivos de las plantas promoviendo su crecimiento, provocando variaciones en la división celular en estambres y estilos y en la expansión celular en pétalos.

7 El gen *GRAF* controla específicamente el tamaño floral regulando la expansión celular en pétalos y la división celular en los órganos sexuales.

8 El aumento en la expansión celular, provocado por los mutantes *Graf*, no es producto de incrementos en los niveles de ploidía.

9 El mutante *Graf* es epistático sobre *co* en cuanto a la expansión de los pétalos, lo que sugiere que ambos genes participan en una misma vía de control de tamaño de estos órganos actuando *CO* aguas arriba de *GRAF* debido a que *Graf* es dominante.

10 Los genes *DEF* y *CO* participan en rutas paralelas en la regulación del tamaño e identidad de los pétalos.

11 *CO* afecta los niveles de expresión de *DEF*.

12 Los tratamientos de inhibición exógena de la expansión celular proponen que la identidad de los pétalos es independiente de las variaciones del tamaño celular.

13 El gen *FO* interviene específicamente en la inhibición del crecimiento de los órganos florales.

14 La acción del gen *FO*, tanto a nivel de la regulación del tamaño de los órganos florales como a nivel de la expansión celular, varía según el órgano o verticilo de la flor.

15 El mutante *fo* incrementa el número de células en todos los órganos de la flor provocando un aumento en los niveles de expresión de *AmANT* en los meristemos de inflorescencia y de *CYCD3a* y *H4* en los pétalos.

16 *FO* parece actuar como promotor de la expansión celular, en pétalos, reprimiendo la expresión del gen *AmBPE*.

17 Los análisis de los dobles mutantes *fo ple* muestran que la acción de *FO* no es específica de identidad.

18 El gen *PLE* parece intervenir en la regulación del tamaño de los pétalos en una vía paralela a la que controla *FO*.

19 La presencia de mutantes con efecto específico en el tamaño floral (*fo* y *Graf*), así como de otros que afectan de forma pleiotrópica los órganos laterales de las plantas sugieren que existen al menos dos grupos de genes que



controla el tamaño floral y las proporciones. Uno que afecta tanto el crecimiento vegetativo como reproductivo y el segundo específico de la flor.

BIBLIOGRAFÍA

VIII BIBLIOGRAFÍA

1. Aida, M., T. Ishida, and M. Tasaka. 1999. Shoot apical meristem and cotyledon formation during Arabidopsis embryogenesis: interaction among the CUP-SHAPED COTYLEDON and SHOOT MERISTEMLESS genes. *Development* **126**: 1563-1570.
2. Aida, M. and M. Tasaka. 2006. Genetic control of shoot organ boundaries. *Current Opinion in Plant Biology* **9**: 72-77.
3. Aida, M., T. Vernoux, M. Furutani, J. Traas, and M. Tasaka. 2002. Roles of PIN-FORMED1 and MONOPTEROS in pattern formation of the apical region of the Arabidopsis embryo. *Development* **129**: 3965-3974.
4. Alonso-Cantabrana, H., J. J. Ripoll, I. Ochando, A. Vera, C. Ferrandiz, and A. Martínez-Laborda. 2007. Common regulatory networks in leaf and fruit patterning revealed by mutations in the Arabidopsis ASYMMETRIC LEAVES1 gene. *Development* **134**: 2663-2671.
5. Altschul, S. F. and W. Gish. 1996. Local alignment statistics. *Methods Enzymol.* **266**: 460-480.
6. Ambrose, B. A., D. R. Lerner, P. Ciceri, C. M. Padilla, M. F. Yanofsky, and R. J. Schmidt. 2000. Molecular and genetic analyses of the *silky1* gene reveal conservation in floral organ specification between eudicots and monocots. *Molecular Cell* **5**: 569-579.
7. Anastasiou, E., S. Kenz, M. Gerstung, D. MacLean, J. Timmer, C. Fleck, and M. Lenhard. 2007. Control of Plant Organ Size by KLUH/CYP78A5-Dependent Intercellular Signaling. *Developmental Cell* **13**: 843-856.
8. Anastasiou, E. and M. Lenhard. 2007. Growing up to one's standard. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 63-69.
9. Andrew, J. F. 2006. Leaf Initiation: The Integration of Growth and Cell Division. *Plant Molecular Biology* **60**: 905-914.
10. Angenent, G. C., J. Franken, M. Busscher, D. Weiss, and A. J. Van Tunen. 1994. Co-Suppression of the Petunia Homeotic Gene *Fbp2* Affects the Identity of the Generative Meristem. *Plant Journal* **5**: 33-44.
11. Autran, D., C. Jonak, K. Belcram, G. T. S. Beemster, J. Kronenberger, O. Grandjean, D. Inze, and J. Traas. 2002. Cell numbers and leaf development in Arabidopsis: a functional analysis of the STRUWWELPETER gene. *Embo Journal* **21**: 6036-6049.
12. Azpiroz, R., Y. W. Wu, J. C. Lo Cascio, and K. A. Feldmann. 1998. An Arabidopsis brassinosteroid-dependent mutant is blocked in cell elongation. *Plant Cell* **10**: 219-230.
13. Baker, S. C., K. Robinson-Beers, J. M. Villanueva, J. C. Gaiser, and C. S. Gasser. 1997. Interactions among genes regulating ovule development in Arabidopsis thaliana. *Genetics* **145**: 1109-1124.
14. Ballare, C. L., A. L. Scopel, E. T. Jordan, and R. D. Vierstra. 1994. Signaling among Neighboring Plants and the Development of Size Inequalities in Plant Populations. *PNAS* **91**: 10094-10098.

15. Baluska, F., J. Jasik, H. G. Edelman, T. Salajova, and D. Volkmann. 2001. Latrunculin B-induced plant dwarfism: Plant cell elongation is F-actin-dependent. *Developmental Biology* **231**: 113-124.
16. Bannigan, A. and T. I. Baskin. 2005. Directional cell expansion -- turning toward actin. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 619-624.
17. Barthelemy, D. and Y. Caraglio. 2007. Plant architecture: A dynamic, multilevel and comprehensive approach to plant form, structure and ontogeny. *Ann. Bot.* **99**: 375-407.
18. Barton, M. K. and R. S. Poethig. 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.
19. Bayo-Canha, A., L. Delgado-Benarroch, J. Weiss, and M. Egea-Cortines. 2007. Artificial decrease of leaf area affects inflorescence quality but not floral size in *Antirrhinum majus*. *Sci. Hortic.-Amsterdam* **113**: 383-386.
20. Beemster, G. T. S., F. Fiorani, and D. Inze. 2003. Cell cycle: the key to plant growth control? *TRENDS in Plant Science* **8**: 154-158.
21. Belles-Boix, E., O. Hamant, S. M. Witiak, H. Morin, J. Traas, and V. Pautot. 2006. KNAT6: An *Arabidopsis* Homeobox Gene Involved in Meristem Activity and Organ Separation. *Plant Cell* **18**: 1900-1907.
22. Benlloch, R., C. Navarro, J. Beltrán, and L. A. Canas. 2003. Floral development of the model legume *Medicago truncatula*: ontogeny studies as a tool to better characterize homeotic mutations. *Sexual Plant Reproduction* **15**: 231-241.
23. Bennett, M. D., P. Bhandol, and I. J. Leitch. 2000. Nuclear DNA Amounts in Angiosperms and their Modern Uses--807 New Estimates. *Ann. Bot.* **86**: 859-909.
24. Bennett, M. D. and I. J. Leitch. 1995. Nuclear DNA Amounts in Angiosperms. *Ann. Bot.* **76**: 113-176.
25. Bennett, S. R. M., J. Alvarez, G. Bossinger, and D. R. Smyth. 1995. Morphogenesis in Pinoid Mutants of *Arabidopsis-Thaliana*. *Plant Journal* **8**: 505-520.
26. Berbel, A., C. Navarro, C. Ferrandiz, L. A. Canas, F. Madueno, and J. P. Beltran. 2001. Analysis of PEAM4, the pea AP1 functional homologue, supports a model for AP1-like genes controlling both floral meristem and floral organ identity in different plant species. *Plant J.* **25**: 441-451.
27. Bereterbide, A., M. Hernould, S. Castera, and A. Mouras. 2001. Inhibition of cell proliferation, cell expansion and differentiation by the *Arabidopsis* SUPERMAN gene in transgenic tobacco plants. *Planta* **214**: 22-29.
28. Bey, M., K. Stuber, K. Fellenberg, Z. Schwarz-Sommer, H. Sommer, H. Saedler, and S. Zachgo. 2004. Characterization of *Antirrhinum* Petal Development and Identification of Target Genes of the Class B MADS Box Gene DEFICIENS. *Plant Cell* **16**: 3197-3215.
29. Biesmeijer, J. C., K. Hartfelder, and V. L. Imperatriz-Fonseca. 2006. Stingless bees: biology and management. *Apidologie* **37**: 121-123.
30. Blazquez, M. A., C. Ferrandiz, F. Madueno, and F. Parcy. 2006. How floral meristems are built. *Plant Molecular Biology* **60**: 855-870.

31. Blazquez,M.A., R.Green, O.Nilsson, M.R.Sussman, and D.Weigel. 1998. Gibberellins promote flowering of Arabidopsis by activating the LEAFY promoter. *Plant Cell* **10**: 791-800.
32. Blazquez,M.A., L.N.Soowal, I.Lee, and D.Weigel. 1997. LEAFY expression and flower initiation in Arabidopsis. *Development* **124**: 3835-3844.
33. Bowman,J.L., J.Alvarez, D.Weigel, E.M.Meyerowitz, and D.R.Smyth. 1993. Control of Flower Development in Arabidopsis-Thaliana by *Apetala1* and Interacting Genes. *Development* **119**: 721-743.
34. Bowman,J.L., H.Sakai, T.Jack, D.Weigel, U.Mayer, and E.M.Meyerowitz. 1992. Superman, A Regulator of Floral Homeotic Genes in Arabidopsis. *Development* **114**: 599-&.
35. Bowman,J.L., D.R.Smyth, and E.M.Meyerowitz. 1989. Genes Directing Flower Development in Arabidopsis. *Plant Cell* **1**: 37-52.
36. Bowman,J.L., D.R.Smyth, and E.M.Meyerowitz. 1991. Genetic Interactions Among Floral Homeotic Genes of Arabidopsis. *Development* **112**: 1-20.
37. Bradley,D., R.Carpenter, H.Sommer, N.Hartley, and E.Coen. 1993. Complementary Floral Homeotic Phenotypes Result from Opposite Orientations of A Transposon at the *Plena-Locus* of *Antirrhinum*. *Cell* **72**: 85-95.
38. Bradley,D., O.Ratcliffe, C.Vincent, R.Carpenter, and E.Coen. 1997. Inflorescence commitment and architecture in Arabidopsis. *science* **275**: 80-83.
39. Bradley,D., C.Vincent, R.Carpenter, and E.Coen. 1996. Pathways for inflorescence and floral induction in *Antirrhinum*. *Development* **122**: 1535-1544.
40. Bradshaw,A.D. 1965. Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. *Advances in Genetic* **13**: 115-155.
41. Brand,U., M.Hobe, and R.Simon. 2001. Functional domains in plant shoot meristems. *Bioessays* **23**: 134-141.
42. Breuil-Broyer,S., P.Morel, J.Almeida-Engler, V.Coustham, I.Negrutiu, and C.Trehin. 2004. High-resolution boundary analysis during Arabidopsis thaliana flower development. *Plant Journal* **38**: 182-192.
43. Burk,D.H., B.Liu, R.Q.Zhong, W.H.Morrison, and Z.H.Ye. 2001. A katanin-like protein regulates normal cell wall biosynthesis and cell elongation. *Plant Cell* **13**: 807-827.
44. Burk,D.H. and Z.H.Ye. 2002. Alteration of oriented deposition of cellulose microfibrils by mutation of a katanin-like microtubule-severing protein. *Plant Cell* **14**: 2145-2160.
45. Busch,M.A., K.Bomblied, and D.Weigel. 1999. Activation of a floral homeotic gene in Arabidopsis. *science* **285**: 585-587.
46. Busov,V.B., A.M.Brunner, and S.H.Strauss. 2008. Genes for control of plant stature and form. *New Phytol.* **177**: 589-607.
47. Byrne,M.E. 2005. Networks in leaf development. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 59-66.

48. Byrne, M.E., R.Barley, M.Curtis, J.M.Arroyo, M.Dunham, A.Hudson, and R.A.Martienssen. 2000. Asymmetric leaves1 mediates leaf patterning and stem cell function in Arabidopsis. *nature* **408**: 967-971.
49. Byrne, M.E., J.Simorowski, and R.A.Martienssen. 2002. ASYMMETRIC LEAVES1 reveals knox gene redundancy in Arabidopsis. *Development* **129**: 1957-1965.
50. Byzova, M.V., J.Franken, M.G.Aarts, J.Almeida-Engler, G.Engler, C.Mariani, M.M.Lookeren Campagne, and G.C.Angenent. 1999. Arabidopsis STERILE APETALA, a multifunctional gene regulating inflorescence, flower, and ovule development. *Genes Dev.* **13**: 1002-1014.
51. Caño-Delgado, A.I., K.Metzlaff, and M.W.Bevan. 2000. The eli1 mutation reveals a link between cell expansion and secondary cell wall formation in Arabidopsis thaliana. *Development* **127**: 3395-3405.
52. Carles, C.C., K.Lertpiriyapong, K.Reville, and J.C.Fletcher. 2004. The ULTRAPETALA1 gene functions early in Arabidopsis development to restrict shoot apical meristem activity and acts through WUSCHEL to regulate floral meristem determinacy. *Genetics* **167**: 1893-1903.
53. Carraro, N., A.Peaucelle, P.Laufs, and J.Traas. 2006. Cell differentiation and organ initiation at the shoot apical meristem. *Plant Molecular Biology* **60**: 811-826.
54. Cartolano, M., R.Castillo, N.Efremova, M.Kuckenberger, J.Zethof, T.Gerats, Z.Schwarz-Sommer, and M.Vandenbussche. 2007. A conserved microRNA module exerts homeotic control over Petunia hybrida and Antirrhinum majus floral organ identity. *Nat Genet* **39**: 901-905.
55. Castellano, M.M., J.C.del Pozo, E.Ramirez-Parra, S.Brown, and C.Gutierrez. 2001. Expression and stability of Arabidopsis CDC6 are associated with endoreplication. *Plant Cell* **13**: 2671-2686.
56. Castellano, M.M. and R.Sablowski. 2005. Intercellular signalling in the transition from stem cells to organogenesis in meristems. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 26-31.
57. Chen, J.G., S.Shimomura, F.Sitbon, G.Sandberg, and A.M.Jones. 2001. The role of auxin-binding protein 1 in the expansion of tobacco leaf cells. *Plant Journal* **28**: 607-617.
58. Chen, J.G., H.Ullah, J.C.Young, M.R.Sussman, and A.M.Jones. 2001. ABP1 is required for organized cell elongation and division in Arabidopsis embryogenesis. *Genes Dev.* **15**: 902-911.
59. Chen, Q.Y., A.Atkinson, D.Otsuga, T.Christensen, L.Reynolds, and G.N.Drews. 1999. The Arabidopsis FILAMENTOUS FLOWER gene is required for flower formation. *Development* **126**: 2715-2726.
60. Chen, X. and E.M.Meyerowitz. 1999. HUA1 and HUA2 are two members of the floral homeotic AGAMOUS pathway. *Mol.Cell* **3**: 349-360.
61. Cheng, H., L.J.Qin, S.C.Lee, X.D.Fu, D.E.Richards, D.N.Cao, D.Luo, N.P.Harberd, and J.R.Peng. 2004. Gibberellin regulates Arabidopsis floral development via suppression of DELLA protein function. *Development* **131**: 1055-1064.
62. Chuang, C.F., M.P.Running, R.W.Williams, and E.M.Meyerowitz. 1999. The PERIANTHIA gene encodes a bZIP protein involved in the determination of floral organ number in Arabidopsis thaliana. *Genes Dev.* **13**: 334-344.

63. Clark,S.E., M.P.Running, and E.M.Meyerowitz. 1993. CLAVATA1, a regulator of meristem and flower development in Arabidopsis. *Development* **119**: 397-418.
 64. Cockcroft,C.E., B.G.W.den Boer, J.M.S.Healy, and J.A.H.Murray. 2000. Cyclin D control of growth rate in plants. *nature* **405**: 575-579.
 65. Coen ES and Carpenter R. 1992. The power behind the flower. *New Scientist* **134**: 24-27.
 66. Coen,E.S. and E.M.Meyerowitz. 1991. The War of the Whorls - Genetic Interactions Controlling Flower Development. *nature* **353**: 31-37.
 67. Coen,E.S., J.M.Romero, S.Doyle, R.Elliott, G.Murphy, and R.Carpenter. 1990. *floricaula*: a homeotic gene required for flower development in *antirrhinum majus*. *Cell* **63**: 1311-1322.
 68. Colombo,L., J.Franken, E.Koetje, J.Vanwent, H.J.M.Dons, G.C.Angenent, and A.J.VanTunen. 1995. The *Petunia* Mads Box Gene *Fbp11* Determines Ovule Identity. *Plant Cell* **7**: 1859-1868.
 69. Comba,L., S.A.Corbet, H.Hunt, S.Outram, J.S.Parker, and B.J.Glover. 2000. The role of genes influencing the corolla in pollination of *Antirrhinum majus*. *Plant, Cell & Environment* **23**: 639-647.
 70. Conner,J. and Z.C.Liu. 2000. LEUNIG, a putative transcriptional corepressor that regulates AGAMOUS expression during flower development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 12902-12907.
 71. Corbesier,L. and G.Coupland. 2006. The quest for florigen: a review of recent progress. *J.Exp.Bot.* **57**: 3395-3403.
 72. Crawford,B.C.W., U.Nath, R.Carpenter, and E.S.Coen. 2004. CINCINNATA controls both cell differentiation and growth in petal lobes and leaves of *antirrhinum*. *Plant Physiol.* **135**: 244-253.
 73. Cresswell,J.E., C.Hagen, and J.M.Woolnough. 2001. Attributes of Individual Flowers of *Brassica napus* L. are Affected by Defoliation but not by Intraspecific Competition. *Ann.Bot.* **88**: 111-117.
 74. Crone,W. and E.M.Lord. 1994. Floral organ initiation and development in wild-type *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) and in the organ identity mutants *apetala2-1* and *agamous-1*. *Can.J.Bot.* **72**: 384-401.
 75. Cubas,P. 2004. Floral zygomorphy, the recurring evolution of a successful trait. *Bioessays* **26**: 1175-1184.
 76. Cubas,P., E.Coen, and J.M.M.Zapater. 2001. Ancient asymmetries in the evolution of flowers. *Current Biology* **11**: 1050-1052.
 77. Dambre, P, Blindeman, L, and Van labeke, MC. Effect of planting density and harvesting method on rose flower production. 513, 129-136. 1998. *Acta Horticultrae*.
- Ref Type: Conference Proceeding
78. David,K.M., D.Couch, N.Braun, S.Brown, J.Grosclaude, and C.Perrot-Rechenmann. 2007. The auxin-binding protein 1 is essential for the control of cell cycle. *The Plant Journal* **50**: 197-206.

79. Davies,B., A.Di Rosa, T.Eneva, H.Saedler, and H.Sommer. 1996. Alteration of tobacco floral organ identity by expression of combinations of Antirrhinum MADS-box genes. *Plant J.* **10**: 663-677.
80. Davies,B., M.EgeaCortines, E.D.Silva, H.Saedler, and H.Sommer. 1996. Multiple interactions amongst floral homeotic MADS box proteins. *Embo Journal* **15**: 4330-4343.
81. Davies,B., P.Motte, E.Keck, H.Saedler, H.Sommer, and Z.Schwarz-Sommer. 1999. PLENA and FARINELLI: redundancy and regulatory interactions between two Antirrhinum MADS-box factors controlling flower development. *Embo Journal* **18**: 4023-4034.
82. de Jager,S.M., S.Maughan, W.Dewitte, S.Scofield, and J.A.H.Murray. 2005. The developmental context of cell-cycle control in plants. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **16**: 385-396.
83. de Jong,G. 2005. Evolution of phenotypic plasticity: patterns of plasticity and the emergence of ecotypes. *New Phytologist* **166**: 101-117.
84. De Kroon,H., H.Huber, J.F.Stuefer, and J.M.Van Groenendael. 2005. A modular concept of phenotypic plasticity in plants. *New Phytologist* **166**: 73-82.
85. De Veylder,L., T.Beeckman, G.T.S.Beeckman, J.D.Engler, S.Ormenese, S.Maes, M.Naudts, E.Van der Schueren, A.Jacqumard, G.Engler, and D.Inze. 2002. Control of proliferation, endoreduplication and differentiation by the Arabidopsis E2Fa-DPa transcription factor. *Embo Journal* **21**: 1360-1368.
86. Delph,L.F., F.M.Frey, J.C.Steven, and J.L.Gehring. 2004. Investigating the independent evolution of the size of floral organs via G-matrix estimation and artificial selection. *Evolution & Development* **6**: 438-448.
87. Delph,L.F., J.L.Gehring, F.M.Frey, A.M.Arntz, and M.Levri. 2004. Genetic constraints on floral evolution in a sexually dimorphic plant revealed by artificial selection. *Evolution* **58**: 1936-1946.
88. DeWitt,T.J. 1998. Costs and limits of phenotypic plasticity: Tests with predator-induced morphology and life history in a freshwater snail. *Journal of Evolutionary Biology* **11**: 465-480.
89. Dewitte,W. and J.A.H.Murray. 2003. The plant cell cycle. *Annual Review of Plant Biology* **54**: 235-264.
90. Dinneny,J.R., D.Weigel, and M.F.Yanofsky. 2006. NUBBIN and JAGGED define stamen and carpel shape in Arabidopsis. *Development* **133**: 1645-1655.
91. Dinneny,J.R., R.Yadegari, R.L.Fischer, M.F.Yanofsky, and D.Weigel. 2004. The role of JAGGED in shaping lateral organs. *Development* **131**: 1101-1110.
92. Disch,S., E.Anastasiou, V.K.Sharma, T.Laux, J.C.Fletcher, and M.Lenhard. 2006. The E3 Ubiquitin Ligase BIG BROTHER Controls Arabidopsis Organ Size in a Dosage-Dependent Manner. *Current Biology* **16**: 272-279.
93. Doerner,P. 2000. Plant stem cells: The only constant thing is change. *Current Biology* **10**: R826-R829.
94. Doerner,P. 2003. Plant Meristems: A Merry-Go-Round of Signals Review. *Current Biology* **13**: R368-R374.

95. Doerner,P. 2006. Plant Meristems: The Fiendish SU DOKU of Stem-Cell Maintenance. *Current Biology* **16**: R199-R201.
96. Dolezel,J., J.Greilhuber, S.Lucretti, A.Meister, M.A.Lysak, L.Nardi, and R.Obermayer. 1998. Plant Genome Size Estimation by Flow Cytometry: Inter-laboratory Comparison. *Ann.Bot.* **82**: 17-26.
97. Donohue,K. and J.Schmitt. 1999. The genetic architecture of plasticity to density in *Impatiens capensis*. *Evolution* **53**: 1377-1386.
98. Doonan,J. 2000. Social controls on cell proliferation in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **3**: 482-487.
99. Dudley,S.A. and J.Schmitt. 1996. Testing the adaptive plasticity hypothesis: Density-dependent selection on manipulated stem length in *Impatiens capensis*. *American Naturalist* **147**: 445-465.
100. Durfee,T., J.L.Roe, R.A.Sessions, C.Inouye, K.Serikawa, K.A.Feldmann, D.Weigel, and P.C.Zambryski. 2003. The F-box-containing protein UFO and AGAMOUS participate in antagonistic pathways governing early petal development in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 8571-8576.
101. Egea Gutierrez-Cortines,M. and B.Davies. 2000. Beyond the ABCs: ternary complex formation in the control of floral organ identity. *TRENDS in Plant Science* **5**: 473-478.
102. Egea-Cortines,M., H.Saedler, and H.Sommer. 1999. Ternary complex formation between the MADS-box proteins SQUAMOSA, DEFICIENS and GLOBOSA is involved in the control of floral architecture in *Antirrhinum majus*. *EMBO J.* **18**: 5370-5379.
103. Elliott,R.C., A.S.Betzner, E.Huttner, M.P.Oakes, W.Q.J.Tucker, D.Gerentes, P.Perez, and D.R.Smyth. 1996. AINTEGUMENTA, an APETALA2-like gene of *Arabidopsis* with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth. *Plant Cell* **8**: 155-168.
104. Emery,J.F., S.K.Floyd, J.Alvarez, Y.Eshed, N.P.Hawker, A.Izhaki, S.F.Baum, and J.L.Bowman. 2003. Radial patterning of *Arabidopsis* shoots by class III HD-ZIP and KANADI genes. *Current Biology* **13**: 1768-1774.
105. Engstrom,E.M., A.Izhaki, and J.L.Bowman. 2004. Promoter bashing, microRNAs, and knox genes. New insights, regulators, and targets-of-regulation in the establishment of lateral organ polarity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **135**: 685-694.
106. Falconer,D.S. and T.F.C.Mackay. *Introduction to quantitative genetics*, Pearson Education.
107. Farrona,S., L.Hurtado, J.L.Bowman, and J.C.Reyes. 2004. The *Arabidopsis thaliana* SNF2 homolog AtBRM controls shoot development and flowering. *Development* **131**: 4965-4975.
108. Felsenstein,J. 1985. Confidence-Limits on Phylogenies - An Approach Using the Bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.
109. Ferjani,A., G.Horiguchi, S.Yano, and H.Tsukaya. 2007. Analysis of leaf development in *fugu* mutants of *Arabidopsis* reveals three compensation modes that modulate cell expansion in determinate organs. *Plant Physiol.* **144**: 988-999.
110. Ferrandiz,C., C.Navarro, M.D.Gomez, L.A.Canas, and J.P.Beltran. 1999. Flower development in *pisum sativum*: from the war of the whorls to the battle of the common primordia. *Dev.Genet.* **25**: 280-290.

111. Ferrario,S., R.G.Immink, and G.C.Angenent. 2004. Conservation and diversity in flower land. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 84-91.
112. Fleming,A.J., S.Mc-Queen-Mason, T.Mandel, and C.Kuhlemeier. 1997. Induction of leaf primordia by the cell wall protein expansion. *science* **276**: 1415-1418.
113. Fletcher,J.C. 2001. The ULTRAPETALA gene controls shoot and floral meristem size in Arabidopsis. *Development* **128**: 1323-1333.
114. Fletcher,J.C., U.Brand, M.Hobe, E.M.Meyerowitz, and R.Simon. 2000. Stem cell fate in Arabidopsis thaliana depends on a feedback loop regulated by CLV3 activity. *Molecular Biology of the Cell* **11**: 287A.
115. Fletcher,L.C., U.Brand, M.P.Running, R.Simon, and E.M.Meyerowitz. 1999. Signaling of cell fate decisions by CLAVATA3 in Arabidopsis shoot meristems. *Science* **283**: 1911-1914.
116. Fobert,P.R., E.S.Coen, G.J.P.Murphy, and J.H.Doonan. 1994. Patterns of Cell-Division Revealed by Transcriptional Regulation of Genes During the Cell-Cycle in Plants. *Embo Journal* **13**: 616-624.
117. Fobert,P.R., V.Gaudin, P.Lunness, E.S.Coen, and J.H.Doonan. 1996. Distinct classes of cdc2-related genes are differentially expressed during the cell division cycle in plants. *Plant Cell* **8**: 1465-1476.
118. Folkers,U., V.Kirik, U.Schobinger, S.Falk, S.Krishnakumar, M.A.Pollock, D.G.Oppenheimer, I.Day, A.R.Reddy, G.Jurgens, and M.Hulskamp. 2002. The cell morphogenesis gene ANGUSTIFOLIA encodes a CtBP/BARS-like protein and is involved in the control of the microtubule cytoskeleton. *Embo Journal* **21**: 1280-1288.
119. Franks,R.G., Z.C.Liu, and R.L.Fischer. 2006. SEUSS and LEUNIG regulate cell proliferation, vascular development and organ polarity in Arabidopsis petals. *Planta* **224**: 801-811.
120. Franks,R.G., C.X.Wang, J.Z.Levin, and Z.C.Liu. 2002. SEUSS, a member of a novel family of plant regulatory proteins, represses floral homeotic gene expression with LEUNIG. *Development* **129**: 253-263.
121. Frary,A., L.A.Fritz, and S.D.Tanksley. 2004. A comparative study of the genetic bases of natural variation in tomato leaf, sepal, and petal morphology. *TAG* **109**: 523-533.
122. Friedman,H., J.W.Vos, P.K.Hepler, S.Meir, A.H.Halevy, and S.Philosoph-Hadas. 2003. The role of actin filaments in the gravitropic response of snapdragon flowering shoots. *Planta* **216**: 1034-1042.
123. Furutani,M., T.Vernoux, J.Traas, T.Kato, M.Tasaka, and M.Aida. 2004. PIN-FORMED1 and PINOID regulate boundary formation and cotyledon development in Arabidopsis embryogenesis. *Development* **131**: 5021-5030.
124. Galbraith,D.W., K.R.Harkins, and S.Knapp. 1991. Systemic Endopolyploidy in Arabidopsis-Thaliana. *Plant Physiol.* **96**: 985-989.
125. Galego,L. and J.Almeida. 2002. Role of DIVARICATA in the control of dorsoventral asymmetry in Antirrhinum flowers. *geNES & DEVELOPMENT* **16**: 880-891.
126. Galinat,W.C. 1959. The phytomer in relation to the floral homologies in the American Maydea. *Bot. Mus. Leafl. Harv. Univ.* American Maydea.*Bot.Mus.Leafl.Harv.Univ.* 1-32.

127. Galliot,C., J.Stuurman, and C.Kuhlemeier. 2006. The genetic dissection of floral pollination syndromes. *Current Opinion in Plant Biology* **9**: 78-82.
128. Gandikota,M., R.P.Birkenbihl, S.Hohmann, G.H.Cardon, H.Saedler, and P.Huijser. 2007. The miRNA156/157 recognition element in the 3' UTR of the Arabidopsis SBP box gene SPL3 prevents early flowering by translational inhibition in seedlings. *Plant Journal* **49**: 683-693.
129. Gaudin,V., P.A.Lunness, P.R.Fobert, M.Towers, C.Riou-Khamlichi, J.A.H.Murray, E.Coen, and J.H.Doonan. 2000c. The expression of D-cyclin genes defines distinct developmental zones in snapdragon apical meristems and is locally regulated by the cycloidea gene. *Plant Physiology* **122**: 1137-1148.
130. Gaudin,V., P.A.Lunness, P.R.Fobert, M.Towers, C.Riou-Khamlichi, J.A.H.Murray, E.Coen, and J.H.Doonan. 2000d. The expression of D-cyclin genes defines distinct developmental zones in snapdragon apical meristems and is locally regulated by the cycloidea gene. *Plant Physiology* **122**: 1137-1148.
131. Gaudin,V., P.A.Lunness, P.R.Fobert, M.Towers, C.Riou-Khamlichi, J.A.H.Murray, E.Coen, and J.H.Doonan. 2000e. The expression of D-cyclin genes defines distinct developmental zones in snapdragon apical meristems and is locally regulated by the cycloidea gene. *Plant Physiology* **122**: 1137-1148.
132. Gaudin,V., P.A.Lunness, P.R.Fobert, M.Towers, C.Riou-Khamlichi, J.A.H.Murray, E.Coen, and J.H.Doonan. 2000f. The expression of D-cyclin genes defines distinct developmental zones in snapdragon apical meristems and is locally regulated by the cycloidea gene. *Plant Physiology* **122**: 1137-1148.
133. Gaudin,V., P.A.Lunness, P.R.Fobert, M.Towers, C.Riou-Khamlichi, J.A.H.Murray, E.Coen, and J.H.Doonan. 2000a. The expression of D-cyclin genes defines distinct developmental zones in snapdragon apical meristems and is locally regulated by the cycloidea gene. *Plant Physiology* **122**: 1137-1148.
134. Gaudin,V., P.A.Lunness, P.R.Fobert, M.Towers, C.Riou-Khamlichi, J.A.H.Murray, E.Coen, and J.H.Doonan. 2000b. The expression of D-cyclin genes defines distinct developmental zones in snapdragon apical meristems and is locally regulated by the cycloidea gene. *Plant Physiology* **122**: 1137-1148.
135. Giovannoni,J.J. 2004. Genetic Regulation of Fruit Development and Ripening. *Plant Cell* **16**: S170-S180.
136. Glover,B.J. and C.Martin. 1998. The role of petal cell shape and pigmentation in pollination success in *Antirrhinum majus*. *Heredity* **80**: 778-784.
137. Golz,J.F., E.J.Keck, and A.Hudson. 2002. Spontaneous mutations in KNOX genes give rise to a novel floral structure in *Antirrhinum*. *Current Biology* **12**: 515-522.
138. Golz,J.F., M.Roccaro, R.Kuzoff, and A.Hudson. 2004. GRAMINIFOLIA promotes growth and polarity of *Antirrhinum* leaves. *Development* **131**: 3661-3670.
139. Gorou,H., F.Ali, F.Ushio, and T.Hirokazu. 2006. Coordination of cell proliferation and cell expansion in the control of leaf size in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Research* **V119**: 37-42.
140. Goto,K. and E.M.Meyerowitz. 1994. Function and regulation of the Arabidopsis floral homeotic gene PISTILLATA. *Genes Dev.* **8**: 1548-1560.
141. Güemes J. *Flora Ibérica*, pp. 1-30. C.S.I.C., Madrid.

142. Guo,M., J.Thomas, G.Collins, and M.C.Timmermans. 2008. Direct repression of KNOX loci by the asymmetric LEAVES1 Complex of Arabidopsis. *Plant Cell* **20**: 48-58.
143. Ha,C.M., J.H.Jun, H.G.Nam, and J.C.Fletcher. 2007. BLADE-ON-PETIOLE1 and 2 Control Arabidopsis Lateral Organ Fate through Regulation of LOB Domain and Adaxial-Abaxial Polarity Genes. *Plant Cell* **19**: 1809-1825.
144. Hackbusch,J., K.Richter, J.Muller, F.Salamini, and J.F.Uhrig. 2005. A central role of Arabidopsis thaliana ovate family proteins in networking and subcellular localization of 3-aa loop extension homeodomain proteins. *PNAS* **102**: 4908-4912.
145. Hake,S., H.M.S.Smith, H.Holtan, E.Magnani, G.Mele, and J.Ramirez. 2004. The Role of KNOX Genes in Plant Development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **20**: 125-151.
146. Heim,M.A., M.Jakoby, M.Werber, C.Martin, B.Weisshaar, and P.C.Bailey. 2003. The Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor Family in Plants: A Genome-Wide Study of Protein Structure and Functional Diversity. *Mol Biol Evol* **20**: 735-747.
147. Hemerly,A., J.D.Engler, C.Bergounioux, M.VanMontagu, G.Engler, D.Inze, and P.Ferreira. 1995. Dominant-Negative Mutants of the Cdc2 Kinase Uncouple Cell-Division from Iterative Plant Development. *Embo Journal* **14**: 3925-3936.
148. Hertel,R., V.E.A.Russo, and K.S.Thomson. 1972. In-Vitro Auxin Binding to Particulate Cell Fractions from Corn Coleoptiles. *Planta* **107**: 325-&.
149. Himanen,K., E.Boucheron, S.Vanneste, J.D.Engler, D.Inze, and T.Beeckman. 2002. Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *Plant Cell* **14**: 2339-2351.
150. Hodge,A. 2004. The plastic plant: root responses to heterogeneous supplies of nutrients. *New Phytologist* **162**: 9-24.
151. Horiguchi,G., G.T.Kim, and H.Tsukaya. 2005. The transcription factor AtGRF5 and the transcription coactivator AN3 regulate cell proliferation in leaf primordia of Arabidopsis thaliana. *Plant Journal* **43**: 68-78.
152. Horiguchi,G., A.Ferjani, U.Fujikura, and H.Tsukaya. 2006. Coordination of cell proliferation and cell expansion in the control of leaf size in Arabidopsis thaliana. *Journal of Plant Research* **119**: 37-42.
153. Horvath,B.M., Z.Magyar, Y.X.Zhang, A.W.Hamburger, L.Bako, R.G.Visser, C.W.Bachem, and L.Bogre. 2006. EBP1 regulates organ size through cell growth and proliferation in plants. *Embo Journal* **25**: 4909-4920.
154. Hu,Y., Q.Xie, and N.H.Chua. 2003. The Arabidopsis Auxin-Inducible Gene ARGOS Controls Lateral Organ Size. *Plant Cell* **15**: 1951-1961.
155. Huijser,P., J.Klein, W.E.Lonnig, H.Meijer, H.Saedler, and H.Sommer. 1992. Bracteomania, An Inflorescence Anomaly, Is Caused by the Loss of Function of the Mads-Box Gene Squamosa in Antirrhinum-Majus. *Embo Journal* **11**: 1239-1249.
156. Hussey,G. 1971. Cell Division and Expansion and Resultant Tissue Tensions in Shoot Apex During Formation of A Leaf Primordium in Tomato. *J.Exp.Bot.* **22**: 702-&.
157. Ingram,G.C., S.Doyle, R.Carpenter, E.A.Schultz, R.Simon, and E.S.Coen. 1997. Dual role for fimbriata in regulating floral homeotic genes and cell division in Antirrhinum. *Embo Journal* **16**: 6521-6534.

158. Ingram, G.C., J. Goodrich, M.D. Wilkinson, R. Simon, G.W. Haughn, and E.S. Coen. 1995. Parallels between UNUSUAL FLORAL ORGANS and FIMBRIATA, Genes Controlling Flower Development in Arabidopsis and Antirrhinum. *Plant Cell* **7**: 1501-1510.
159. Irish, V.F. 1999. Patterning the Flower. *Developmental Biology* **209**: 211-220.
160. Ito, T., G.T. Kim, and K. Shinozaki. 2000. Disruption of an Arabidopsis cytoplasmic ribosomal protein S13-homologous gene by transposon-mediated mutagenesis causes aberrant growth and development. *Plant Journal* **22**: 257-264.
161. Iwakawa, H., Y. Ueno, E. Semiarti, H. Onouchi, S. Kojima, H. Tsukaya, M. Hasebe, T. Soma, M. Ikezaki, C. Machida, and Y. Machida. 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.
162. Jack, T. 2004. Molecular and genetic mechanisms of floral control. *Plant Cell* **16**: S1-S17.
163. Jack, T., L.L. Brockman, and E.M. Meyerowitz. 1992. The homeotic gene APETALA3 of Arabidopsis thaliana encodes a MADS box and is expressed in petals and stamens. *Cell* **68**: 683-697.
164. Jakoby, M. and A. Schnittger. 2004. Cell cycle and differentiation. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 661-669.
165. Jones, A.M., K.H. Im, M.A. Savka, M.J. Wu, N.G. DeWitt, R. Shillito, and A.N. Binns. 1998. Auxin-Dependent Cell Expansion Mediated by Overexpressed Auxin-Binding Protein 1. *science* **282**: 1114-1117.
166. Joubes, J. and C. Chevalier. 2000. Endoreduplication in higher plants. *Plant Molecular Biology* **43**: 735-745.
167. Juenger, T., J.M. Perez-Perez, S. Bernal, and J.L. Micol. 2005. Quantitative trait loci mapping of floral and leaf morphology traits in Arabidopsis thaliana: evidence for modular genetic architecture. *Evolution & Development* **7**: 259-271.
168. Juenger, T., M. Purugganan, and T.F. Mackay. 2000. Quantitative trait loci for floral morphology in Arabidopsis thaliana. *Genetics* **156**: 1379-1392.
169. Kater, M.M., L. Colombo, J. Franken, M. Busscher, S. Masiero, M.M.V. Campagne, and G.C. Angenent. 1998. Multiple AGAMOUS homologs from cucumber and petunia differ in their ability to induce reproductive organ fate. *Plant Cell* **10**: 171-182.
170. Kater, M.M., J. Franken, A. van Aelst, and G.C. Angenent. 2000. Suppression of cell expansion by ectopic expression of the Arabidopsis SUPERMAN gene in transgenic petunia and tobacco. *Plant Journal* **23**: 407-413.
171. Kay, S., S. Hahn, E. Marois, G. Hause, and U. Bonas. 2007. A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *science* **318**: 648-651.
172. Kaya, H., K.I. Shibahara, K.I. Taoka, M. Iwabuchi, B. Stillman, and T. Araki. 2001. FASCIATA genes for chromatin assembly factor-1 in Arabidopsis maintain the cellular organization of apical meristems. *Cell* **104**: 131-142.
173. Kayes, J.M. and S.E. Clark. 1998. CLAVATA2, a regulator of meristem and organ development in Arabidopsis. *Development* **125**: 3843-3851.

174. Kearsley, M.J., H.S. Pooni, and N.H. Syed. 2003. Genetics of quantitative traits in *Arabidopsis thaliana*. *Heredity* **91**: 456-464.
175. Keck, E., P. McSteen, R. Carpenter, and E. Coen. 2003. Separation of genetic functions controlling organ identity in flowers. *Embo Journal* **22**: 1058-1066.
176. Kelly, A.J., M.B. Bonnländer, and D.R. Meeks-Wagner. 1995. NFL, the tobacco homolog of FLORICAULA and LEAFY, is transcriptionally expressed in both vegetative and floral meristems. *Plant Cell* **7**: 225-234.
177. Kidner, C.A. and R.A. Martienssen. 2005. The role of ARGONAUTE1 (AGO1) in meristem formation and identity. *Developmental Biology* **280**: 504-517.
178. Kidner, C.A. and M.C. Timmermans. 2007. Mixing and matching pathways in leaf polarity. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 13-20.
179. Kieffer, M., Y. Stern, H. Cook, E. Clerici, C. Maulbetsch, T. Laux, and B. Davies. 2006. Analysis of the Transcription Factor WUSCHEL and Its Functional Homologue in *Antirrhinum* Reveals a Potential Mechanism for Their Roles in Meristem Maintenance. *Plant Cell* **18**: 560-573.
180. Kim, G.T., K. Shoda, T. Tsuge, K.H. Cho, H. Uchimiya, R. Yokoyama, K. Nishitani, and H. Tsukaya. 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 Journal* **21**: 1267-1279.
181. Kim, G.T., H. Tsukaya, and H. Uchimiya. 1998a. The CURLY LEAF gene controls both division and elongation of cells during the expansion of the leaf blade in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **206**: 175-183.
182. Kim, G.T., H. Tsukaya, and H. Uchimiya. 1998b. 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 & DEVELOPMENT* **12**: 2381-2391.
183. Kim, G.T., S. Fujioka, T. Kozuka, F.E. Tax, S. Takatsuto, S. Yoshida, and H. Tsukaya. 2005. CYP90C1 and CYP90D1 are involved in different steps in the brassinosteroid biosynthesis pathway in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **41**: 710-721.
184. Kim, J.H. and H. Kende. 2004. A transcriptional coactivator, AtGIF1, is involved in regulating leaf growth and morphology in *Arabidopsis*. *PNAS* **101**: 13374-13379.
185. Kim, S., P.S. Soltis, K. Wall, and D.E. Soltis. 2006. Phylogeny and Domain Evolution in the APETALA2-like Gene Family. *Mol Biol Evol* **23**: 107-120.
186. Klucher, K.M., H. Chow, L. Reiser, and R.L. Fischer. 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.
187. Kondorosi, E. and A. Kondorosi. 2004. Endoreduplication and activation of the anaphase-promoting complex during symbiotic cell development. *FEBS Letters* **567**: 152-157.
188. Kondorosi, E., F. Roudier, and E. Gendreau. 2000. Plant cell-size control: growing by ploidy? *Current Opinion in Plant Biology* **3**: 488-492.

189. Kotilainen, M., Y. Helariutta, M. Mehto, E. Pollanen, V. A. Albert, P. Elomaa, and T. H. Teeri. 1999. GEG Participates in the Regulation of Cell and Organ Shape during Corolla and Carpel Development in *Gerbera hybrida*. *Plant Cell* **11**: 1093-1104.
190. Kramer, E. M. and J. C. Hall. 2005. Evolutionary dynamics of genes controlling floral development. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 13-18.
191. Krizek, B. A. 1999a. Ectopic expression of *AINTEGUMENTA* in *Arabidopsis* plants results in increased growth of floral organs. *DEVELOPMENTAL GENETICS* **25**: 224-236.
192. Krizek, B. A. 1999b. Ectopic expression of *AINTEGUMENTA* in *Arabidopsis* plants results in increased growth of floral organs. *Dev. Genet* **25**: 224-236.
193. Krizek, B. A. and J. C. Fletcher. 2005. Molecular mechanisms of flower development: An armchair guide. *NATURE REVIEWS GENETICS* **6**: 688-698.
194. Krizek, B. A. and E. M. Meyerowitz. 1996. Mapping the protein regions responsible for the functional specificities of the *Arabidopsis* MADS domain organ-identity proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **93**: 4063-4070.
195. Krizek, B. A., V. Prost, and A. Macias. 2000. *AINTEGUMENTA* promotes petal identity and acts as a negative regulator of *AGAMOUS*. *Plant Cell* **12**: 1357-1366.
196. Kudo, N. and Y. Kimura. 2001. Flow cytometric evidence for endopolyploidization in cabbage (*Brassica oleracea* L.) flowers. *Sexual Plant Reproduction* **13**: 279-283.
197. Kunst, L., J. E. Klenz, J. M. Martinez-Zapater, and G. W. Haughn. 1989. *AP2* gene determines the identity of perianth organs in flowers of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **1**: 1195-1208.
198. Kwon, C. S., K. I. Hibara, J. Pfluger, S. Bezhani, H. Metha, M. Aida, M. Tasaka, and D. Wagner. 2006. A role for chromatin remodeling in regulation of *CUC* gene expression in the *Arabidopsis* cotyledon boundary. *Development* **133**: 3223-3230.
199. Lai, Z., W. Ma, B. Han, L. Liang, Y. Zhang, G. Hong, and Y. Xue. 2002. An F-box gene linked to the self-incompatibility (S) locus of *Antirrhinum* is expressed specifically in pollen and tapetum. *Plant Mol Biol.* **50**: 29-42.
200. Laitinen, R., E. P. Allninen, T. Teeri, P. Elomaa, and M. Kotilainen. 2007. Transcriptional analysis of petal organogenesis in *Gerbera hybrida*. *Planta* **226**: 347-360.
201. Langlade, N. B., X. Z. Feng, T. Dransfield, L. Copsy, A. I. Hanna, C. Thebaud, A. Bangham, A. Hudson, and E. Coen. 2005. Evolution through genetically controlled allometry space. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 10221-10226.
202. Langton, F. A., L. R. Benjamin, and R. N. Edmonson. 1999. The effects of crop density on plant growth and variability in cut-flower chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **74**: 493-501.
203. Laufs, P., A. Peaucelle, H. Morin, and J. Traas. 2004. MicroRNA regulation of the *CUC* genes is required for boundary size control in *Arabidopsis* meristems. *Development* **131**: 4311-4322.
204. Laux, T., K. F. Mayer, J. Berger, and G. Jurgens. 1996. The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development* **122**: 87-96.

205. Lee,I., D.S.Wolfe, O.Nilsson, and D.Weigel. 1997. A LEAFY co-regulator encoded by UNUSUAL FLORAL ORGANS. *Curr.Biol.* **7**: 95-104.
 206. LEE,J.H., E.HEUVELINK, and H.CHALLA. 2002. Effects of planting date and plant density on crop growth of cut chrysanthemum. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* **77**: 238-247.
 207. Lee,Y. and H.Kende. 2001. Expression of beta -Expansins Is Correlated with Internodal Elongation in Deepwater Rice. *Plant Physiol.* **127**: 645-654.
 208. Lenhard,M., A.Bohnert, G.Jurgens, and T.Laux. 2001. Termination of stem cell maintenance in Arabidopsis floral meristems by interactions between WUSCHEL and AGAMOUS. *Cell* **105**: 805-814.
 209. Lenhard,M., G.Jurgens, and T.Laux. 2002. The WUSCHEL and SHOOTMERISTEMLESS genes fulfil complementary roles in Arabidopsis shoot meristem regulation. *Development* **129**: 3195-3206.
 210. Leon,P. and J.Sheen. 2003. Sugar and hormone connections. *TRENDS in Plant Science* **8**: 110-116.
 211. Leyser,H.M., C.A.Lincoln, C.Timpte, D.Lammer, J.Turner, and M.Estelle. 1993. Arabidopsis auxin-resistance gene AXR1 encodes a protein related to ubiquitin-activating enzyme E1. *Nature* **364**: 161-164.
 212. Lincoln,C., J.H.Britton, and M.Estelle. 1990. Growth and development of the axr1 mutants of Arabidopsis. *Plant Cell* **2**: 1071-1080.
 213. Link,B.M. and D.J.Cosgrove. 1998. Acid-growth response and alpha-expansins in suspension cultures of bright yellow 2 tobacco. *Plant Physiol.* **118**: 907-916.
 214. Liu,J.P., J.Van Eck, B.Cong, and S.D.Tanksley. 2002. A new class of regulatory genes underlying the cause of pear-shaped tomato fruit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 13302-13306.
 215. Liu,Z. and E.M.Meyerowitz. 1995. LEUNIG regulates AGAMOUS expression in Arabidopsis flowers. *Development* **121**: 975-991.
 216. Lobler,M. and D.Klambt. 1985. Auxin-Binding Protein from Coleoptile Membranes of Corn (Zea-Mays-L) .1. Purification by Immunological Methods and Characterization. *J.Biol.Chem.* **260**: 9848-9853.
 217. Lohmann,J.U., R.L.Hong, M.Hobe, M.A.Busch, F.Parcy, R.Simon, and D.Weigel. 2001. A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in Arabidopsis. *Cell* **105**: 793-803.
 218. Luo,D., R.Carpenter, L.Copsey, C.Vincent, J.Clark, and E.Coen. 1999. Control of organ asymmetry in flowers of Antirrhinum. *Cell* **99**: 367-376.
 219. Luo,D., R.Carpenter, C.Vincent, L.Copsey, and E.Coen. 1996. Origin of floral asymmetry in Antirrhinum. *nature* **383**: 794-799.
 220. Lynch, M. and Walsch B. **Genetics and Analysis of Quantitative Traits.** 1998. Sinauer Associates.
- Ref Type: Serial (Book,Monograph)

221. Maes,T., M.Van Montagu, and T.Gerats. 1999. The inflorescence architecture of *Petunia hybrida* is modified by the *Arabidopsis thaliana* Ap2 gene. *DEVELOPMENTAL GENETICS* **25**: 199-208.
222. Magyar,Z., L.De Veylder, A.Atanassova, L.Bako, D.Inze, and L.Bogre. 2005. The role of the *Arabidopsis* E2FB transcription factor in regulating auxin-dependent cell division. *Plant Cell* **17**: 2527-2541.
223. Maloof,J.N. 2003. QTL for plant growth and morphology. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 85-90.
224. Manchado-Rojo,M., J.Weiss, and M.Egea-Cortines. 2008. Using 23s rDNA to identify contaminations of *Escherichia coli* in *Agrobacterium tumefaciens* cultures. *Analytical Biochemistry* **372**: 253-254.
225. Martin,C., K.Bhatt, K.Baumann, H.Jin, S.Zachgo, K.Roberts, Z.Schwarz-Sommer, B.Glover, and M.Perez-Rodrigues. 2002. The mechanics of cell fate determination in petals. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci* **357**: 809-813.
226. Mateu-Andres,I. and L.De Paco. 2005. Allozymic differentiation of the *Antirrhinum majus* and *A. siculum* species groups. *Ann.Bot.* **95**: 465-473.
227. Mayer,K.F., H.Schoof, A.Haecker, M.Lenhard, G.Jurgens, and T.Laux. 1998. Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell* **95**: 805-815.
228. McConnell,J.R., J.Emery, Y.Eshed, N.Bao, J.Bowman, and M.K.Barton. 2001. Role of PHABULOSA and PHAVOLUTA in determining radial patterning in shoots. *nature* **411**: 709-713.
229. Mcsteen,P.C.M., C.A.Vincent, S.Doyle, R.Carpenter, and E.S.Coen. 1998. Control of floral homeotic gene expression and organ morphogenesis in *Antirrhinum*. *Development* **125**: 2359-2369.
230. Melaragno,J.E., B.Mehrotra, and A.W.Coleman. 1993. Relationship Between Endopolyploidy and Cell-Size in Epidermal Tissue of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **5**: 1661-1668.
231. Meyerowitz,E.M. 1996. Control of cell division and organ number in flower development. *Molecular Biology of the Cell* **7**: 2935.
232. Meyerowitz,E.M. 1997. Control of organ number and cell division patterns in developing flowers. *Developmental Biology* **186**: 7.
233. Michael W.Pfaffl. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29(9), e45. 1-5-2001.
- Ref Type: Journal (Full)
234. Miner,B.G., S.E.Sultan, S.G.Morgan, D.K.Padilla, and R.A.Relyea. 2005. Ecological consequences of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology & Evolution* **20**: 685-692.
235. Mitchison,J.M., B.Novak, and A.Sveiczer. 1997. MINI-REVIEW/COMMENTARY. *Cell Biology International* **21**: 461-463.
236. Mizukami,Y. 2001. A matter of size: developmental control of organ size in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **4**: 533-539.

237. Mizukami,Y. and R.L.Fischer. 2000. Plant organ size control: AINTEGUMENTA regulates growth and cell numbers during organogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **97**: 942-947.
238. Mjolsness E., Meyerowitz E., Gor V, and Mann T. Morphogenesis in Plants: Modeling the Shoot Apical Meristem, and Possible Applications. 1999.
Ref Type: Conference Proceeding
239. Molinero-Rosales,N., M.Jamilena, S.Zurita, P.Gomez, J.Capel, and R.Lozano. 1999. FALSIFLORA, the tomato orthologue of FLORICAULA and LEAFY, controls flowering time and floral meristem identity. Plant J. **20**: 685-693.
240. Morcillo,F., A.Gallard, M.Pillot, S.Jouannic, F.Aberlenc-Bertossi, M.Collin, J.L.Verdeil, and J.W.Tregear. 2007. EgAP2-1, an AINTEGUMENTA-like (AIL) gene expressed in meristematic and proliferating tissues of embryos in oil palm. Planta **226**: 1353-1362.
241. Motte,P., H.Saedler, and Z.Schwarz-Sommer. 1998. STYLOSA and FISTULATA: regulatory components of the homeotic control of Antirrhinum floral organogenesis. Development **125**: 71-84.
242. Murren,C.J., N.Pendleton, and M.Pigliucci. 2002. Evolution of phenotypic integration in Brassica (Brassicaceae). Am.J.Bot. **89**: 655-663.
243. Nakagawa,H., S.Ferrario, G.C.Angenent, A.Kobayashi, and H.Takatsuji. 2004. The petunia ortholog of Arabidopsis SUPERMAN plays a distinct role in floral organ morphogenesis. Plant Cell **16**: 920-932.
244. Narita,N.N., S.Moore, G.Horiguchi, M.Kubo, T.Demura, H.Fukuda, J.Goodrich, and H.Tsukaya. 2004. Overexpression of a novel small peptide ROTUNDIFOLIA4 decreases cell proliferation and alters leaf shape in Arabidopsis thaliana. Plant Journal **38**: 699-713.
245. Nath,U., B.C.W.Crawford, R.Carpenter, and E.Coen. 2003. Genetic control of surface curvature. science **299**: 1404-1407.
246. Navarro,C., N.Efremova, J.F.Golz, R.Rubiera, M.Kuckenbergl, R.Castillo, O.Tietz, H.Saedler, and Z.Schwarz-Sommer. 2004. Molecular and genetic interactions between STYLOSA and GRAMINIFOLIA in the control of Antirrhinum vegetative and reproductive development. Development **131**: 3649-3659.
247. Ng,M. and M.F.Yanofsky. 2001. Activation of the Arabidopsis B Class Homeotic Genes by APETALA1. Plant Cell **13**: 739-754.
248. Ni,W.M., D.X.Xie, L.Hobbie, B.M.Feng, D.Z.Zhao, J.Akkara, and H.Ma. 2004. Regulation of flower development in Arabidopsis by SCF complexes. Plant Physiol. **134**: 1574-1585.
249. Nijhout,H. 2003a. The control of body size in insects. Developmental Biology **261**: 1-9.
250. Nijhout,H.F. 2003b. The control of growth. Development **130**: 5863-5867.
251. Noda,K., B.J.Glover, P.Linstead, and C.Martin. 1994. Flower Color Intensity Depends on Specialized Cell-Shape Controlled by A Myb-Related Transcription Factor. nature **369**: 661-664.
252. Nole-Wilson,S., T.L.Tranby, and B.A.Krizek. 2005. AINTEGUMENTA-like (AIL) genes are expressed in young tissues and may specify meristematic or division-competent states. Plant Molecular Biology **57**: 613-628.

253. Nole-Wilson,S. and B.A.Krizek. 2006. AINTEGUMENTA Contributes to Organ Polarity and Regulates Growth of Lateral Organs in Combination with YABBY Genes. *Plant Physiol.* **141**: 977-987.
254. Notredame,C., D.G.Higgins, and J.Heringa. 2000. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J.Mol.Biol.* **302**: 205-217.
255. Ohno,C.K., G.V.Reddy, M.G.B.Heisler, and E.M.Meyerowitz. 2004. The Arabidopsis JAGGED gene encodes a zinc finger protein that promotes leaf tissue development. *Development* **131**: 1111-1122.
256. Okada,K., J.Ueda, M.K.Komaki, C.J.Bell, and Y.Shimura. 1991. Requirement of the auxin polar transport system in early stages of Arabidopsis floral bud formation. *Plant Cell* **3**: 677-684.
257. Olszewski,N.E., T.Sun, and F.Gubler. 2002. Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell Supplement* **2002**: s61-s80.
258. Otsuga,D., B.DeGuzman, M.J.Prigge, G.N.Drews, and S.E.Clark. 2001. REVOLUTA regulates meristem initiation at lateral positions. *Plant J.* **25**: 223-236.
259. Palatnik,J.F., E.Allen, X.L.Wu, C.Schommer, R.Schwab, J.C.Carrington, and D.Weigel. 2003. Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *nature* **425**: 257-263.
260. Park,S.E., L.R.Benjamin, and A.R.Watkinson. 2003. The theory and application of plant competition models: an agronomic perspective. *Ann.Bot.* **92**: 741-748.
261. Pelaz,S., G.S.Ditta, E.Baumann, E.Wisman, and M.F.Yanofsky. 2000. B and C floral organ identity functions require SEPALLATA MADS-box genes. *nature* **405**: 200-203.
262. Pelaz,S., C.Gustafson-Brown, S.E.Kohalmi, W.L.Crosby, and M.F.Yanofsky. 2001. APETALA1 and SEPALLATA3 interact to promote flower development. *Plant Journal* **26**: 385-394.
263. Perez-Rodriguez,M., F.W.Jaffe, E.Butelli, B.J.Glover, and C.Martin. 2005. Development of three different cell types is associated with the activity of a specific MYB transcription factor in the ventral petal of *Antirrhinum majus* flowers. *Development* **132**: 359-370.
264. Pfaffl,M.W., G.W.Horgan, and L.Dempfle. 2002. Relative expression software tool (REST(C)) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucl.Acids Res.* **30**: e36.
265. Pierik,R., E.J.W.Visser, H.De Kroon, and L.A.C.J.Voesenek. 2003. Ethylene is required in tobacco to successfully compete with proximate neighbours. *Plant Cell and Environment* **26**: 1229-1234.
266. Pierik,R., L.A.C.J.Voesenek, H.De Kroon, and E.J.W.Visser. 2004. Density-induced plant size reduction and size inequalities in ethylene-sensing and ethylene-insensitive tobacco. *Plant Biology* **6**: 201-205.
267. Pigliucci,M. and J.Schmitt. 1999. Genes affecting phenotypic plasticity in Arabidopsis: pleiotropic effects and reproductive fitness of photomorphogenic mutants. *Journal of Evolutionary Biology* **12**: 551-562.
268. Pinyopich,A., G.S.Ditta, B.Savidge, S.J.Liljegren, E.Baumann, E.Wisman, and M.F.Yanofsky. 2003. Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development. *nature* **424**: 85-88.

269. Pnueli, L., D. Hareven, L. Broday, C. Hurwitz, and E. Lifschitz. 1994. The TM5 MADS Box Gene Mediates Organ Differentiation in the Three Inner Whorls of Tomato Flowers. *Plant Cell* **6**: 175-186.
270. Pnueli, L., D. Hareven, S. D. Rounsley, M. F. Yanofsky, and E. Lifschitz. 1994. Isolation of the tomato AGAMOUS gene TAG1 and analysis of its homeotic role in transgenic plants. *Plant Cell* **6**: 163-173.
271. Posern, G., A. Sotiropoulos, and R. Treisman. 2002. Mutant Actins Demonstrate a Role for Unpolymerized Actin in Control of Transcription by Serum Response Factor. *Molecular Biology of the Cell* **13**: 4167-4178.
272. Potter, C. J. and T. Xu. 2001. Mechanisms of size control. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**: 279-286.
273. Prem, L. B. and B. S. Mohan. 2006. Molecular control of stem cell maintenance in shoot apical meristem. *Plant Cell Rep.* **V25**: 249-256.
274. Prigge, M. J., D. Otsuga, J. M. Alonso, J. R. Ecker, G. N. Drews, and S. E. Clark. 2005. Class III homeodomain-leucine zipper gene family members have overlapping, antagonistic, and distinct roles in Arabidopsis development. *Plant Cell* **17**: 61-76.
275. Reale, L., A. Porceddu, L. Lanfaroni, C. Moretti, S. Zenoni, M. Pezzotti, B. Romano, and F. Ferranti. 2002. Patterns of cell division and expansion in developing petals of *Petunia hybrida*. *Sexual Plant Reproduction* **15**: 123-132.
276. Riechmann, J. L., J. Heard, G. Martin, L. Reuber, C. Z. Jiang, J. Keddie, L. Adam, O. Pineda, O. J. Ratcliffe, R. R. Samaha, R. Creelman, M. Pilgrim, P. Broun, J. Z. Zhang, D. Ghandehari, B. K. Sherman, and C. L. Yu. 2000. Arabidopsis transcription factors: Genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* **290**: 2105-2110.
277. Riechmann, J. L. and E. M. Meyerowitz. 1998. The AP2/EREBP family of plant transcription factors. *Biological Chemistry* **379**: 633-646.
278. Riou-Khamlichi, C., R. Huntley, A. Jacquard, and J. A. H. Murray. 1999b. Cytokinin activation of Arabidopsis cell division through a D-type cyclin. *Science* **283**: 1541-1544.
279. Riou-Khamlichi, C., R. Huntley, A. Jacquard, and J. A. H. Murray. 1999a. Cytokinin activation of Arabidopsis cell division through a D-type cyclin. *Science* **283**: 1541-1544.
280. Running, M. P., J. C. Fletcher, and E. M. Meyerowitz. 1998. The WIGGUM gene is required for proper regulation of floral meristem size in Arabidopsis. *Development* **125**: 2545-2553.
281. Running, M. P., M. Lavy, H. Sternberg, A. Galichet, W. Grissem, S. Hake, N. Ori, and S. Yalovsky. 2004. Enlarged meristems and delayed growth in *plp* mutants result from lack of CaaX prenyltransferases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**: 7815-7820.
282. Running, M. P. and E. M. Meyerowitz. 1996. Mutations in the PERIANTHIA gene of Arabidopsis specifically alter floral organ number and initiation pattern. *Development* **122**: 1261-1269.
283. Ryser, P. and L. Eek. 2000. Consequences of phenotypic plasticity vs. interspecific differences in leaf and root traits for acquisition of aboveground and belowground resources. *Am. J. Bot.* **87**: 402-411.

284. Sablowski,R.W. and E.M.Meyerowitz. 1998. A homolog of NO APICAL MERISTEM is an immediate target of the floral homeotic genes APETALA3/PISTILLATA. *Cell* **92**: 93-103.
285. Sablowski,R. 2004. Plant and animal stem cells: conceptually similar, molecularly distinct? *Trends in Cell Biology* **14**: 605-611.
286. Saitou,N. and M.Nei. 1987. The Neighbor-Joining Method - A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol Biol Evol* **4**: 406-425.
287. Sakai,H., L.J.Medrano, and E.M.Meyerowitz. 1995. Role of Superman in Maintaining Arabidopsis Floral Whorl Boundaries. *nature* **378**: 199-203.
288. Sargent,R.D., C.Goodwillie, S.Kalisz, and R.H.Ree. 2007. Phylogenetic evidence for a flower size and number trade-off. *Am.J.Bot.* **94**: 2059-2062.
289. Sawa,S., K.Watanabe, K.Goto, Y.G.Liu, D.Shibata, E.Kanaya, E.H.Morita, and K.Okada. 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.
290. Schmalhausen,I. *Factors of evolution: The theory of stabilizing selection*, University of Chicago Press.
291. Schmitt,J., J.Eccleston, and D.W.Ehrhardt. 1987. Dominance and Suppression, Size-Dependent Growth and Self-Thinning in A Natural Impatiens-Capensis Population. *Journal of Ecology* **75**: 651-665.
292. Schultz,E.A. and G.W.Haughn. 1991. Leafy, A Homeotic Gene That Regulates Inflorescence Development in Arabidopsis. *Plant Cell* **3**: 771-781.
293. Schultz,E.A., F.B.Pickett, and G.W.Haughn. 1991. The Flo10 Gene-Product Regulates the Expression Domain of Homeotic Genes Ap3 and PI in Arabidopsis Flowers. *Plant Cell* **3**: 1221-1237.
294. Schuppler,U., P.H.He, P.C.John, and R.Munns. 1998. Effect of water stress on cell division and cell-division-cycle 2-like cell-cycle kinase activity in wheat leaves. *Plant Physiol* **117**: 667-678.
295. Schwarz-Sommer,Z., B.Davies, and A.Hudson. 2003. An everlasting pioneer: the story of Antirrhinum research. *NATURE REVIEWS GENETICS* **4**: 657-666.
296. Schwarz-Sommer,Z., I.Hue, P.Huijser, P.J.Flor, R.Hansen, F.Tetens, W.E.Lonnig, H.Saedler, and H.Sommer. 1992. Characterization of the Antirrhinum floral homeotic MADS-box gene *deficiens*: evidence for DNA binding and autoregulation of its persistent expression throughout flower development. *EMBO J.* **11**: 251-263.
297. Schwarz-Sommer,Z., E.D.Silva, R.Berndtgen, W.E.Lonnig, A.Muller, I.Nindl, K.Stuber, J.Wunder, H.Saedler, T.Gubitz, A.Borking, J.F.Golz, E.Ritter, and A.Hudson. 2003. A linkage map of an F-2 hybrid population of Antirrhinum majus and A-molle. *Genetics* **163**: 699-710.
298. Scofield,S. and J.A.H.Murray. 2006. KNOX gene function in plant stem cell niches. *Plant Molecular Biology* **60**: 929-946.
299. Serikawa,K.A., A.Martinez-Laborda, and P.Zambryski. 1996. Three knotted1-like homeobox genes in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology* **32**: 673-683.

300. Sessions,A., J.L.Nemhauser, A.McColl, J.L.Roe, K.A.Feldmann, and P.C.Zambryski. 1997. ETTIN patterns the Arabidopsis floral meristem and reproductive organs. *Development* **124**: 4481-4491.
301. Shannon,S. and D.R.Meekswagner. 1991. A Mutation in the Arabidopsis Tfl1 Gene Affects Inflorescence Meristem Development. *Plant Cell* **3**: 877-892.
302. Shpak,E.D., C.T.Berthiaume, E.J.Hill, and K.U.Torii. 2004. Synergistic interaction of three ERECTA-family receptor-like kinases controls Arabidopsis organ growth and flower development by promoting cell proliferation. *Development* **131**: 1491-1501.
303. Shpak,E.D., M.B.Lakeman, and K.U.Torii. 2003. Dominant-negative receptor uncovers redundancy in the Arabidopsis ERECTA leucine-rich repeat receptor-like kinase signaling pathway that regulates organ shape. *Plant Cell* **15**: 1095-1110.
304. Shuai,B., C.G.Reynaga-Pena, and P.S.Springer. 2002. The Lateral Organ Boundaries Gene Defines A Novel, Plant-Specific Gene Family. *Plant Physiol.* **129**: 747-761.
305. Siegfried,K.R., Y.Eshed, S.F.Baum, D.Otsuga, G.N.Drews, and J.L.Bowman. 1999. Members of the YABBY gene family specify abaxial cell fate in Arabidopsis. *Development* **126**: 4117-4128.
306. Simon,R., R.Carpenter, S.Doyle, and E.Coen. 1994. Fimbriata controls flower development by mediating between meristem and organ identity genes. *Cell* **78**: 99-107.
307. Simon,S. and A.H.M.James. 2006. KNOX Gene Function in Plant Stem Cell Niches. *Plant Molecular Biology* **60**: 929-946.
308. Skipper,M., L.B.Johansen, K.B.Pedersen, S.Frederiksen, and B.B.Johansen. 2006. Cloning and transcription analysis of an AGAMOUS- and SEEDSTICK ortholog in the orchid *Dendrobium thrysiflorum* (Reichb. f.). *Gene* **366**: 266-274.
309. Smith,H. and G.C.Whitelam. 1997. The shade avoidance syndrome: Multiple responses mediated by multiple phytochromes. *Plant Cell and Environment* **20**: 840-844.
310. Smith,L.G. and D.G.Oppenheimer. 2005. SPATIAL CONTROL OF CELL EXPANSION BY THE PLANT CYTOSKELETON. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **21**: 271-295.
311. Soltis,D.E., P.S.Soltis, V.A.Albert, D.G.Oppenheimer, C.W.dePamphilis, H.Ma, M.W.Frohlich, and G.Theissen. 2002. Missing links: the genetic architecture of flower and floral diversification. *TRENDS in Plant Science* **7**: 22-31.
312. Sommer,H., J.P.Beltran, P.Huijser, H.Pape, W.E.Lonnig, H.Saedler, and Z.Schwarzsommer. 1990. Deficiens, A Homeotic Gene Involved in the Control of Flower Morphogenesis in *Antirrhinum-Majus* - the Protein Shows Homology to Transcription Factors. *Embo Journal* **9**: 605-613.
313. Sommer,H., R.Carpenter, B.J.Harrison, and H.Saedler. 1985. The transposabl element Tam3 of *Antirrhinum majus* generates a novel type of sequence alterations upon excision. *Mol Gen Genet* **199**: 225-231.
314. Sommer,H., W.Nacken, P.Beltran, P.Huijser, H.Pape, R.Hansen, P.Flor, H.Saedler, and Z.Schwarzsommer. 1991. Properties of Deficiens, A Homeotic Gene Involved in the Control of Flower Morphogenesis in *Antirrhinum-Majus*. *Development* **169**: 169-175.

315. Song,S.K., M.M.Lee, and S.E.Clark. 2006. POL and PLL1 phosphatases are CLAVATA1 signaling intermediates required for Arabidopsis shoot and floral stem cells. *Development* **133**: 4691-4698.
316. Sotiropoulos,A., D.Gineitis, J.Copeland, and R.Treisman. 1999. Signal-Regulated Activation of Serum Response Factor Is Mediated by Changes in Actin Dynamics. *Cell* **98**: 159-169.
317. Souer,E., K.A.van der, D.Kloos, C.Spelt, M.Bliek, J.Mol, and R.Koes. 1998. Genetic control of branching pattern and floral identity during *Petunia* inflorescence development. *Development* **125**: 733-742.
318. Sozzani,R., C.Maggio, S.Varotto, S.Canova, C.Bergounioux, D.Albani, and R.Cella. 2006. Interplay between Arabidopsis Activating Factors E2Fb and E2Fa in Cell Cycle Progression and Development. *Plant Physiol.* **140**: 1355-1366.
319. Stepanova,A.N., J.Robertson-Hoyt, J.Yun, L.M.Benavente, D.Y.Xie, K.Dolezal, A.Schlereth, G.Jurgens, and J.M.Alonso. 2008. TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell* **133**: 177-191.
320. Stubbe,H. *Genetik und Zytologie von Antirrhinum L. sect. Antirrhinum*, Veb Gustav Fischer Verlag, Jena.
321. Stuurman,J., F.Jaggi, and C.Kuhlemeier. 2002. Shoot meristem maintenance is controlled by a GRAS-gene mediated signal from differentiating cells. *Genes Dev.* **16**: 2213-2218.
322. Sugimoto-Shirasu,K. and K.Roberts. 2003. "Big it up": endoreduplication and cell-size control in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 544-553.
323. Szecsi,J., C.Joly, K.Bordji, E.Varaud, J.M.Cock, C.Dumas, and M.Bendahmane. 2006. BIGPETALp, a bHLH transcription factor is involved in the control of Arabidopsis petal size. *Embo Journal* **25**: 3912-3920.
324. Talbert,P.B., H.T.Adler, D.W.Parks, and L.Comai. 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.
325. Tao,Y., J.L.Ferrer, K.Ljung, F.Pojer, F.Hong, J.A.Long, L.Li, J.E.Moreno, M.E.Bowman, L.J.Ivans, Y.Cheng, J.Lim, Y.Zhao, C.L.Ballare, G.Sandberg, J.P.Noel, and J.Chory. 2008. Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell* **133**: 164-176.
326. Thompson DM. *Systematics of Antirrhinum (Scrophulariaceae) in the new world*.
327. Thompson,D.M. *Systematics of Antirrhinum (Scrophulariaceae) in the New World*, American Society of Plant Taxonomists, Ann Arbor, Mich. (USA).
328. Thompson,J.D. 2001. How do visitation patterns vary among pollinators in relation to floral display and floral design in a generalist pollination system? *Oecologia* **126**: 386-394.
329. Timmermans,M.C.P., A.Hudson, P.W.Becraft, and T.Nelson. 1999. ROUGH SHEATH2: A Myb Protein That Represses knox Homeobox Genes in Maize Lateral Organ Primordia. *science* **284**: 151-153.
330. Toledo-Ortiz,G., E.Huq, and P.H.Quail. 2003. The Arabidopsis Basic/Helix-Loop-Helix Transcription Factor Family. *Plant Cell* **15**: 1749-1770.

331. Torii, K.U., N. Mitsukawa, T. Oosumi, Y. Matsuura, R. Yokoyama, R.F. Whittier, and Y. Komeda. 1996. The Arabidopsis ERECTA Gene Encodes a Putative Receptor Protein Kinase with Extracellular Leucine-Rich Repeats. *Plant Cell* **8**: 735-746.
332. Trobner, W., L. Ramirez, P. Motte, I. Hue, P. Huijser, W.E. Lonig, H. Saedler, H. Sommer, and Z. Schwarz-Sommer. 1992. GLOBOSA: a homeotic gene which interacts with DEFICIENS in the control of Antirrhinum floral organogenesis. *EMBO J.* **11**: 4693-4704.
333. Truernit, E. and J. Haseloff. 2008. Arabidopsis thaliana outer ovule integument morphogenesis: Ectopic expression of KNAT1 reveals a compensation mechanism. *BMC Plant Biology* **8**: 35.
334. Tsiantis, M., R. Schneeberger, J.F. Golz, M. Freeling, and J.A. Langdale. 1999. The maize rough sheath2 gene and leaf development programs in monocot and dicot plants. *science* **284**: 154-156.
335. Tsukaya, H. 2002. Interpretation of mutants in leaf morphology: Genetic evidence for a compensatory system in leaf morphogenesis that provides a new link between cell and organismal theories. *International Review of Cytology - A Survey of Cell Biology*, Vol 217 **217**: 1-39.
336. Tsukaya, H. 2003. Organ shape and size: a lesson from studies of leaf morphogenesis. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 57-62.
337. Ueno, Y., T. Ishikawa, K. Watanabe, S. Terakura, H. Iwakawa, K. Okada, C. Machida, and Y. Machida. 2007. Histone Deacetylases and ASYMMETRIC LEAVES2 Are Involved in the Establishment of Polarity in Leaves of Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 445-457.
338. Van Kleunen, M. and M. Fischer. 2005. Constraints on the evolution of adaptive phenotypic plasticity in plants. *New Phytologist* **166**: 49-60.
339. Vernoux, T. and P.N. Benfey. 2005. Signals that regulate stem cell activity during plant development. *Current Opinion in Genetics & Development* **15**: 388-394.
340. Via, S., R. Gomulkiewicz, G. Dejong, S.M. Scheiner, C.D. Schlichting, and P.H. Vantienderen. 1995. Adaptive Phenotypic Plasticity - Consensus and Controversy. *Trends in Ecology & Evolution* **10**: 212-217.
341. Vijayraghavan, U., K. Prasad, and E. Meyerowitz. 2005. Specification and maintenance of the floral meristem: interactions between positively-acting promoters of flowering and negative regulators. *Current Science* **89**: 1835-1843.
342. Vinardell, J.M., E. Fedorova, A. Cebolla, Z. Kevei, G. Horvath, Z. Kelemen, S. Tarayre, F. Roudier, P. Mergaert, A. Kondorosi, and E. Kondorosi. 2003. Endoreduplication mediated by the anaphase-promoting complex activator CCS52A is required for symbiotic cell differentiation in Medicago truncatula nodules. *Plant Cell* **15**: 2093-2105.
343. Vincent, C.A., R. Carpenter, and E.S. Coen. 1995. Cell lineage patterns and homeotic gene activity during Antirrhinum flower development. *Current Biology* **5**: 1449-1458.
344. Vincent, C.A. and E.S. Coen. 2004. A temporal and morphological framework for flower development in Antirrhinum majus. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique* **82**: 681-690.
345. Waddington, C. 1942. Canalization of development and the inheritance of acquired characters. *Nature* **150**: 563-565.

346. Wagner,G.P. 1995. Adaptation and the modular design of organisms. *Advances in Artificial Life* **929**: 317-328.
347. Wagner,G.P. and K.Schwenk. 2000. Evolutionarily stable configurations: Functional integration and the evolution of phenotypic stability. *Evolutionary Biology*, Vol 31 **31**: 155-217.
348. Waites,R. and A.Hudson. 1995. Phantastica - A Gene Required for Dorsoventrality of Leaves in *Antirrhinum-Majus*. *Development* **121**: 2143-2154.
349. Waites,R. and A.Hudson. 2001. The Handlebars gene is required with Phantastica for dorsoventral asymmetry of organs and for stem cell activity in *Antirrhinum*. *Development* **128**: 1923-1931.
350. Waites,R., H.R.N.Selvadurai, I.R.Oliver, and A.Hudson. 1998. The PHANTASTICA gene encodes a MYB transcription factor involved in growth and dorsoventrality of lateral organs in *Antirrhinum*. *Cell* **93**: 779-789.
351. Weigel,D. and E.M.Meyerowitz. 1994. The Abcs of Floral Homeotic Genes. *Cell* **78**: 203-209.
352. Weiner,J. 2004. Allocation, plasticity and allometry in plants. *Perspectives in Plant Ecology Evolution and Systematics* **6**: 207-215.
353. Weinig,C., J.Johnston, Z.M.German, and L.M.Demink. 2006. Local and global costs of adaptive plasticity to density in *Arabidopsis thaliana*. *American Naturalist* **167**: 826-836.
354. Weir,I., J.P.Lu, H.Cook, B.Causier, Z.Schwarz-Sommer, and B.Davies. 2004. CUPULIFORMIS establishes lateral organ boundaries in *Antirrhinum*. *Development* **131**: 915-922.
355. Weiss,J., L.Delgado-Benarroch, and M.Egea-Cortines. 2005. Genetic control of floral size and proportions. *Int.J.Dev.Biol.* **49**: 513-525.
356. West-Eberhard,M.J. *Developmental plasticity and evolution*, Oxford University Press.
357. Whibley,A. and C.Baxter. 2004. *Antirrhinum*. *Curr.Biol* **14**: R260-R261.
358. William,D.A., Y.Su, M.R.Smith, M.Lu, D.A.Baldwin, and D.Wagner. 2004. Genomic identification of direct target genes of LEAFY. *PNAS* **101**: 1775-1780.
359. Woodward,C., S.M.Bemis, E.J.Hill, S.Sawa, T.Koshiba, and K.U.Torii. 2005. Interaction of Auxin and ERECTA in Elaborating *Arabidopsis* Inflorescence Architecture Revealed by the Activation Tagging of a New Member of the YUCCA Family Putative Flavin Monooxygenases. *Plant Physiol.* **139**: 192-203.
360. Worley,A.C., A.M.Baker, J.D.Thompson, and S.C.H.Barrett. 2000. Floral display in *Narcissus*: Variation in flower size and number at the species, population, and individual levels. *International Journal of Plant Sciences* **161**: 69-79.
361. Wurschum,T., R.Gross-Hardt, and T.Laux. 2006. APETALA2 Regulates the Stem Cell Niche in the *Arabidopsis* Shoot Meristem. *Plant Cell* **18**: 295-307.
362. Xiaoxing Li, Xuepeng Duan, Haixiong Jiang, Yujin Sun, Yuanping Tang, Zheng Yuan, Jingkang Guo, Wanqi Liang, Liang Chen, Jingyuan Yin, Hong Ma, Jian Wang, and Dabing Zhang. 2006. Genome-Wide Analysis of Basic/Helix-Loop-Helix Transcription Factor Family in Rice and *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **141**: 1167-1184.

363. Xu,B., Z.Li, Y.Zhu, H.Wang, H.Ma, A.Dong, and H.Huang. 2008. Arabidopsis Genes AS1, AS2, and JAG Negatively Regulate Boundary-Specifying Genes to Promote Sepal and Petal Development. *Plant Physiol.* **146**: 566-575.
364. Xue,Y., R.Carpenter, H.G.Dickinson, and E.S.Coen. 1996. Origin of allelic diversity in antirrhinum S locus RNases. *Plant Cell* **8**: 805-814.
365. Yang,T., L.Xue, and L.An. 2007. Functional diversity of miRNA in plants. *Plant Sci.* **172**: 423-432.
366. Yanofsky,M.F., H.Ma, J.L.Bowman, G.N.Drews, K.A.Feldmann, and E.M.Meyerowitz. 1990. The Protein Encoded by the Arabidopsis Homeotic Gene Agamous Resembles Transcription Factors. *nature* **346**: 35-39.
367. Yu,H., T.Ito, Y.X.Zhao, J.R.Peng, P.Kumar, and E.M.Meyerowitz. 2004. Floral homeotic genes are targets of gibberellin signaling in flower development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 7827-7832.
368. Zachgo,S., E.Silva, P.Motte, W.Trobner, H.Saedler, and Z.Schwarz-Sommer. 1995. Functional analysis of the Antirrhinum floral homeotic DEFICIENS gene in vivo and in vitro by using a temperature-sensitive mutant. *Development* **121**: 2861-2875.
369. Zenoni,S., L.Reale, G.B.Tornielli, L.Lanfalconi, A.Porceddu, A.Ferrarini, C.Moretti, A.Zamboni, S.Speghini, F.Ferranti, and M.Pezzotti. 2004. Downregulation of the *Petunia hybrida* alpha-expansin gene PhEXP1 reduces the amount of crystalline cellulose in cell walls and leads to phenotypic changes in petal limbs. *Plant Cell* **16**: 295-308.
370. Zhang,D., A.M.Armitage, J.M.Affolter, and M.A.Dirr. 1996. Environmental control of flowering and growth of *Achillea millefolium* L 'Summer Pastels'. *Hortscience* **31**: 364-365.
371. Zhang,D.F., Q.Y.Yang, W.D.Bao, Y.Zhang, B.Han, Y.B.Xue, and Z.K.Cheng. 2005. Molecular cytogenetic characterization of the *Antirrhinum majus* genome. *Genetics* **169**: 325-335.

ANEXO TABLAS

IX ANEXO TABLAS

Tabla 16: Diferencias interregionales e intraregionales del área celular en el lóbulo abaxial del pétalo dorsal.

| REGIÓN | Sub-Región | Media (μm^2) \pm ET ³ | Diferencia | Número total | Grupos ⁵ Homogéneos | | | |
|--------|----------------|---|-----------------|--------------|-----------------------------------|---|---|---|
| | | | | | | | | |
| 1 | C ¹ | 1529,60 \pm 38,08 | ns ⁴ | 124 | | | c | d |
| | P ² | 1621,56 \pm 109,06 | | | | | | |
| 2 | C | 1302,97 \pm 46,39 | * | 125 | a | | | |
| | P | 1175,41 \pm 24,15 | | | | | | |
| 3 | C | 1532,11 \pm 61,54 | ns | 125 | | b | | |
| | P | 1428,41 \pm 27,88 | | | | | | |
| 4 | C | 1525,59 \pm 78,71 | ns | 125 | | b | | |
| | P | 1411,32 \pm 31,24 | | | | | | |
| 5 | C | 1308,05 \pm 64,34 | ns | 113 | a | | | |
| | P | 1231,3 \pm 26,86 | | | | | | |
| 6 | C | 1546,02 \pm 58,44 | ns | 125 | | b | c | |
| | P | 1470,35 \pm 29,10 | | | | | | |
| 7 | C | 1642,42 \pm 116,69 | ns | 111 | | | | d |
| | P | 1720,97 \pm 38,96 | | | | | | |
| 8 | C | 1268,49 \pm 64,31 | ns | 100 | a | | | |
| | P | 1243,13 \pm 35,50 | | | | | | |

¹C: sub-región central

²P: sub-región periférica

³ET: error típico

⁴ns: diferencia no significativa

⁵ los grupos identificados con la misma letra no presentan diferencias entre sí

* diferencia significativa $p < 0.05$.

Tabla 17: Diferencias interregionales e intraregionales del área celular en el lóbulo adaxial del pétalo dorsal

| REGIÓN | Sub-Región | Media (μm^2) \pm ET ³ | Diferencias | Nº total muestras | Grupos ⁵ Homogéneos | |
|--------|----------------|---|-----------------|-------------------|--------------------------------|---|
| 3 | C ¹ | 1514,81 \pm 48,47 | ns ⁴ | 138 | a | |
| | P ² | 1502,09 \pm 41,77 | | | | |
| 5 | C | 1137,98 \pm 26,70 | ns | 188 | | b |
| | P | 1092,87 \pm 20,24 | | | | |
| 6 | C | 1502,49 \pm 35,99 | ns | 149 | a | |
| | P | 1561,33 \pm 52,15 | | | | |
| 8 | C | 1143,93 \pm 24,62 | ns | 138 | | b |
| | P | 1116,29 \pm 24,61 | | | | |

¹C: sub-región central

²P: sub-región periférica

³ ET: error típico

⁴ ns: diferencia no significativa

⁵ los grupos identificados con la misma letra no presentan diferencias entre sí

* diferencia significativa $p < 0.05$.

Tabla 18: Parámetros vegetativos y número de flores en condiciones de hacinamiento.

| | Entrenudo 1 (mm) | Entrenudo 2 (mm) | Entrenudo 3 (mm) | Altura total (cm) | Nº flores | Nº hojas decusadas | Nº hojas espiraladas | Nº hojas totales | Área foliar (cm ²) |
|----------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|------------|--------------------|----------------------|------------------|-----------------------------------|
| 1 ¹ | 15,40±2,23 | 23,51±3,86 | 29,93±3,80 | 47,90±5,09 | 16,97±3,32 | 7,20±1,27 | 5,63±3,66 | 12,83±2,56 | 145,70±25,79 |
| 5 ¹ | 13,45±3,04 | 20,25±3,95 | 27,77±5,11 | 33,30±8,31 | 9,38±4,20 | 7,31±1,67 | 5,88±4,08 | 13,19±2,90 | 100,83±31,90 |
| 10 ¹ | 13,52±2,72 | 20,07±2,83 | 27,27±5,73 | 29,54±5,76 | 8,13±4,71 | 6,96±1,49 | 8,30±3,44 | 15,26±2,42 | 105,18±28,48 |
| 1 vs. 5 ² % | -12,62*** | -13,87*** | -7,19*** | -30,49*** | -44,69*** | 1,50 | 4,46 | 2,80 | -30,79*** |
| 1 vs. 10 % ² | -12,18** | -14,62*** | -8,89*** | -38,33*** | -52,08*** | -3,38 | 47,41* | 18,92** | -27,81*** |

1promedio ± desviación estándar

2 Diferencia expresada en % considerando al tratamiento control

100%

*P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001

Las medidas fueron realizadas en 30 individuos totales.

Tabla 19: Parámetros florales en condiciones de hacinamiento

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|-----------------------|------------|------------|------------|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 ¹ | 12,73±2,12 | 30,66±3,72 | 24,38±5,70 | 9,14±1,25 | 14,20±1,65 | 38,41±4,38 | 25,51±3,96 | 33,72±3,80 | 23,91±1,37 | 21,16±1,76 | 14,33±1,15 |
| 5 ¹ | 12,76±1,46 | 28,65±2,59 | 24,19±3,47 | 9,06±1,34 | 13,62±0,66 | 38,24±3,86 | 25,34±3,16 | 33,97±4,56 | 24,13±1,68 | 21,88±1,04 | 13,66±1,39 |
| 10 ¹ | 11,38±1,39 | 29,06±2,51 | 25,54±2,87 | 8,72±0,63 | 13,55±0,69 | 37,68±1,99 | 24,51±1,80 | 34,90±3,42 | 23,34±0,73 | 21,26±1,02 | 14,30±0,75 |
| 1 vs. 5 ² | | | | | | | | | | | |
| % | 0,25 | -6,53* | -0,77 | -0,82 | -4,09** | -0,46 | -0,67 | 0,74 | 0,89 | 3,44* | -4,66 |
| 1 vs. 10 ² | | | | | | | | | | | |
| % | -10,60** | -5,21* | 4,73 | -4,56 | -4,63** | -1,90 | -3,91 | 3,51 | -2,40* | 0,49 | -0,21 |

1 Promedio (mm) ± desviación estándar

2 Diferencia expresada en % considerando al tratamiento control 100%

*P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001

Las medidas fueron realizadas en 30 individuos totales.

Tabla 20: Parámetros de las cápsulas

| | Peso (gr) | Largo (mm) | Ancho (mm) |
|-----------------------|-----------|------------|------------|
| 1 ¹ | 0,12±0,00 | 11,06±0,29 | 7,31±0,15 |
| 5 ¹ | 0,10±0,00 | 9,63±0,31 | 6,08±0,24 |
| 10 ¹ | 0,08±0,01 | 9,91±0,33 | 6,21±0,17 |
| 1 vs. 5 ² | -20,03*** | -12,97*** | -16,78*** |
| 1 vs. 10 ² | -36,04*** | -10,41*** | -14,96*** |

¹promedio ± desviación estándar

² Diferencia expresada en % considerando al tratamiento control 100%

*P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001.

Las medidas fueron realizadas en 30 individuos totales.

Tabla 21: Parámetros vegetativos y número de flores en plantas con reducción del área foliar (raf).

| | entrenudo 1 (mm) | entrenudo 2 (mm) | entrenudo 3 (mm) | altura total (cm) | Nº flores | largo 2º par. (mm) | ancho 2º par. (mm) | largo 3º par. (mm) | ancho 3º par. (mm) |
|--------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Control ¹ | 15,40±2,23 | 23,51±3,86 | 29,93± | 47,90±5,09 | 16,97±3,32 | 37,25±4,03 | 25,75±2,83 | 53,31±5,06 | 29,76±2,85 |
| raf media ¹ | 14,62±2,06 | 21,91±3,30 | 29,83±3,64 | 37,78±5,49 | 15,44±5,06 | 40,58±3,79 | 29,39±3,40 | 59,73±4,95 | 34,46±4,01 |
| raf total ¹ | 13,94±1,96 | 19,62±2,68 | 26,13±3,59 | 29,70±5,89 | 9,00±5,07 | | | | |
| % raf medio ² | -5,06 | -6,80 | -0,40 | -21,13*** | -9,02 | 8,90*** | 14,13*** | 12,04*** | 15,70*** |
| % raf total ² | -9,50* | -16,50*** | -12,70*** | -38,00*** | -47,00*** | | | | |

¹promedio ± desviación estándar

² Diferencia entre el tratamiento y el control expresada en % considerando al tratamiento control 100%

*P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001

Las medidas fueron realizadas en 30 individuos totales.

Tabla 22: Parámetros florales en plantas con reducción del área foliar (raf)

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|------------------------|------------|------------|------------|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Control ¹ | 12,73±2,12 | 30,66±3,72 | 24,38±5,70 | 9,14±1,25 | 14,20±1,65 | 38,41±4,38 | 25,51±3,96 | 33,72±3,80 | 23,91±1,37 | 21,16±1,76 | 14,33±1,15 |
| Raf media ¹ | 12,47±1,71 | 29,77±3,27 | 21,56±3,18 | 8,52±0,44 | 13,44±0,66 | 36,67±2,91 | 23,69±2,71 | 32,51±3,38 | 23,29±0,86 | 21,52±1,27 | 13,83±0,93 |
| Raf total ¹ | 13,85±1,22 | 29,36±2,35 | 21,79±3,97 | 8,73±0,73 | 12,45±0,95 | 36,25±2,63 | 24,87±3,06 | 30,41±4,08 | 23,29±0,93 | 21,04±1,29 | 14,13±1,08 |
| raf media ² | -2,04 | -2,90 | -11,56* | -6,78* | -5,35*** | -4,53** | -7,13* | -3,58 | -2,59* | 1,70 | -3,48 |
| raf total ² | 8,79* | -4,24 | -10,80* | -4,50 | -12,32*** | -5,62** | -2,50 | -9,81** | -2,60* | -0,56 | -1,39 |

¹promedio (mm) ± desviación estándar

² Diferencia entre el tratamiento y el control expresada en % considerando al tratamiento control 100%

*P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001

Las medidas fueron realizadas en 30 individuos totales.

