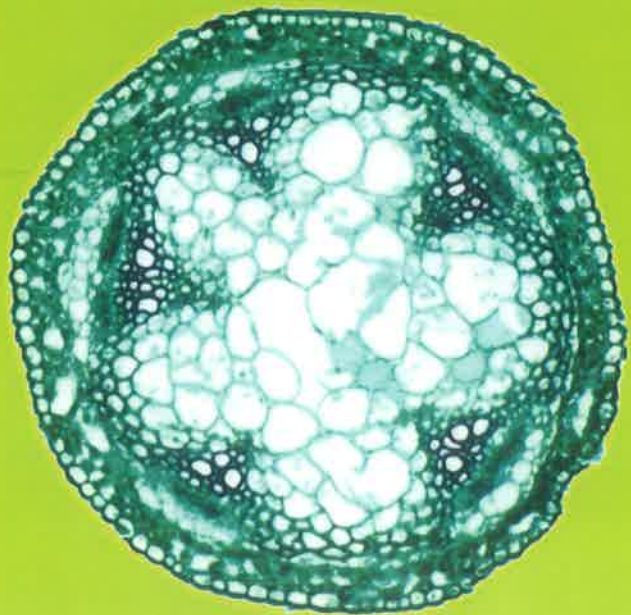


Arabidopsis thaliana a través
del microscopio óptico de campo
claro y del microscopio
electrónico de transmisión



Silvia González Sierra

Rafael Álvarez Nogal

***Arabidopsis thaliana* a través del
microscopio óptico de campo
claro y del microscopio
electrónico de transmisión**

**Silvia González Sierra
Rafael Álvarez Nogal**



**Universidad de León
2007**

González Sierra, Silvia

Arabidopsis thaliana a través del microscopio óptico de campo claro y del microscopio electrónico de transmisión / Silvia González Sierra, Rafael Álvarez Nogal. –[León] : Universidad de León, Secretariado de Publicaciones, 2007

152 p. : il. ; 24 cm.

Bibliogr. p. 143-152

ISBN 978-84-9773-343-4

1. Arabidopsis thaliana-Morfología. 2. Arabidopsis thaliana-Desarrollo. I. Título. II. Álvarez Nogal, Rafael. III. Universidad de León. Secretariado de Publicaciones

582.683.2(043.2)



© Universidad de León
Secretariado de Publicaciones

© Los Autores

ISBN: 978-84-9773-343-4

Dep. Legal: LE-1214-2007

Impreso en España / Printed in Spain

Servicio de Imprenta de la Universidad de León

2007

***Arabidopsis thaliana* a través del
microscopio óptico de campo
claro y del microscopio
electrónico de transmisión**

Nadie nos puede quitar, ni jamás podemos perder, algo que es realmente nuestro y nos pertenece, de la misma manera como lo que no es nuestro ni nos pertenece lo perderemos con toda seguridad.

Almudena

*Todas las cosas próximas o lejanas en secreto están relacionadas unas con otras.
Y no se puede tocar una flor sin alterar una estrella.*

Francis Thompson

Índice

0.- JUSTIFICACIÓN	9
1.- INTRODUCCIÓN	13
1.1.- Validez de los sistemas modelo	15
1.2.- <i>Arabidopsis thaliana</i>	17
1.2.1.- <i>A. thaliana</i> como sistema modelo	17
1.2.2.- Historia del trabajo experimental en <i>Arabidopsis thaliana</i>	19
1.2.3.- Taxonomía, distribución geográfica y ecotipos.....	24
1.2.4.- Descripción morfológica.....	25
1.3.- Metodología.....	31
1.3.1.- Cultivo de <i>A. thaliana</i> en maceta	31
1.3.2.- Toma de muestras	31
1.3.3.- Estudio a microscopía óptica	32
1.3.4.- Estudio a microscopía electrónica	33
2.- ESTRUCTURA Y ULTRAESTRUCTURA	35
2.1.- Raíz	37
2.1.1.- Fotografías	38
2.1.2.- Comentario.....	54
2.2.- Tallo.....	55
2.2.1.- Fotografías	56
2.2.2.- Comentario.....	72
2.3.- Hojas.....	73
2.3.1.- Fotografías	74
2.3.2.- Comentario.....	94
2.4.- Flor	97
2.4.1.- Fotografías	98

2.4.2.- Comentario.....	120
2.5.- Fruto.....	121
2.5.1.- Fotografías	122
2.5.2.- Comentario.....	132
2.6.- Semilla.....	133
2.6.1.- Fotografías	134
2.6.2.- Comentario.....	140
3.- BIBLIOGRAFÍA.....	141
3.1.- Bibliografía citada.....	143
3.2.- Bibliografía consultada	149

Justificación

El desarrollo de las plantas es un proceso dinámico en el que la tipología y geometría de los órganos cambian en el tiempo, aparentemente de manera compleja.

En los últimos treinta-cuarenta años se han aislado numerosos mutantes de *Arabidopsis thaliana* con alteraciones que afectan a la morfología de distintos órganos. En los primeros trabajos cada mutación se usaba exclusivamente como marcador posicional en mapas genéticos^{1,2} por lo que los fenotipos asociados a mutaciones no se analizaban desde la perspectiva de genética del desarrollo, siendo una excepción los trabajos realizados en esta dirección³. En la actualidad, la situación ha cambiado radicalmente y el análisis genético del desarrollo es uno de los campos de investigación más desarrollado entre los investigadores interesados en *Arabidopsis thaliana* como planta modelo^{4,5}.

Los estudios de morfogénesis basados en el uso de mutantes con frecuencia utilizan técnicas histológicas para detectar cambios a nivel estructural (microscopía óptica) y/o ultraestructural (a microscopía electrónica) en los análisis comparativos mutante vs. silvestre. Igualmente, se hace uso de dichas técnicas en el campo de la biotecnología de plantas cuando interesa identificar las células, tejidos u órganos en los que se expresa un determinado transgén. En estos trabajos los análisis realizados son muy detallados pero limitados al órgano, tejido o células estudiados^{6,7}.

El interés por caracterizar morfológica y estructuralmente los distintos órganos de *Arabidopsis thaliana* y dar una visión conjunta

de todos ellos se pone de manifiesto en “*Arabidopsis: an atlas of morphology and development*”⁸. En dicho trabajo, aunque se aporta información sobre los distintos órganos de *Arabidopsis thaliana*, el mayor aporte de datos está relacionado con la estructura de órganos florales.

En el presente trabajo se muestra un estudio realizado con microscopio óptico de campo claro y con microscopio electrónico de transmisión de estructuras presentes en plantas maduras de *Arabidopsis thaliana*. Se omite el estudio de los tricomas por considerar que para tal propósito debería usarse prioritariamente el microscopio estereoscópico y el microscopio electrónico de barrido, herramientas que aquí no se han empleado.

Silvia González Sierra trabaja como Técnico en el Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de León, y Rafael Álvarez Nogal es profesor del Área de Biología Celular, Departamento de Biología Molecular, de la Universidad de León.

Introducción

1.1. VALIDEZ DE LOS SISTEMAS MODELO.

Se entiende por organismo o sistema modelo aquel organismo experimental, que es utilizado ampliamente y de manera estandarizada por la comunidad científica, y que permite realizar sobre él estudios cuyos resultados y conclusiones son generalizables a otras especies. Actualmente los principales sistema modelo estudiados en el Reino Animalia y dentro de los vertebrados son el ratón *Mus musculus*, el pollo *Gallus gallus*, el anfibio *Xenopus laevis*, y más recientemente el pez cebra *Brachydanio rerio*⁹. Son los principales sistemas modelo estudiados en la actualidad debido sobre todo a su fácil obtención, manipulación y observación. Entre los invertebrados, la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* y el nematodo *Caenorhabditis elegans* son los más estudiados debido al conocimiento de su genoma y por que pueden ser modificados genéticamente de un modo sencillo, además de presentar un ciclo de vida muy corto y ser muy prolíficos¹⁰.

En cuanto a los Reinos Fungi, Protista, Archaea y Bacteria, no existen sistemas modelos tan claros como en el caso del reino Animalia, aunque son cada vez más numerosos los organismos de los que ya se conoce o se está secuenciando su genoma y son utilizados en ingeniería genética de forma habitual, este es el caso de la bacteria patógena *Mycoplasma pneumoniae*¹¹, la arquea *Methanococcus jannaschii*¹², la levadura *Saccharomyces cerevesiae*¹³, el hongo parásito *Candida albicans*¹⁴ y el protista *Dictyostelium discoideum*¹⁵. Pero sin duda, el organismo más ampliamente utilizado como modelo de estudio para avanzar en el conocimiento de la biología de procariontes y eucariontes ha sido

Escherichia coli; basta ojear cualquier fuente bibliográfica para constatar la tremenda importancia que esta eubacteria tiene en estudios de genética y biología molecular.

En el caso del Reino Plantae el criterio seguido para la elección de sistemas modelo, hasta finales del siglo XX, ha sido mayoritariamente el del interés agronómico que presentara la especie. En la década de los 80 continuaban con especial protagonismo especies como maíz (*Zea mays*) y soja (*Glycine max*), llegando a ser el maíz la especie mejor estudiada a pesar de ser una planta de gran tamaño, con una sola generación anual y un genoma haploide de $5,5 \times 10^9$ Kb¹⁶. Los científicos comenzaron a darse cuenta de que el verdadero éxito para llegar a comprender la fisiología y desarrollo de las plantas radicaba en conseguir un modelo de planta fácil de estudiar, ya que la mayor parte de los procesos de las plantas se regulan de forma parecida. La completa secuenciación y descubrimiento de las funciones de las proteínas producidas por una única y representativa especie modelo aportaría gran información sobre esas mismas funciones en otras especies. Es decir, una vez que un gen es identificado en el sistema modelo utilizado, el equivalente puede ser encontrado más fácilmente en otras plantas, de este modo, la función de muchos genes de interés en plantas cultivadas como soja, arroz, maíz, tomate, patata, algodón, etc puede ser estudiada mejor a través de sus homólogos en el modelo.

La especie modelo ideal debería de ser fácil de crecer y cruzar, y debería tener un ciclo de vida corto para que los estudios pudieran abarcar varias generaciones en pocos meses.

1.2. *Arabidopsis thaliana*.

1.2.1. *Arabidopsis thaliana* COMO SISTEMA MODELO.

Aún no siendo interesante como alimento o forraje, ni teniendo utilidad agrícola o farmacológica, *Arabidopsis thaliana* fue elegida como sistema modelo siendo la primera especie del Reino Plantae cuyo genoma iba a ser secuenciado¹⁷. Las razones que llevaron a esta elección¹⁸ fueron:

1. El pequeño tamaño de su genoma nuclear, de aproximadamente $12,5 \times 10^6$ pares de bases distribuidos en 5 cromosomas.
2. Su corto ciclo de vida: en aproximadamente 6 semanas puede conseguirse una generación cuando es cultivada a 25°C bajo iluminación continua.
3. Es una especie muy prolífica, capaz de producir más de 10.000 semillas por planta.
4. Es autógama, por lo que la obtención de mutaciones en homocigosis es muy sencilla, y además esta característica permite el mantenimiento de estirpes sin ninguna dificultad. Asimismo, la realización de cruzamientos se puede llevar a cabo fácilmente cuando se desee.
5. Su pequeño tamaño de aproximadamente 30 cm. de altura permite su cultivo en espacios reducidos.

6. Existen varios métodos de transformación por infección con *Agrobacterium tumefaciens*, lo cuál ha hecho posible la obtención de numerosas líneas de mutantes. La mutagénesis puede llevarse a cabo mediante procedimientos sencillos tales como sumergiendo las semillas en agentes mutagénicos químicos o irradiando las mismas mientras están sumergidas en agua¹⁹.

El genoma de *Arabidopsis thaliana* es el más pequeño conocido en plantas superiores; el arroz y el maíz, por ejemplo, presentan 3 y 20 veces más ADN por genoma haploide. Presenta un número muy bajo de secuencias repetidas; alrededor de un 10-15% del genoma es ADN altamente repetido, las secuencias codificantes para ARN ribosomal comprenden el 7,5%, y las repeticiones dispersas representan tan sólo un 1% del genoma nuclear, encontrándose muy alejadas unas de otras, lo cual la diferencia de otras angiospermas^{20, 21, 22}. A pesar de estas diferencias a nivel genómico *Arabidopsis thaliana* presenta características similares con otras angiospermas de interés agronómico en lo referente a la morfología, el crecimiento y desarrollo, la reproducción y la respuesta al estrés y a las enfermedades. Estas características hacen de *Arabidopsis thaliana* un modelo ideal para realizar experimentos genéticos de un modo más rápido, más sencillo y con menos coste que lo que permiten otras plantas.

Los resultados de la investigación con *Arabidopsis thaliana* no tienen sólo un gran valor aplicable en la mejora de plantas de interés agronómico, si no que también tiene gran importancia en la

revelación de los procesos vitales comunes al resto de plantas; únicos y que las diferencian de los animales.

1.2.2. HISTORIA DEL TRABAJO EXPERIMENTAL EN *Arabidopsis thaliana*.

En 1907 Friedrich Laibach²³ publicó el primer trabajo experimental en el que se utilizó *Arabidopsis thaliana*, poniendo de manifiesto en su estudio microscópico la presencia de cinco cromosomas, hecho que posteriormente fue constatado por otros investigadores. La primera colección de mutantes inducidos por rayos X fue obtenida por una de sus estudiantes, Erna Reinholz²⁴ en la década de los 40. Durante los años siguientes fueron relativamente pocos los investigadores que utilizaron esta planta en sus estudios, y no fue hasta finales de los 70, con el desarrollo de la biología molecular y el trabajo de Rédei²⁵ en 1975, en el que realizó las virtudes de *Arabidopsis thaliana* como especie modelo para el análisis genético, cuando esta planta se convirtió en el objeto de estudio por excelencia de los científicos especialistas en genética y biología molecular de las plantas²⁶.

En la década de los 80 se secuenciaron los primeros genes, comenzó la producción de líneas mutantes y se realizaron mapas físicos basados en RFLP (*restriction fragment length polymorphisms*). En 1983, Koornneef *et al*, publicaron el primer mapa genético detallado mostrando distancias entre marcadores genéticos en términos de frecuencia de recombinación, lo que permitió conocer la posición relativa de genes en los cromosomas²⁷.

En 1990 nace el *Multinational Coordinated Arabidopsis thaliana Genome Research Project* para promover la cooperación internacional en investigación básica y aplicada en *Arabidopsis thaliana*, se propone mediante experimentos genéticos y fisiológicos identificar, aislar, secuenciar y conocer la función de los genes de *Arabidopsis thaliana*, establecer una red electrónica mundial entre laboratorios y crear una base de datos en los que los nuevos conocimientos puedan ser compartidos por toda la comunidad científica. A partir de entonces se desarrollaron más y mejores métodos de transformación de plantas, se desarrollaron un gran número de líneas mutantes, librerías génicas y recursos genéticos que están a disposición de toda la comunidad científica a través de los centros de recursos públicos: ABRC en Estados Unidos (*Arabidopsis Biological Resource Center*), NASC en el Reino Unido (*Nottingham Arabidopsis Stock Center*), y SENDAI en Japón (*Arabidopsis Seed Stock Center*).

En Agosto de 1996 se crea en una reunión en la *National Science Foundation (NSF)*, en Arlington (EE. UU.), el *Arabidopsis Genome Initiative (AGI)*, como una suma de esfuerzos de varios equipos internacionales que se dedicaban a la secuenciación del genoma de *Arabidopsis thaliana* desde principios de la década de los 90 de forma individual. Tras cinco años de esfuerzo colectivo el resultado de este trabajo, la secuencia genómica completa de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia, se publicó en la revista *Nature* del 14 de diciembre de 2000²⁸.

Tras este extraordinario ejemplo de cooperación, ha surgido una importante y revolucionaria iniciativa: *The Multinational Coordinated Arabidopsis 2010 Project*²⁹, en el que se pretende llegar a conocer y entender las interacciones moleculares que se dan en las células a lo largo de todo el ciclo de vida de la planta, en definitiva, llegar a conocer para el año 2010, la función de los 25.498 genes que codifican para proteínas de 11.000 familias. El fin último de este proyecto es informatizar toda la información, de modo que se pueda observar el crecimiento de una planta virtual, pudiendo parar el proceso en cualquier punto del desarrollo, y mediante un sencillo "clic de ratón" acceder a toda la información genética expresada en cualquier órgano o célula, pudiendo variar las condiciones ambientales a voluntad.

La secuenciación del genoma de *Arabidopsis thaliana* y su disposición pública para toda la comunidad científica tienen implicaciones más allá de su aplicación directa en especies cultivadas. Estos son algunos de los campos en los que los resultados de los estudios realizados con *Arabidopsis thaliana* son aplicables:

- Biología Evolutiva: comparando el genoma de animales con el de la planta, y puesto que todos los seres vivos descienden de un único antecesor común, se espera poder llegar a comprender cómo ocurrió este salto evolutivo²⁸.

- Genética Humana: varios de los genes estudiados en *Arabidopsis thaliana* son parecidos, en cuanto a su secuencia, a genes asociados con enfermedades humanas; este es el caso del síndrome de Menkes y Wilson (relacionado con la asimilación del cobre), el síndrome de Bartter tipo III (relacionado con la absorción y recaptación de potasio), y algunos casos de cálculos renales hereditarios, todas ellas enfermedades relacionadas con el balance iónico²⁹. Se espera que el conocimiento de estos genes en *Arabidopsis thaliana* aporte valiosos conocimientos aplicables en la investigación de los complejos mecanismos de las enfermedades humanas.
- Relojes biológicos: mediante mutantes de *Arabidopsis thaliana* se han descubierto proteínas fotorreceptoras denominadas criptocromos, que juegan un papel central en la percepción de la luz y en la regulación de los relojes biológicos de plantas y animales³⁰.

La adopción de esta planta como organismo modelo ha convertido a la disciplina de la Biología de las Plantas en una fusión entre Genética Clásica y Genética Molecular con Biología del Desarrollo, Fisiología y Patología de las Plantas²⁶.

La caracterización, aislamiento y/u obtención de mutantes morfológicos, bioquímicos y/o fisiológicos²¹ ha permitido identificar genes de interés en plantas. Actualmente se ha conseguido la identificación y clonación de gran cantidad de genes de interés

agronómico: genes implicados en la tolerancia a la salinidad³¹, retraso de la floración^{32,33}, genes de regulación de la respuesta a la luz y al estrés^{34,35}, entre otros. La estrategia mayoritaria se basa en reconocer y manipular los genes reguladores, ya que las técnicas actuales de ingeniería genética no permiten manipular muchos genes a la vez; actuando sobre los genes que regulan un proceso se actúa sobre todas las etapas del proceso.

Cabe destacar, por último, la gran cantidad de información que continuamente se genera en relación a este organismo modelo. Existe toda una comunidad relacionada con *Arabidopsis thaliana*, en la que se incluyen recursos como la base de datos central TAIR (www.arabidopsis.org) en la que es posible encontrar todo tipo de información acerca de *Arabidopsis thaliana stock centres* en los que se pueden conseguir gratuitamente semillas silvestres y mutantes así como librerías de cADN y de genes, boletines electrónicos que permiten a los investigadores intercambiar información de manera rápida y sencilla, conferencias anuales, etcétera.

En la red Internet podemos encontrar más de 800.000 páginas en las que se hace referencia a esta planta, y el número de publicaciones ha crecido de una manera espectacular: en el año 1987 el número de publicaciones era de apenas 100, en el año 1995 este número se vio incrementado hasta unas 1000, diez años después, en 2005, eran más de 7200 las publicaciones acerca de *Arabidopsis thaliana*.

1.2.3. TAXONOMÍA, DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y ECOTIPOS.

La clasificación taxonómica, según la base de datos *USDA/NRCS* es la siguiente:

Reino Plantae

Subreino Tracheobionta (plantas vasculares)

Superdivisión Spermatophyta (plantas con semillas)

División Magnoliophyta (angiospermas, plantas con flores, fanerógamas)

Clase Magnoliopsida (dicotiledóneas)

Subclase Dilleniidae

Orden Capparales

Familia Brassicaceae (familia de las mostazas)

Género *Arabidopsis*

Especie ***Arabidopsis thaliana*** (L.) Heynh.

Arabidopsis thaliana es una planta anual con crecimiento vegetativo y reproductivo separado. En castellano, esta pequeña mala hierba es conocida como yuyo, jaramago, collejón, oruga, arabide, y erviana. En la familia de las brasicáceas se encuentran también algunas plantas de interés agronómico como la col (*Brassica oleraceae* L.), el rábano (*Raphanus sativus* L.), el nabo (*Brassica napus* L.), y las especias como la mostaza blanca (*Sinapis alba* L.) y la mostaza negra (*Brassica nigra* L. Koch); también se sitúan en esta familia plantas ornamentales como el alhelí (*Matthiola incana*)³⁵.

Es nativa de Europa, su existencia fue descrita por vez primera por Johannes Thal en el siglo XVI, quién la llamó *Pilosella*

siliquosa, aunque su origen geográfico exacto se desconoce. Su presencia ha sido constatada en diversas regiones y climas en Europa, Asia, África, Australia y Norte América, aunque se encuentra predominantemente en regiones con clima templado del hemisferio norte⁸.

Esta planta presenta una amplia distribución ecológica y geográfica, por lo que es lógico pensar que existe una gran variabilidad genética en poblaciones naturales de *Arabidopsis thaliana*. La mayoría de los ecotipos son anuales de invierno, germinando en otoño, por lo que pasan el invierno en la fase vegetativa de roseta, floreciendo finalmente en primavera. De entre los ecotipos silvestres, la mayor variabilidad reside en el tiempo de floración, como respuesta al fotoperíodo.

1.2.4. DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA.

El desarrollo vegetativo de *Arabidopsis thaliana* tiene una duración variable según las condiciones ambientales a las que esté sometida la planta, pudiendo oscilar desde 1-2 semanas hasta varios meses. En la Figura 1 se representa el ciclo de vida de *Arabidopsis thaliana* en condiciones de iluminación continua y a 25°C.

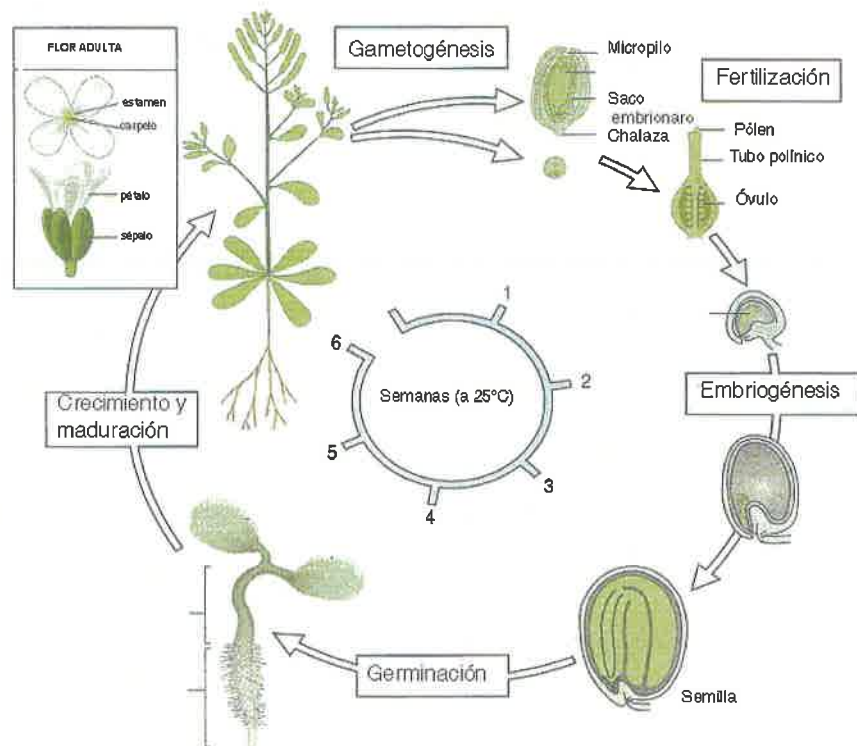


Figura 1: Ciclo de vida de *Arabidopsis thaliana*. Reproducido de Wolpert *et al.* (2002)³⁷.

La raíz se origina a partir del meristemo radicular y el tallo a partir del meristemo caulinar, mediante la producción reiterada de unidades denominadas fitómeros, que constan de un nudo, un entrenudo, una hoja y una yema lateral. Presenta una raíz primaria de muy pequeño tamaño, lo cual, junto con el bajo número de células que posee, la convierte en un sistema modelo para estudios de morfogénesis y función⁸. El tallo es erecto, simple o ramoso y cubierto en la base de pelos simples y ramificados, siendo glabro o glabrescente hacia el ápice.

Las hojas de *Arabidopsis thaliana* presentan cambios en su morfología, dependientes del estado de desarrollo de la planta (Figura 2), de modo que se diferencian varios tipos y estructuras con importantes diferencias en el patrón de distribución de tricomas³⁸. En la fase inicial de crecimiento las hojas basales forman una estructura en roseta debido al casi nulo crecimiento de los entrenudos. Dentro de esta estructura en roseta pueden diferenciarse dos estadios: roseta temprana y roseta adulta. En la fase de roseta temprana las hojas son redondeadas, pequeñas, enteras, presentan filotaxia decusada, y no presentan tricomas en el envés y muy pocos en el haz, mientras que en la fase de roseta adulta las hojas son grandes, espatuladas, aserradas, presentan filotaxia espiral, así como una gran densidad de tricomas en el haz y menos cantidad en el envés¹⁰.

En una fase posterior los entrenudos se elongan, y el meristemo apical forma la inflorescencia; en ésta también se consideran dos fases: inflorescencia temprana e inflorescencia tardía. En la fase de inflorescencia temprana aparecen hojas caulinares, las cuales carecen de peciolo, son oblongas o lanceoladas, presentan filotaxia espiral e inflorescencias laterales en las axilas³⁸. La fase de inflorescencia tardía se caracteriza por la aparición de flores laterales dispuestas en racimo, que no están acompañadas de hojas caulinares, estas flores se disponen en racimos alargados y laxos en la fructificación, siendo las más jóvenes las más cercanas al ápice. La transición entre ambas fases se denomina cambio de fase y ocurre de forma gradual, el criterio seguido como marcador de cambio de fase en *Arabidopsis thaliana* es la aparición de tricomas abaxiales (en el envés). Se ha observado

que este fenómeno ocurre en diferentes hojas según el ecotipo del que se trate. En el ecotipo Columbia (Col) la primera hoja con tricomas abaxiales es la quinta o sexta, mientras que, por ejemplo, en el ecotipo Landsberg *erecta* (Ler) es la tercera o cuarta.³⁹

En *Arabidopsis thaliana* aparecen tricomas en hojas caulinares, tallo y sépalos. Los tricomas de las hojas son generalmente estrellados, mientras que los de tallos y sépalos no presentan ramificaciones⁴⁰.

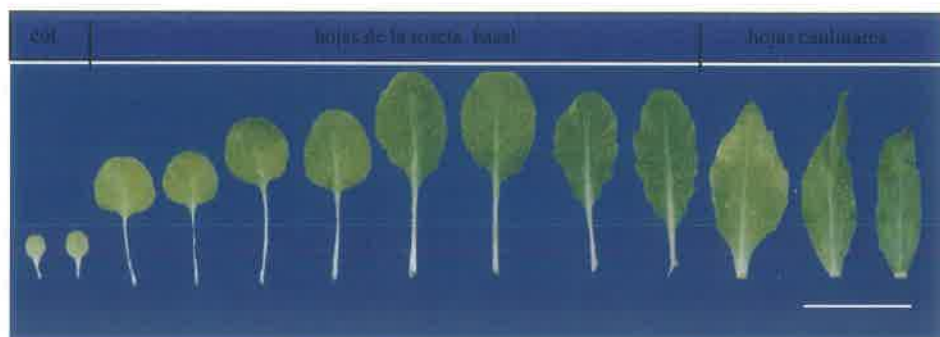


Figura 2: Cambios graduales en la forma de las hojas. Original de Tsukaya *et al.* 2000).³⁹

Las flores se disponen en racimo, y presentan la estructura típica de las brassicáceas: cada flor consiste en 4 sépalos hispídulos y raramente glabros que rodean 4 pétalos blancos y espatulados, los pétalos y sépalos se disponen alternamente. En el interior existen 6 estambres (2 cortos y 4 largos (4+2)) que contienen el polen y un ovario central formado por 2 carpelos que contienen los primordios seminales distribuidos en sus márgenes con placentación marginal. A partir del ovario fecundado se desarrolla el fruto, el cuál es una

silícula de porte erecto-patente a ligeramente arqueado y glabro. En su interior se desarrollan las semillas a partir de los óvulos fecundados. En aproximadamente dos semanas se formarán las semillas maduras, las cuáles son lisas y de un color amarillento-castaño⁴¹.

En la Figura 3 se muestra un ejemplar adulto de *Arabidopsis thaliana*.

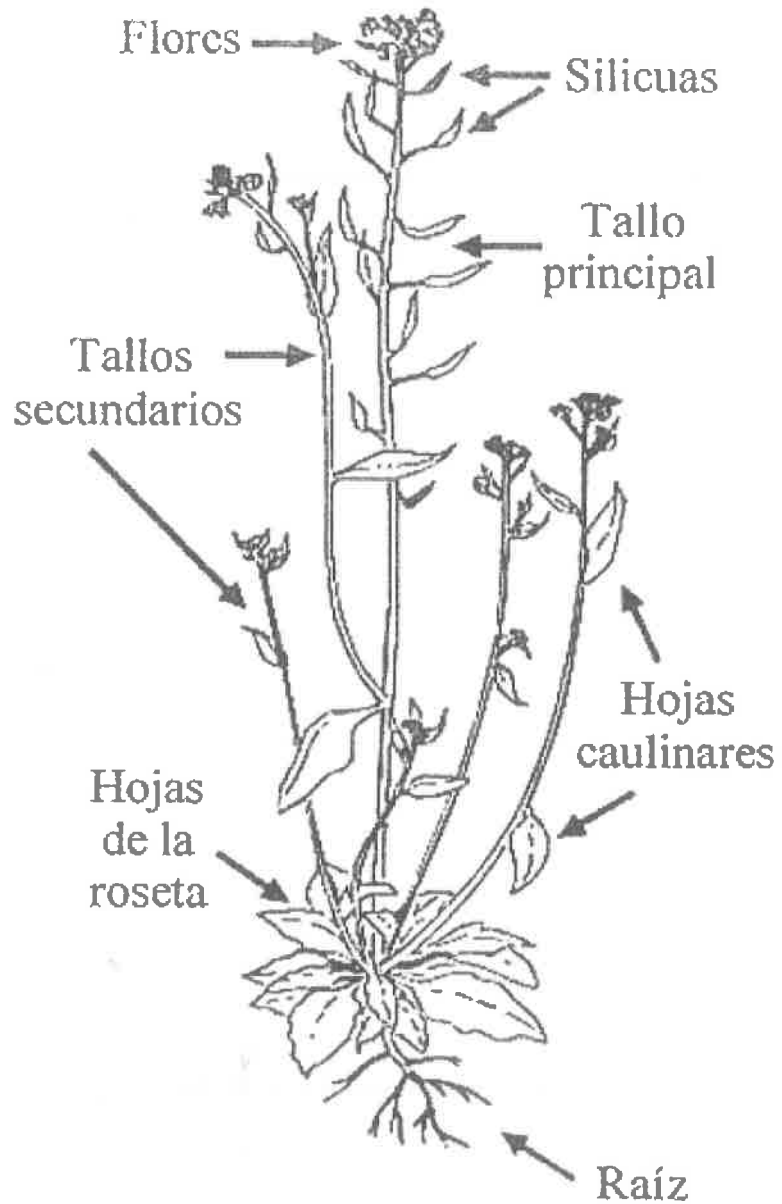


Figura 3: Representación de *Arabidopsis thaliana*. Reproducido de Morales, S. 1998¹⁰.

1.3. METODOLOGÍA.

1.3.1. CULTIVO DE *Arabidopsis thaliana* EN MACETA.

Como material de estudio se tomaron ejemplares de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia, en estadio fenológico de flor y fruto.

Se ha utilizado para su cultivo una turba genérica de la casa Compos Sana, y se regó con agua corriente. Las bandejas de plástico, de 30 x 50 cm contenían cada una 51 alveolos, cada uno de ellos de 5 cm de diámetro y 5 cm de altura. Se colocó una semilla por alveolo de modo que llegara hasta 1 cm por debajo del borde de cada uno. Cada bandeja se introdujo en cubetas de modo que las semillas estaban permanentemente irrigadas.

Los cultivos se mantuvieron bajo iluminación continua con tubos fluorescentes de la casa Silvana, modelo GRO-LUX F36W/GRO-T8. La temperatura se mantuvo a $22^{\pm} 2$ °C durante todo el periodo de crecimiento, que fue de aproximadamente 8 semanas.

1.3.2. TOMA DE MUESTRAS.

De ejemplares en estadio fenológico de flor y fruto, se tomaron muestras de raíz, tallo, hoja de roseta basal, hoja caulinar, flor y fruto.

- Raíz: unos 3 mm por debajo del cuello se tomó una porción de 0,5 cm.
- Tallo: entre la primera y la segunda rama lateral, se tomó una porción de 1 cm.
- Hoja de la roseta basal: cualquiera de ellas.
- Hoja caulinar: quinta hoja a partir de la primera ramificación.
- Flor: flor abierta indistintamente.
- Fruto: fruto maduro.

1.3.3. ESTUDIO A MICROSCOPIA ÓPTICA.

Para el estudio a microscopía óptica se fijaron plantas enteras en FAA, y se obtuvieron muestras de la forma indicada anteriormente para proceder a su posterior procesado: inclusión en Paraplast, obtención de cortes, tinción de los cortes, montaje y observación; siendo fotografiados los campos más representativos con cámara digital.

1.3.4. ESTUDIO A MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.

Tras la toma de muestras se procesaron atendiendo al siguiente protocolo: fijación doble en paraformaldehído-glutaraldehído y tetróxido de osmio, inclusión en resina LR White, obtención de cortes semifinos y ultrafinos y por último, observación de las secciones ultrafinas en el microscopio electrónico de transmisión, fotografiando los campos más representativos de cada muestra.

En la Figura 4 se representa, de forma esquemática, el proceso seguido para los estudios a microscopía óptica y electrónica.

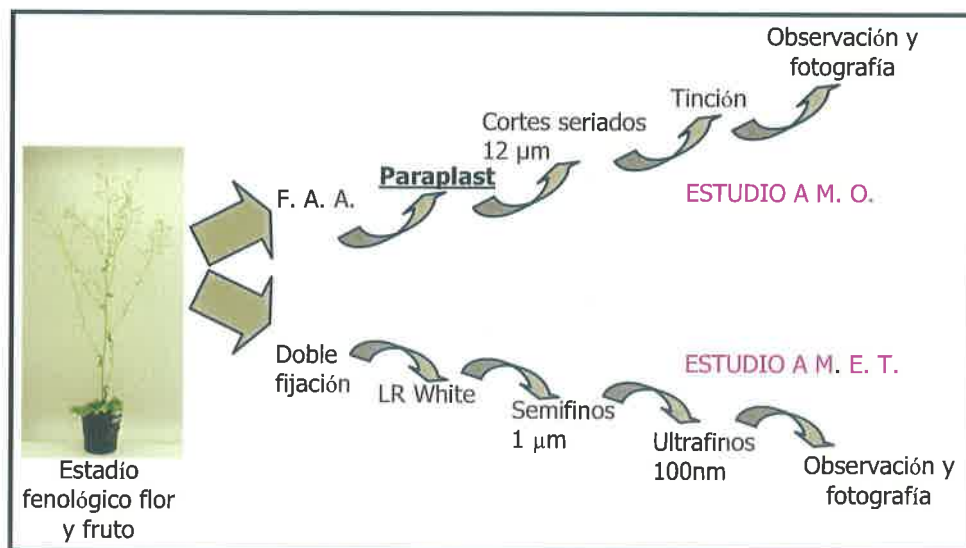


Fig. 4: Esquema del procesado de muestras.

***Estructura y
ultraestructura***

- * En todos los casos se identifica la fotografía (sección transversal, cubierta, etc), y se indica el número de aumentos del objetivo en las procedentes del microscopio óptico de campo claro (10x, 40x, etc) así como la equivalencia de la barra de calibración (2 micrómetros, 20 micrómetros, etc), en las procedentes del microscopio electrónico de transmisión

RAÍZ

Fig. 5. Raíz. Sección transversal. 20x.

Fig. 6. Raíz. Sección longitudinal. 20x.

En sección transversal se diferencian de fuera a dentro:

- Peridermis.
- Córtex.
- Sistema vascular.
- Médula.

En la zona estudiada, la raíz presenta crecimiento secundario lo cual se observa además de en la disposición colateral (y no radial) de los tejidos vasculares, en la presencia de peridermis con las características células suberificadas rodeando el córtex.

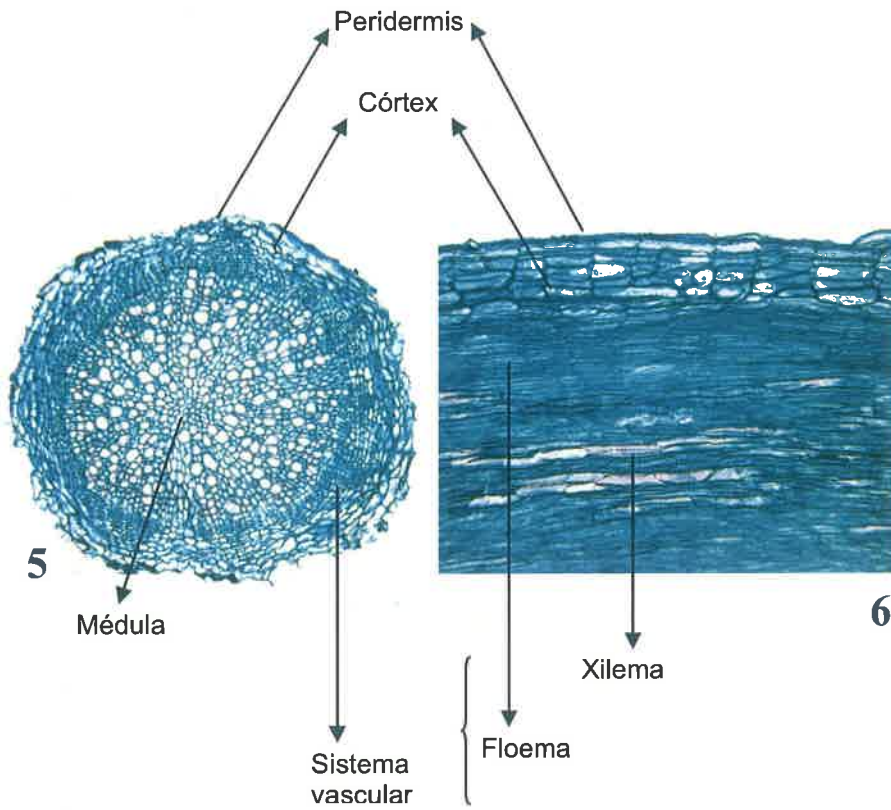


Fig. 7. Raíz. Sección transversal. 20x.

Fig. 8. Raíz. Sección longitudinal. 40x.

En las secciones transversales se observa el sistema vascular conformado como haz colateral. Además en el floema se observan acúmulos de células floemáticas (floema primario) que recuerdan que el haz vascular colateral procede de un haz vascular radial.

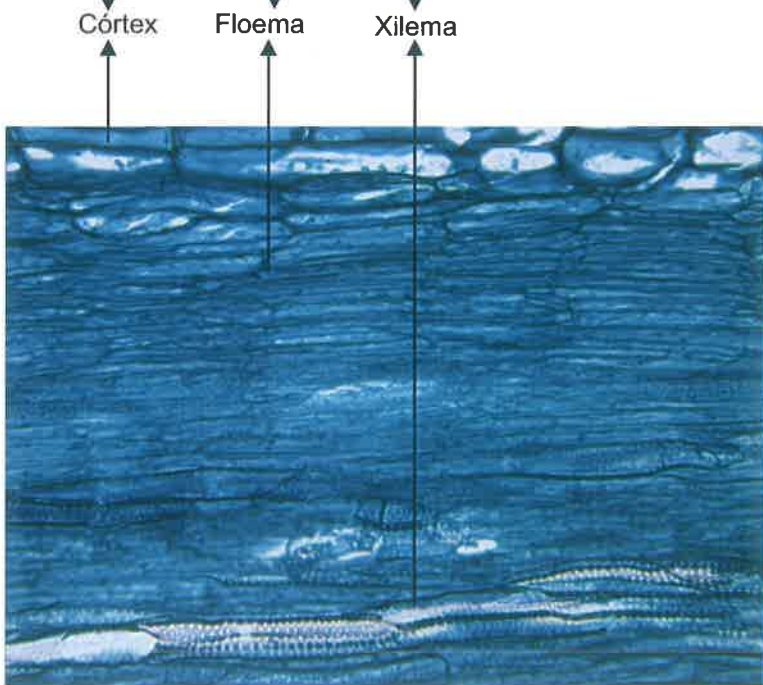
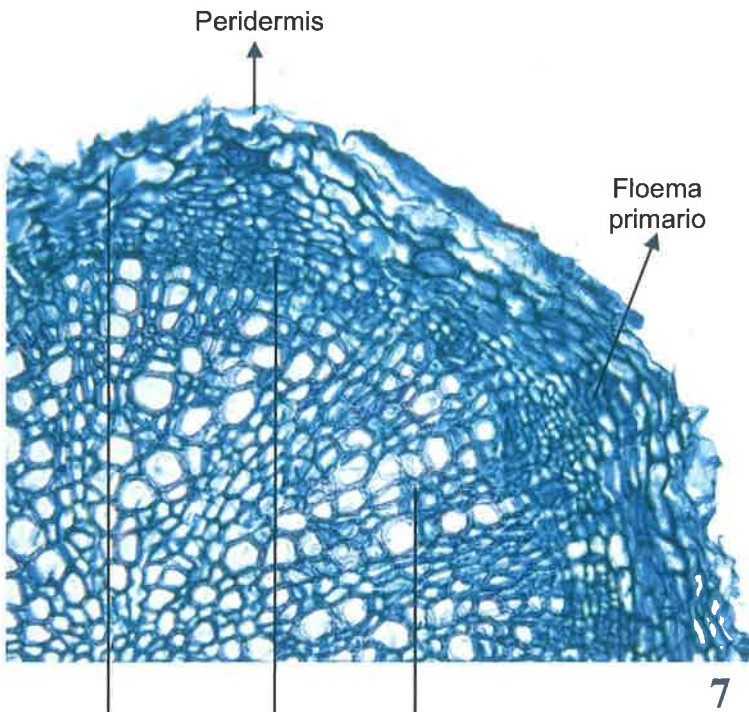


Fig. 9. Raíz. Sección transversal. 100x.

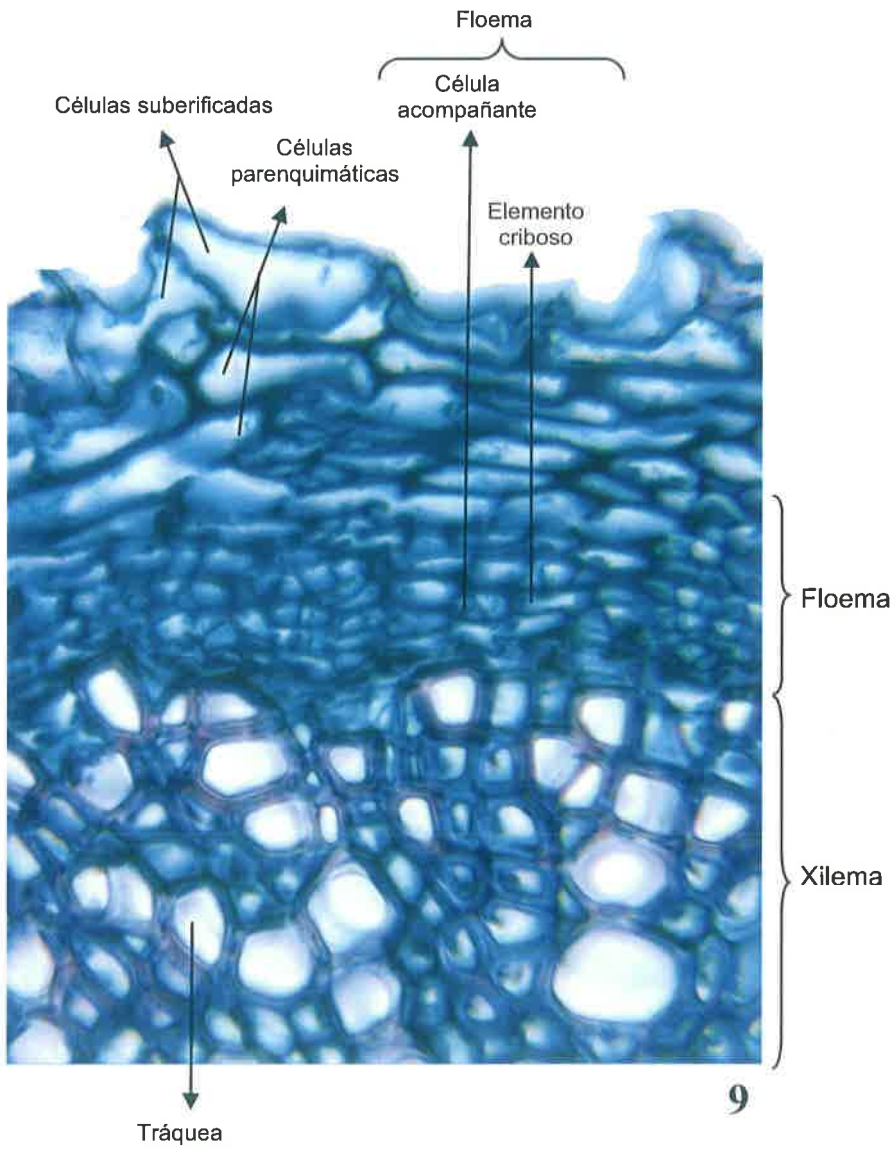


Fig. 10. Raíz. Peridermis. La barra equivale a 5 micrómetros.

Fig. 11. Raíz. Detalle de la anterior. La barra equivale a 5 micrómetros.

En la periferia de la raíz se observan células parenquimáticas que constituyen el córtex y por fuera de ellas, células suberificadas con sus lúmenes ocupados por aire y depósitos de suberina por debajo de la pared primaria.

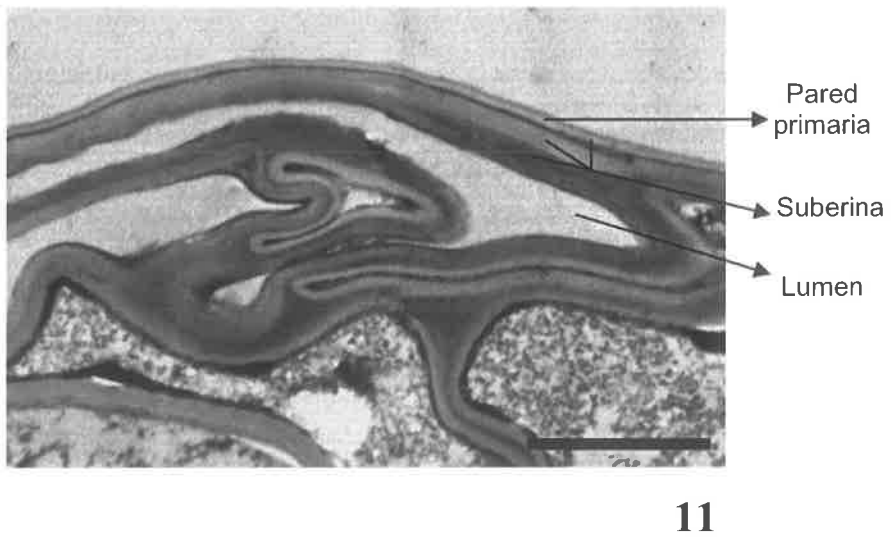
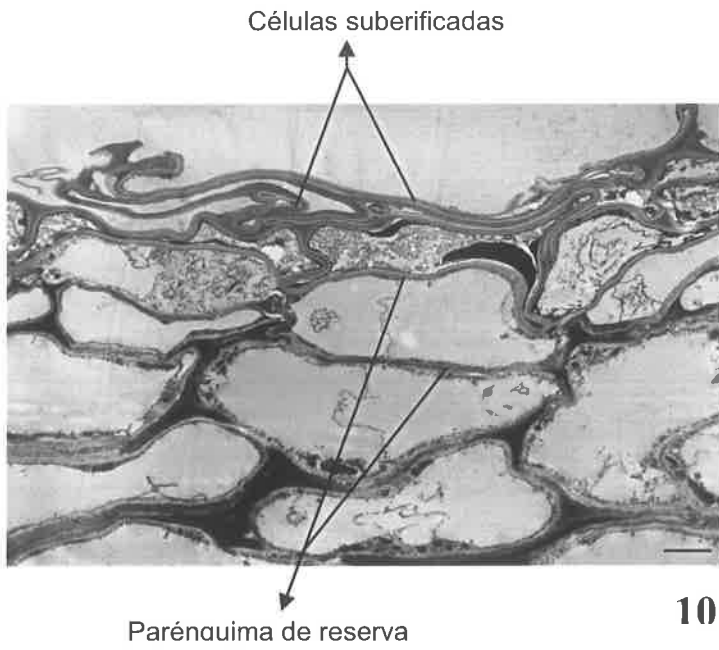


Fig. 12. Raíz. Sistema vascular. La barra equivale a 2 micrómetros.

El haz vascular de la raíz es un haz vascular colateral cerrado en el estadio fenológico estudiado. Las células originalmente meristemáticas (del cámbium vascular) se muestran como células parenquimáticas notablemente vacuolizadas.

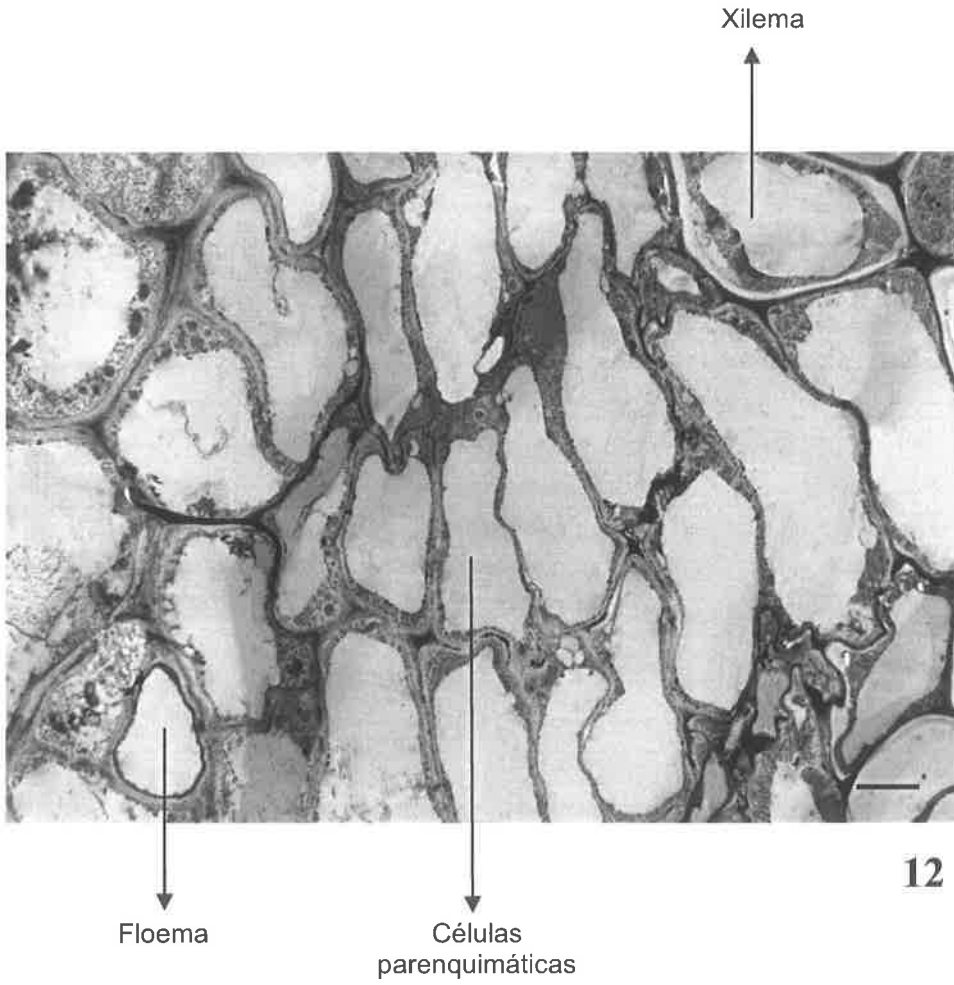


Fig. 13. Raíz. Floema. La barra equivale a 2 micrómetros.

El floema está constituido por los elementos cribosos (con pared primaria) y células acompañantes.

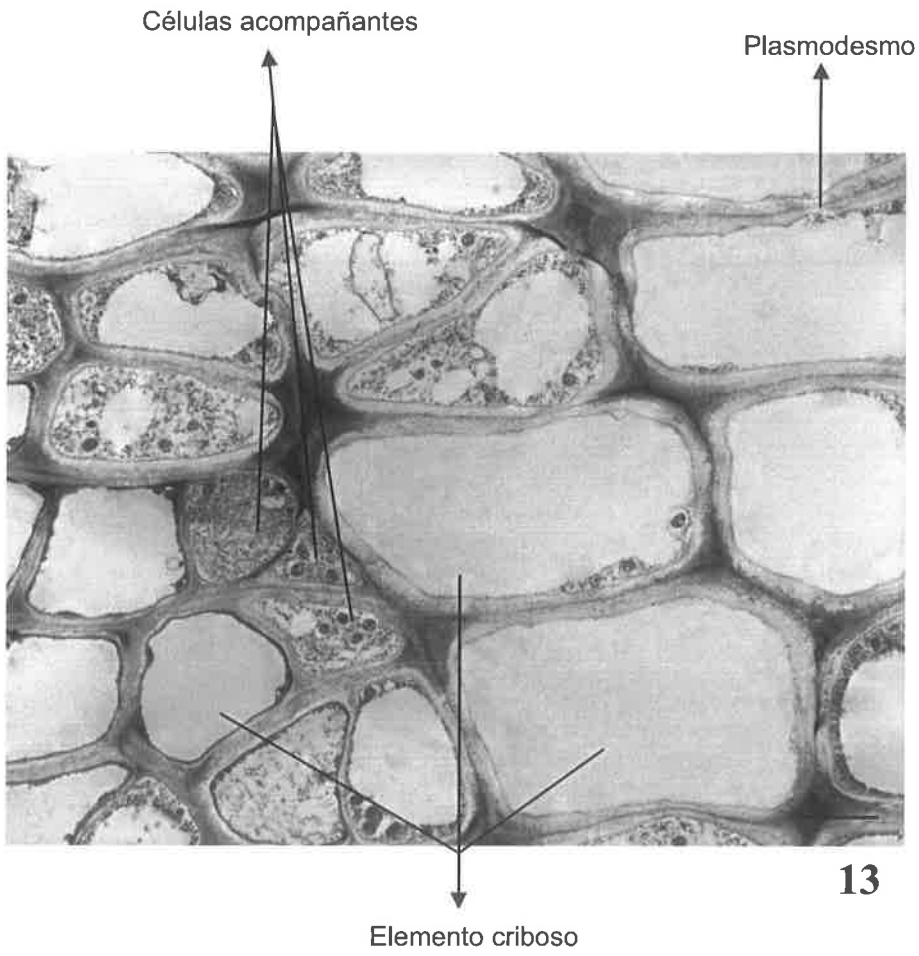


Fig.14. Raíz. Floema. Detalle de la anterior. La barra equivale a 2 micrómetros.

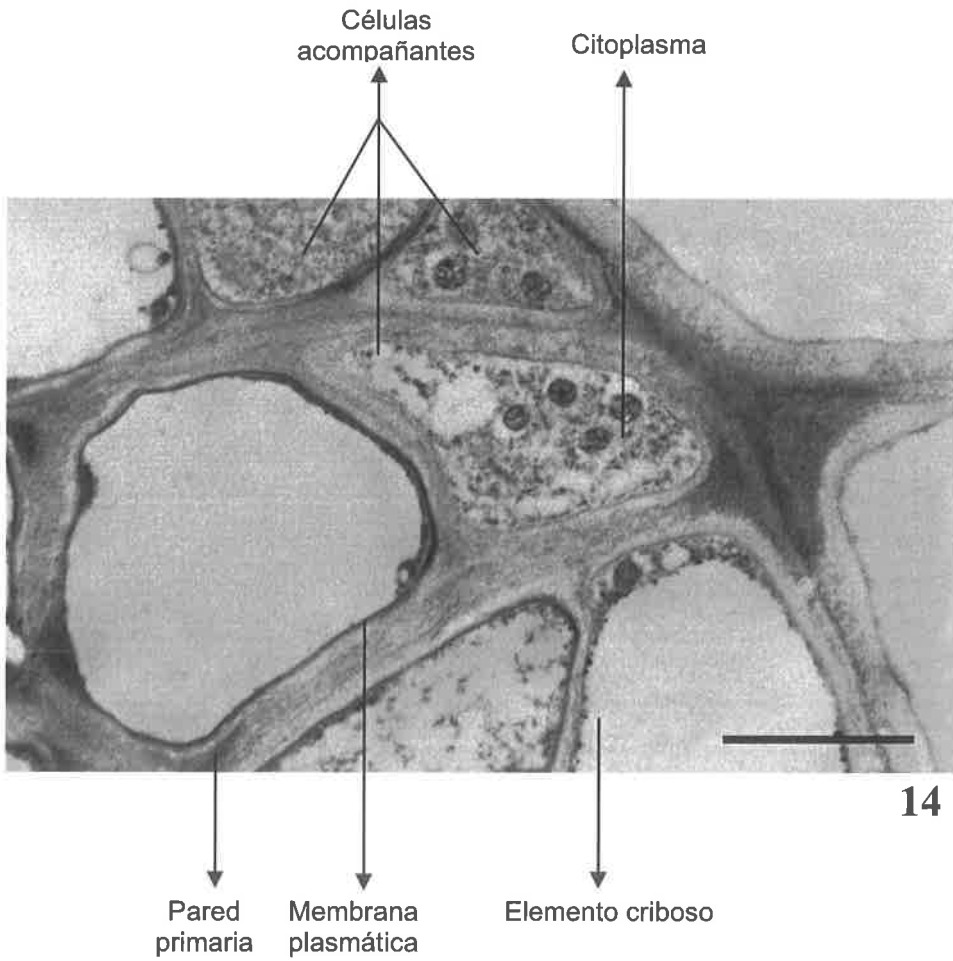
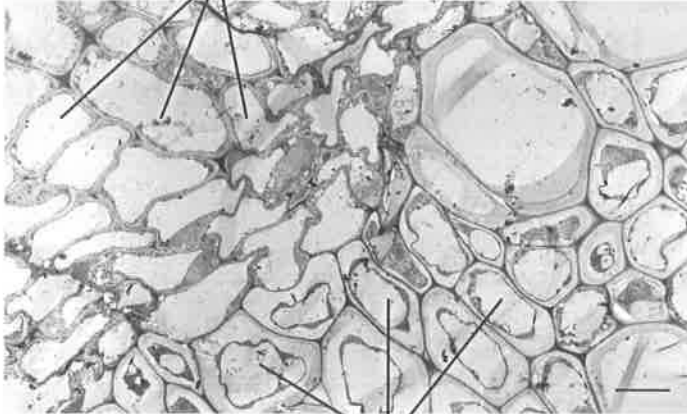


Fig. 15. Raíz. Sistema vascular. La barra equivale a 7 micrómetros.

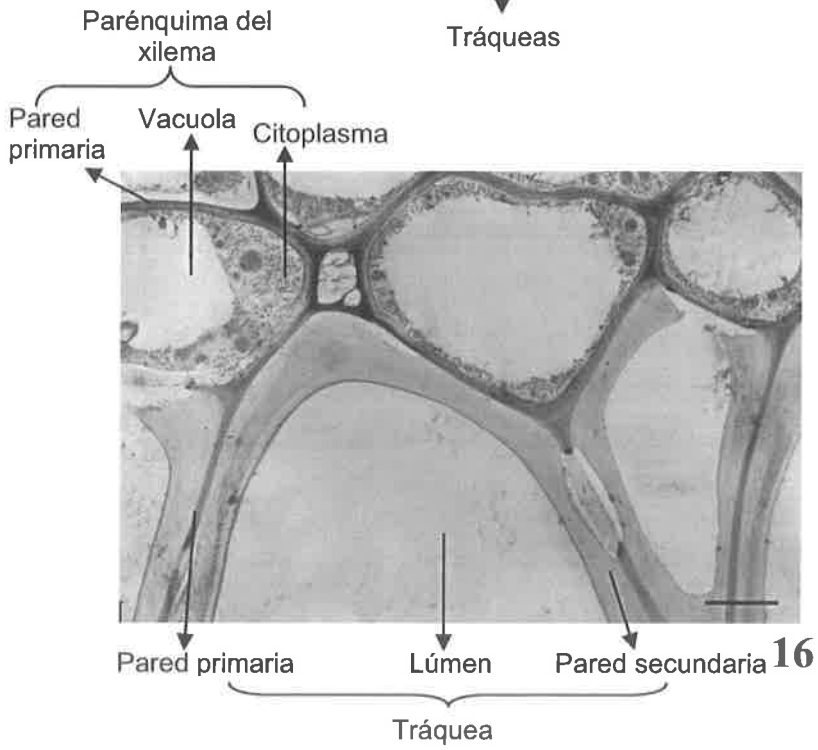
Fig. 16. Raíz. Xilema. La barra equivale a 2 micrómetros.

El xilema consta de elementos conductores (con paredes secundarias) y células parenquimáticas acompañantes.

Células parenquimáticas



15



16

COMENTARIO

El crecimiento primario de la raíz y su desarrollo han sido ampliamente estudiados mediante la observación de diversos fenotipos mutantes y el estudio de los genes responsables del desarrollo de dicho órgano^{42,43}. En el presente trabajo se ha abordado el estudio de la raíz de *Arabidopsis thaliana* en su fase de crecimiento secundario, observándose que la disposición de los haces vasculares son colaterales y no radiales (como es característico del crecimiento primario), y presenta peridermis con células suberificadas^{44,45}, presentando en conjunto la organización histológica típica de dicotiledóneas⁴⁶.

La raíz de *Arabidopsis thaliana* en cuanto a su desarrollo es de enorme simplicidad, ya que un número reducido de células indiferenciadas en el meristemo radicular generan todos los tipos celulares a través de divisiones estereotipadas seguidas de procesos regulados de diferenciación y expansión celular. La simetría de la raíz es radial, lo que combinado con la falta de movimiento celular determina que células clonalmente relacionadas permanezcan formando filas de células. Estas filas de células permiten retroceder hacia sus orígenes, mostrando que son cuatro las células iniciales presentes en el meristemo embrionario de la raíz⁴⁷.

TALLO

Fig. 17. Tallo. Sección transversal. 10x.

En sección transversal se diferencian de fuera hacia dentro:

- Epidermis.
- Córtez.
- Sistema vascular.
- Médula

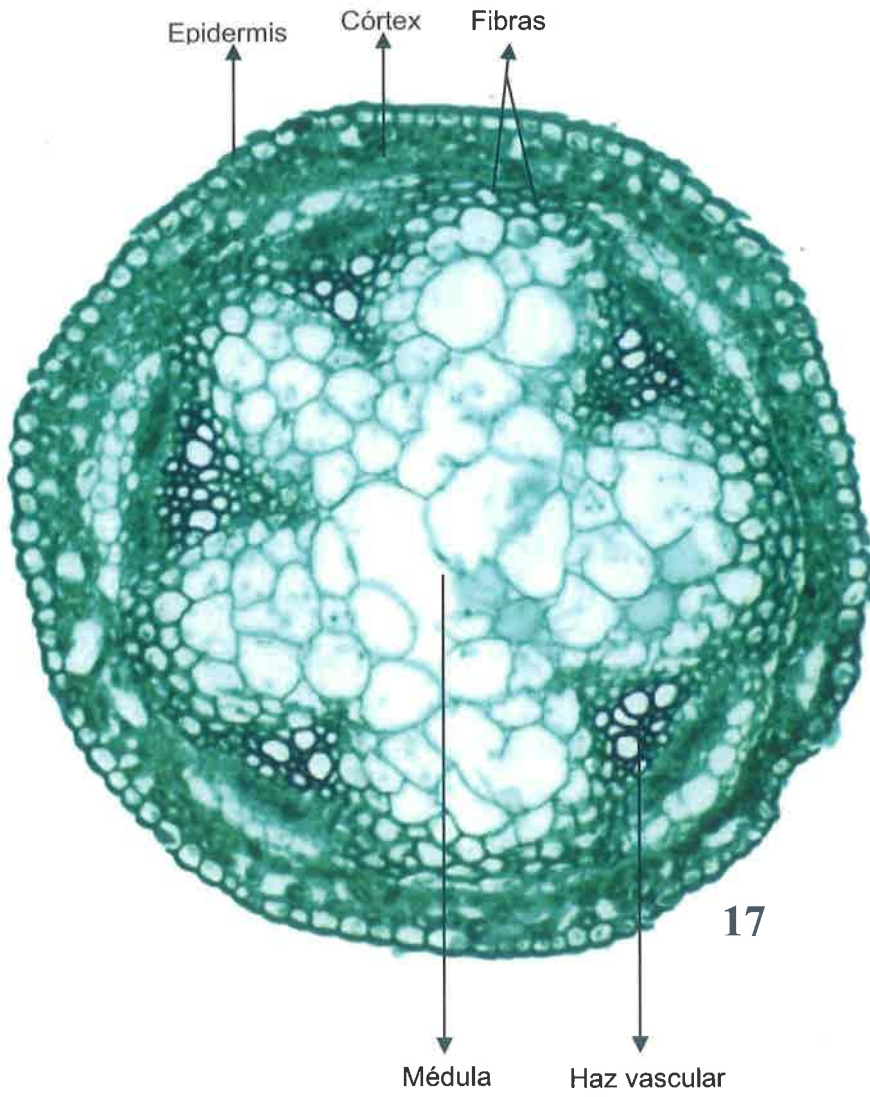


Fig. 20. Tallo. Sección parasagital de epidermis. 40x.

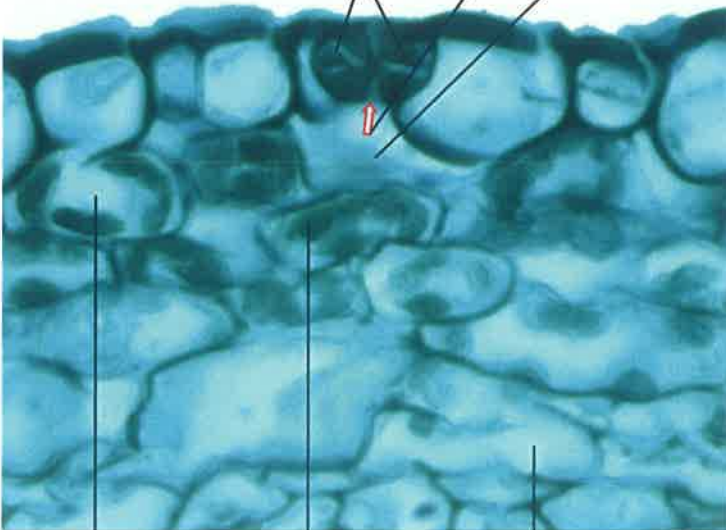
Fig. 21. Tallo. Sección transversal. 100x.

La epidermis es uniseriada y los estomas son anomocíticos (las células anexas se presentan en número indeterminado y no difieren de las restantes células epidérmicas).



20

Células oclusivas Ostiolo Cámara subestomática } Estoma



Parénquima clorofílico lagunar

Cloroplasto

Parénquima de reserva

21

Fig. 22. Tallo. Estoma. La barra equivale a 5 micrómetros.

Fig. 23. Tallo. Epidermis y córtex. La barra equivale a 5 micrómetros.

Las células oclusivas de los estomas presentan paredes primarias muy engrosadas.

Las células del parénquima clorofílico (con abundantes cloroplastos) dispuestas subepidérmicamente muestran notables espacios intercelulares.

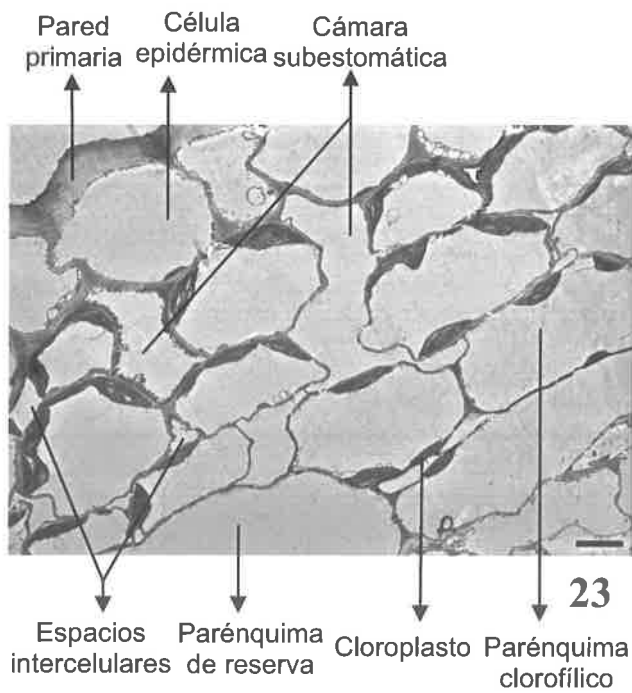
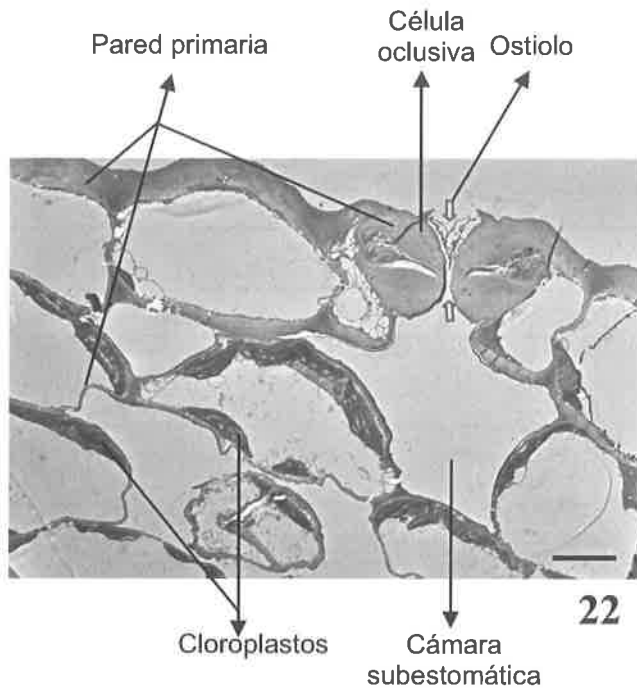
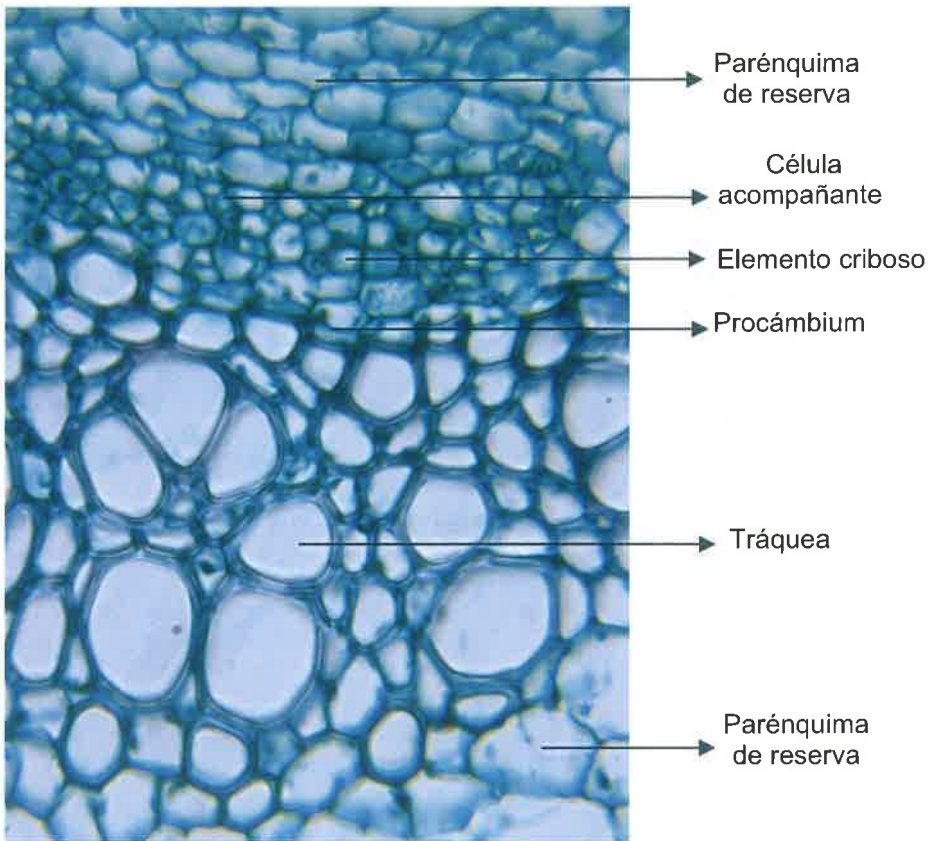


Fig. 24. Tallo. Sistema vascular. 100x.



24

Fig. 25. Tallo. Sistema vascular. La barra equivale a 5 micrómetros.

En los haces vasculares se observa entre el floema y el xilema, algunas células parenquimáticas con paredes primarias delgadas y grandes vacuolas, correspondiendo a células del procámbium que ya no tienen funciones meristemáticas.

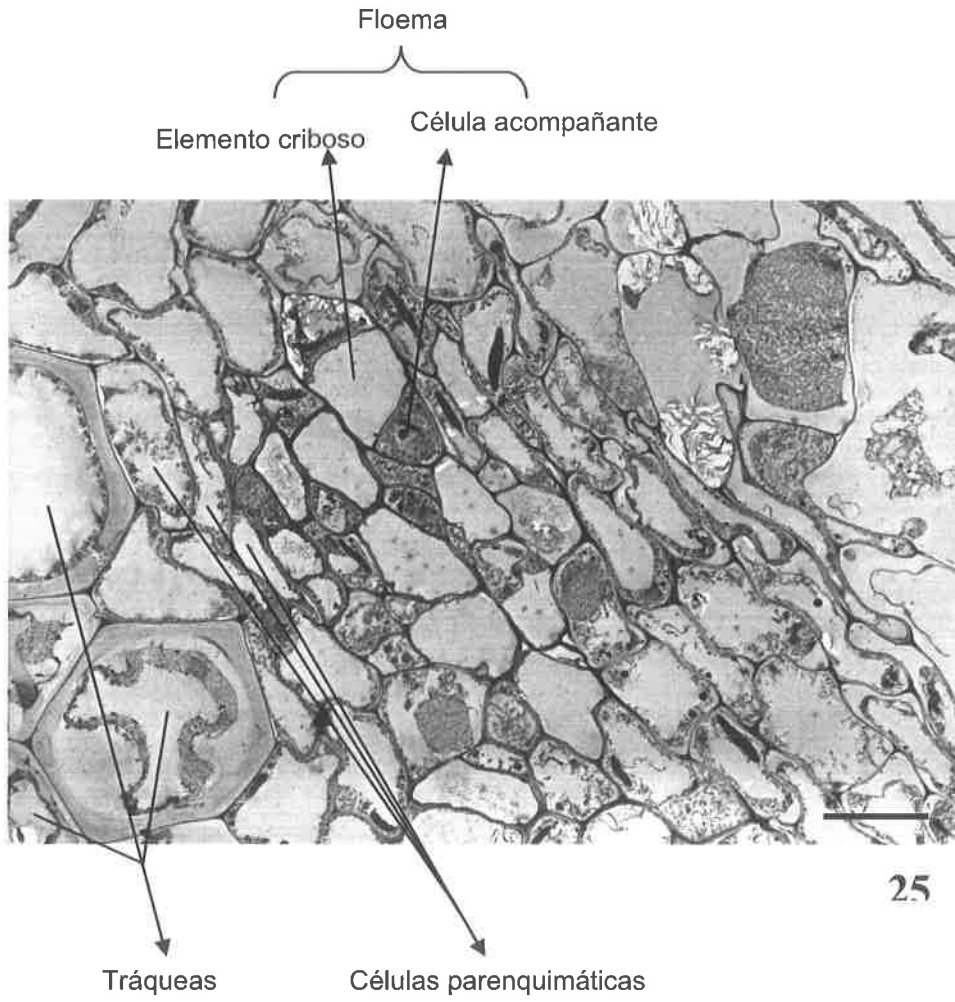


Fig. 26. Tallo. Floema. La barra equivale a 1 micrómetro.

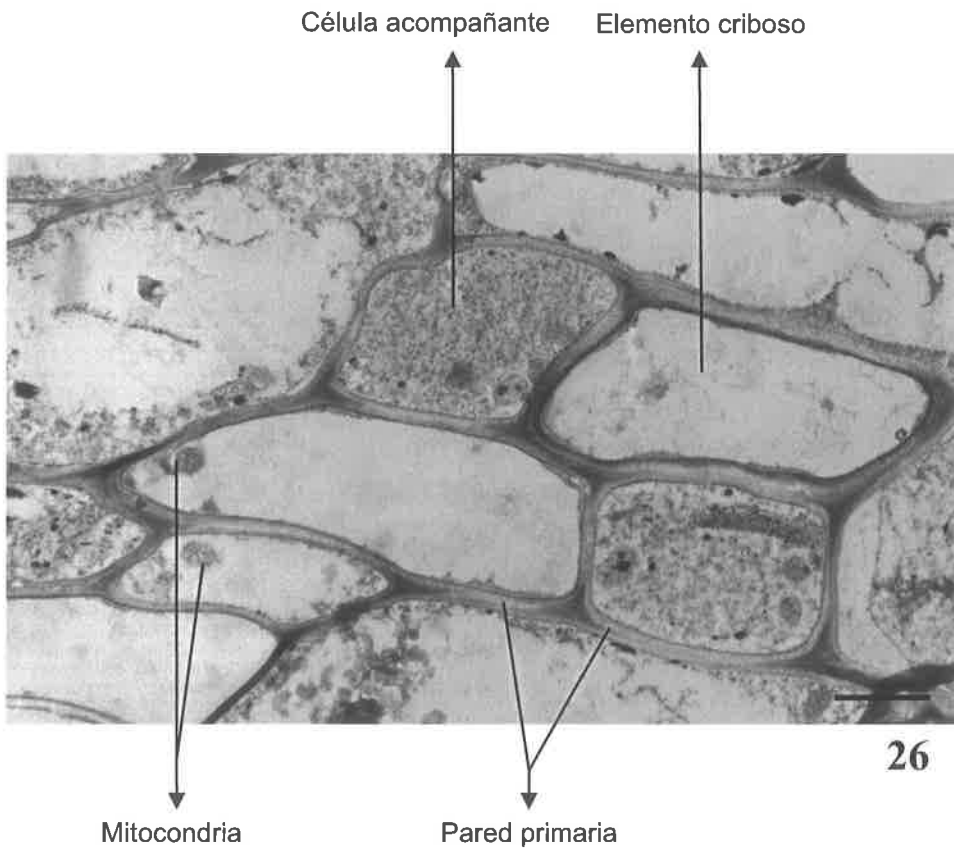
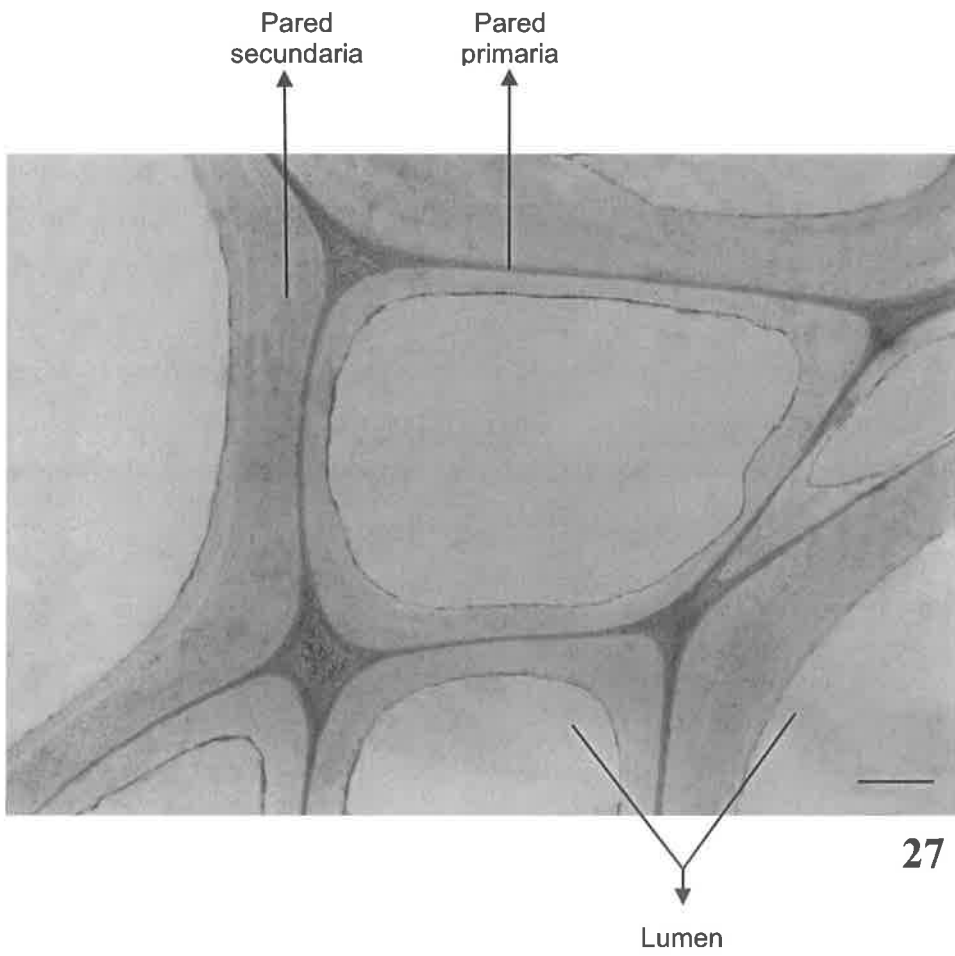


Fig. 27. Tallo. Xilema. La barra equivale a 1 micrómetro.



COMENTARIO

El tallo está rodeado de una epidermis uniseriada que presenta estomas. En el córtex presenta parénquima clorofílico lagunar, y en las zonas en contacto con los haces vasculares, parénquima de reserva. Los haces vasculares se muestran como haces colaterales cerrados. En el centro presenta una médula formada por parénquima de reserva. En los espacios interfasciculares (y también por encima del floema en los haces vasculares), se observan fibras que separan el parénquima clorofílico lagunar del córtex, del parénquima de reserva característico de la médula. Esta disposición se corresponde con la típica de una planta dicotiledónea⁴⁸.

A pesar del exhaustivo análisis estructural al que se ha visto sometida *Arabidopsis thaliana*, el estudio de este órgano y la obtención de mutantes no han sido tan prolíficos como el de otros órganos^{49,50,51}.

HOJAS

Fig. 28. Hoja basal. Sección transversal. 4x.

Fig. 29. Hoja caulinar. Sección transversal. 4x.

A pesar de presentar diferencias morfológicas, las hojas basales y caulinares son semejantes microscópicamente.

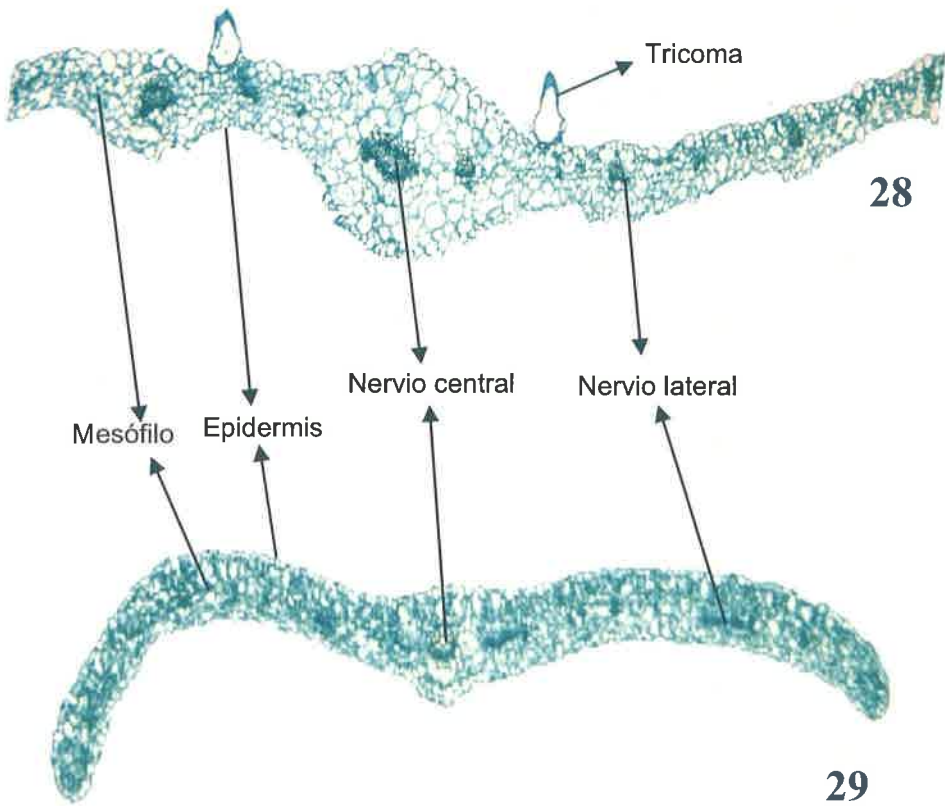


Fig. 30. Hoja basal. Nervio central. 40x.

Fig. 31. Hoja basal. Mesófilo. 40x.

Fig. 32. Hoja caulinar. Nervio central. 40x.

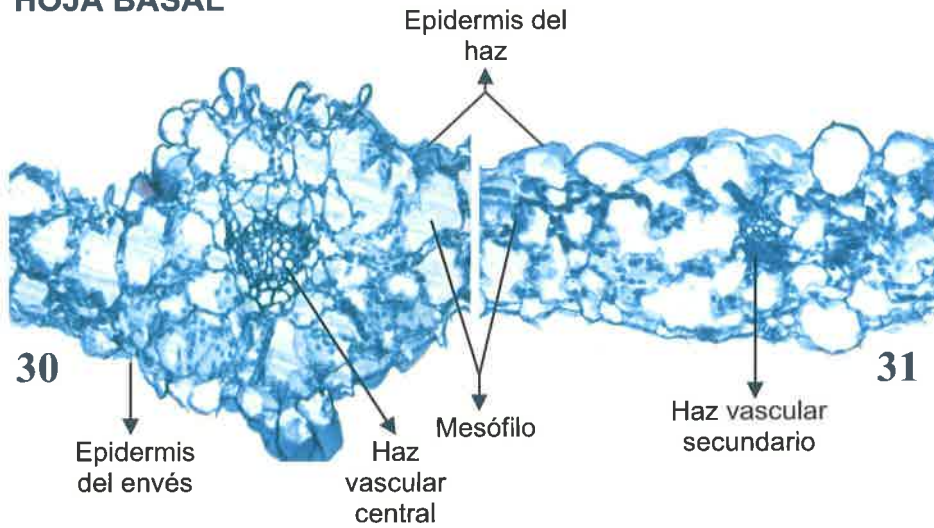
Fig. 33. Hoja caulinar. Mesófilo. 40x.

Las hojas presentan:

- Epidermis superior (adaxial) o del haz.
- Mesófilo.
- Haz vascular central y haces secundarios.
- Epidermis inferior (abaxial) o del envés.

Es de destacar en las hojas basales la presencia de un parénquima aerífero muy desarrollado, que ocupa gran parte del mesófilo.

HOJA BASAL



HOJA CAULINAR

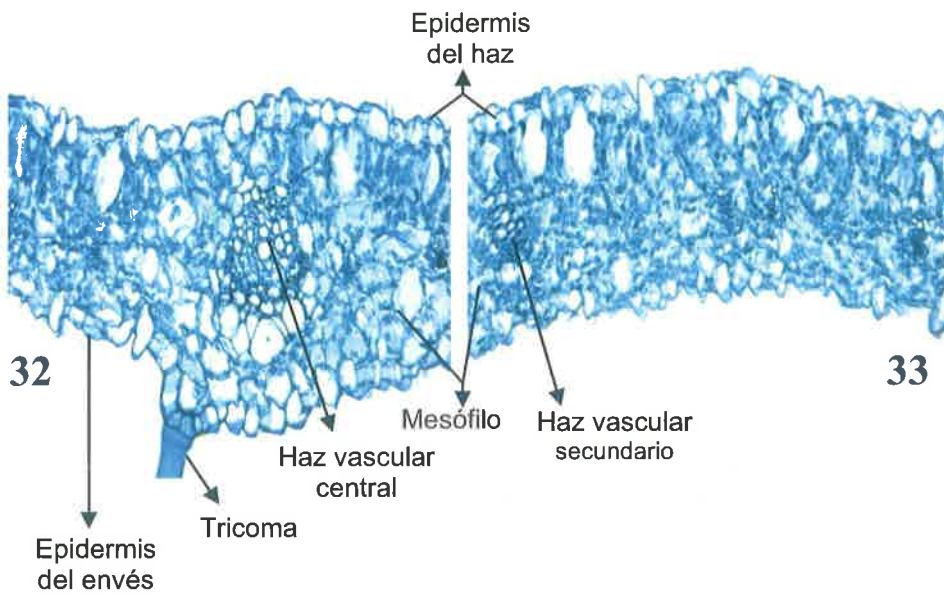


Fig. 34. Hoja basal. Mesófilo. 40x.

Fig. 35. Hoja caulinar. Mesófilo. 40x.

Se observan estomas tanto en la epidermis del haz como del envés.

Es llamativo el tamaño de las cámaras subestomáticas, particularmente en el haz.

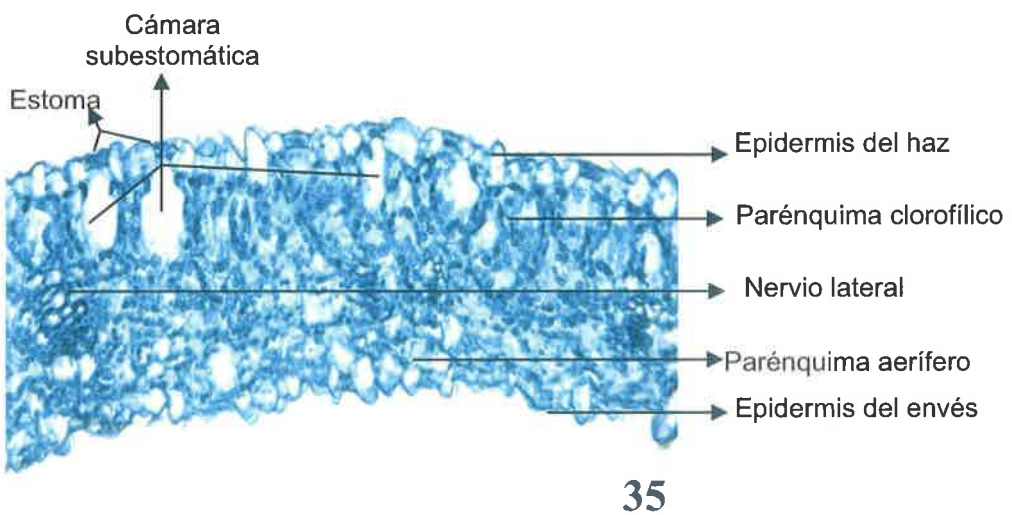
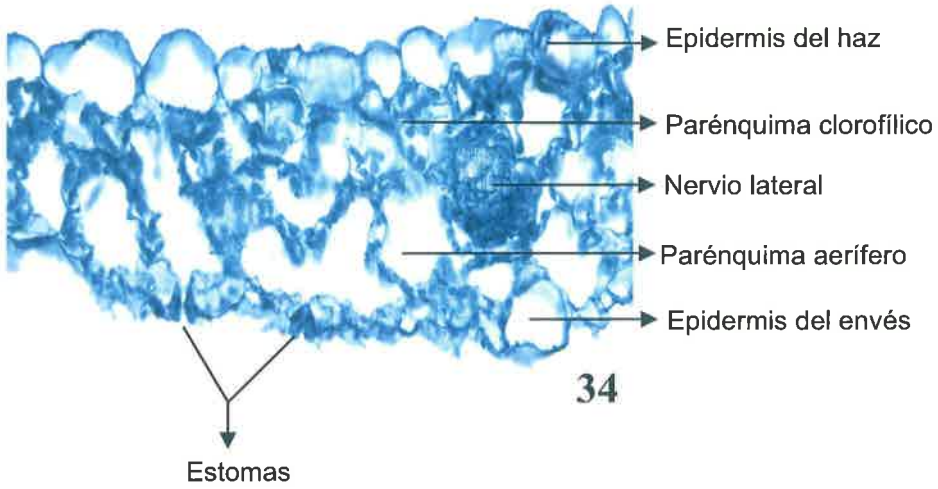


Fig. 36. Hoja. Epidermis. Sección parasagital. 40x.

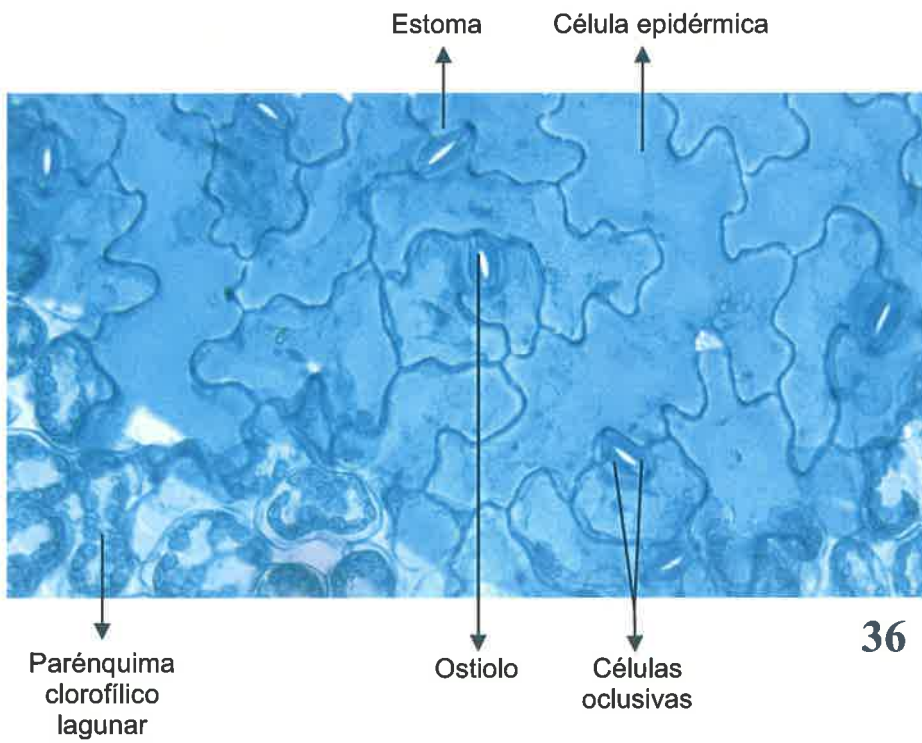


Fig. 37. Hoja. Estoma. La barra equivale a 4 micrómetros.

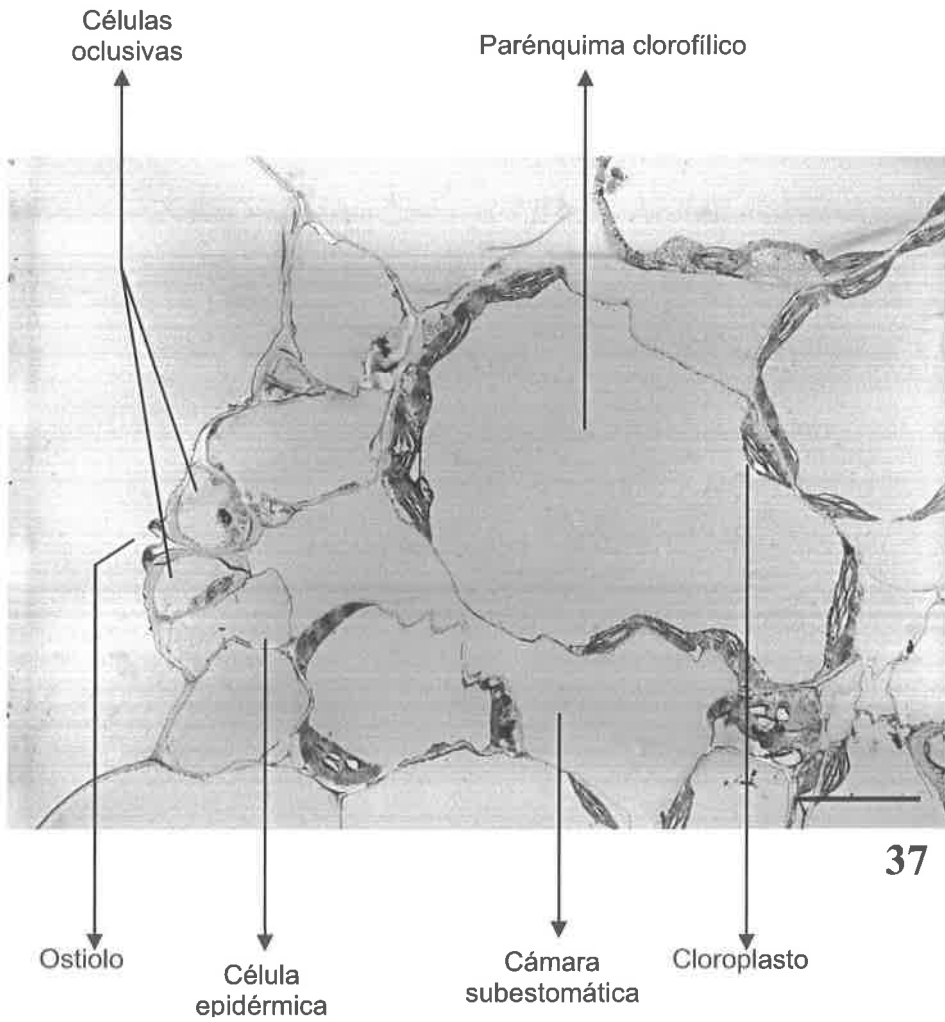


Fig. 38. Hoja basal. Sección parasagital. 20x.

En las secciones parasagitales se observa la disposición de las células con cloroplastos: por debajo de la epidermis del haz, las células conforman un parénquima clorofílico lagunar, estando el resto del mesófilo ocupado por un parénquima aerífero.

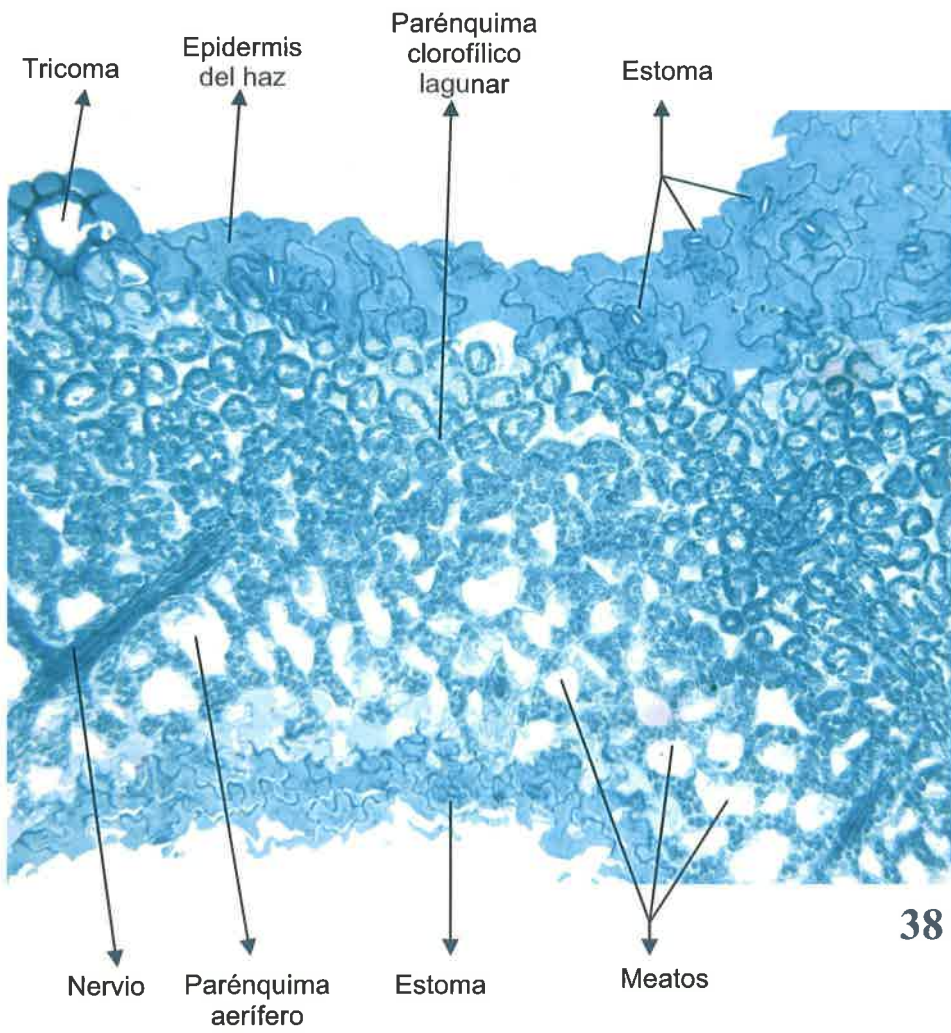


Fig. 39. Hoja. Célula de parénquima clorofílico. La barra equivale a 1 micrómetro.

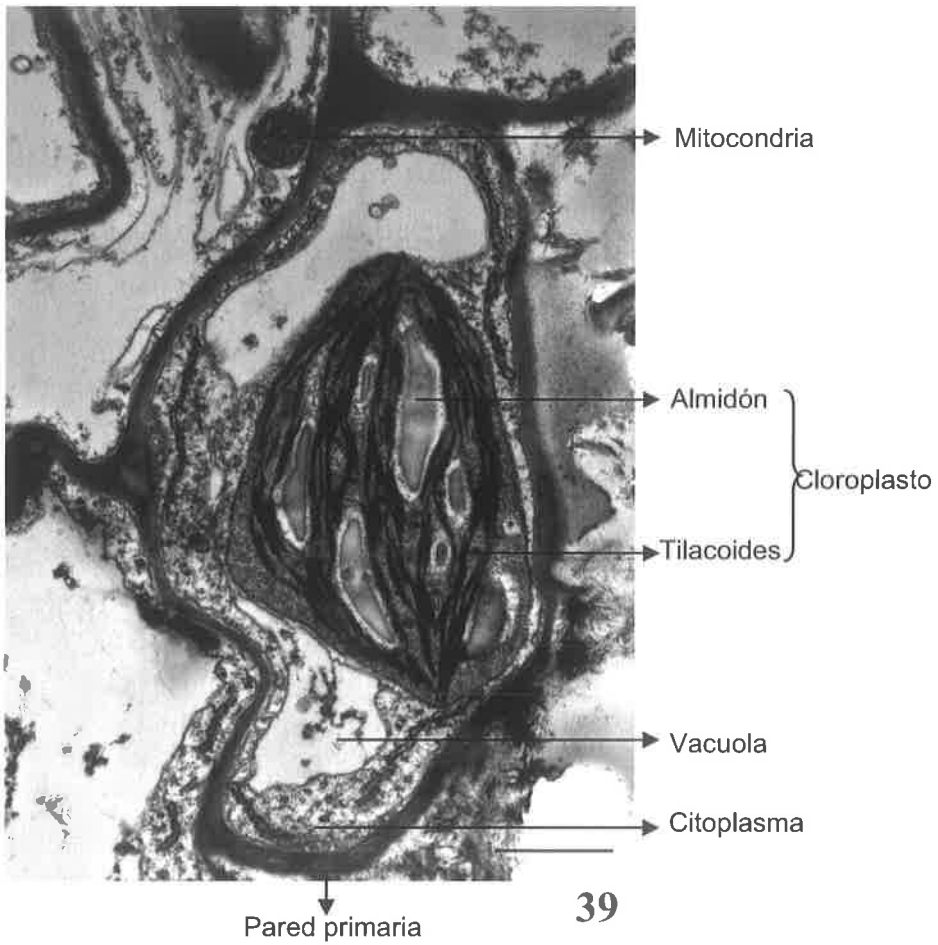
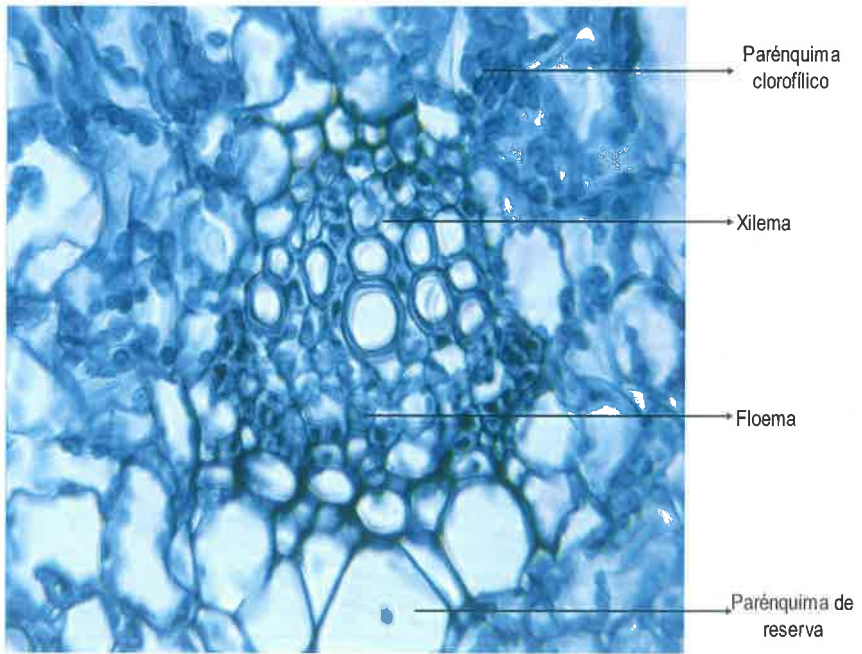
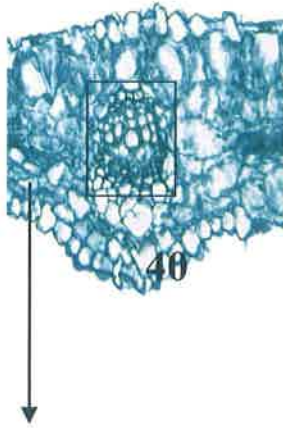


Fig. 40. Hoja caulinar. Sección transversal. 10x.

Fig. 41. Hoja caulinar. Sección transversal. Haz central. 100x.

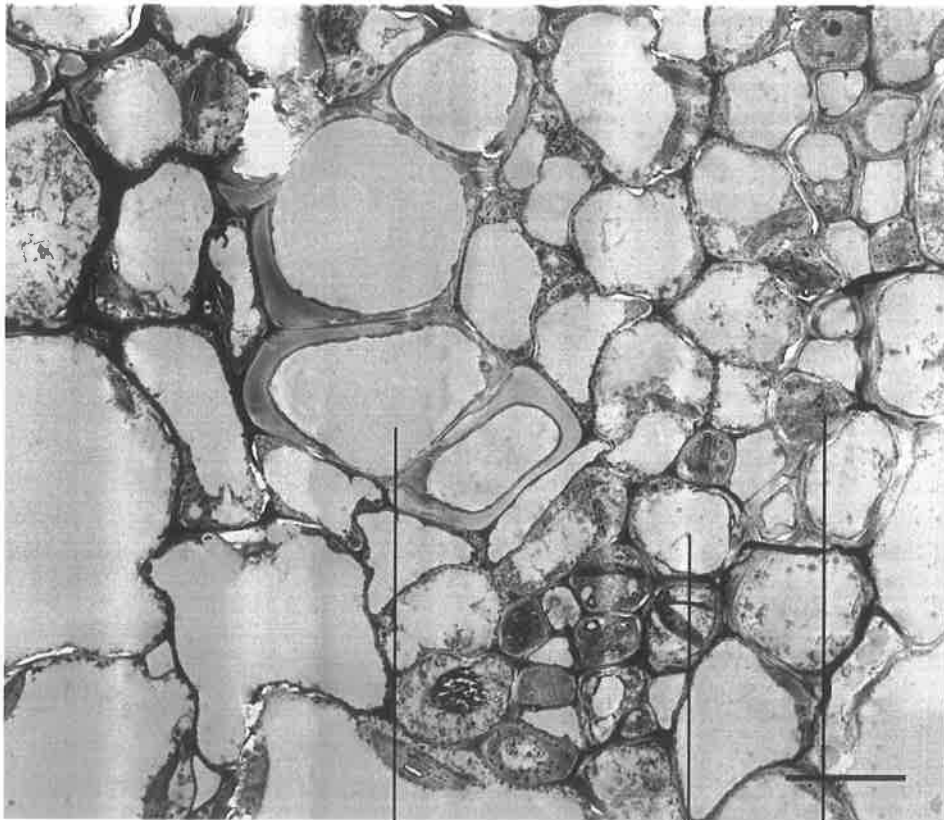
El haz vascular central es un haz colateral cerrado.



41

Arabidopsis thaliana a través del microscopio óptico de campo claro y del MET.

Fig. 42. Hoja. Haz vascular. La barra equivale a 2 micrómetros.



Xilema

Elemento
criboso

Célula
acompañante

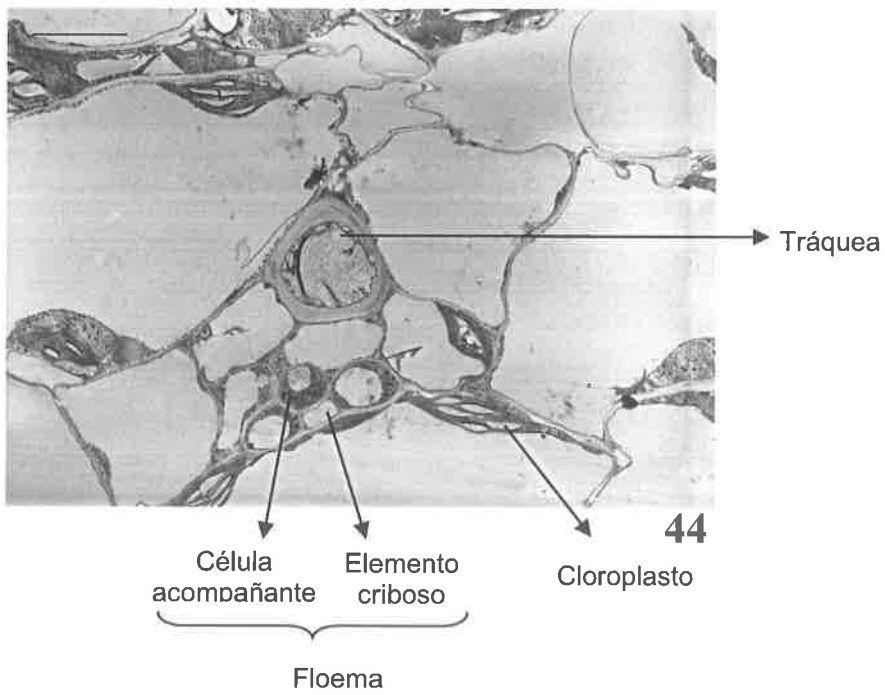
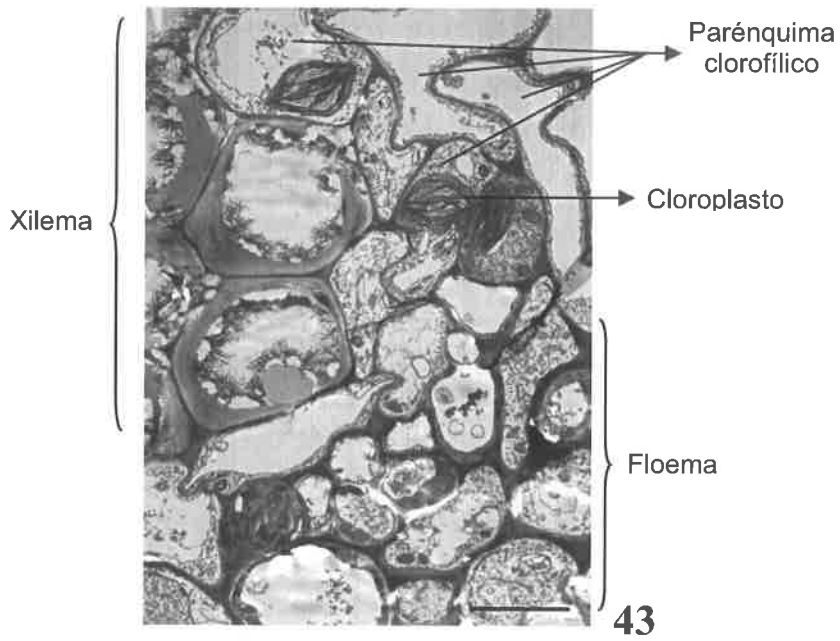
Floema

42

Fig. 43. Hoja. Haz vascular. La barra equivale a 4 micrómetros.

Fig. 44. Hoja. Haz vascular. La barra equivale a 4 micrómetros.

Todos los haces vasculares son esencialmente similares, variando el número de células que forman los tejidos vasculares. En la imagen superior se observa un haz vascular grande, y en la imagen inferior un haz vascular con pocos integrantes.



COMENTARIO

Como se ha observado en este trabajo, las hojas de *Arabidopsis thaliana* presentan las características histológicas típicas correspondientes a las dicotiledóneas⁵², con asimetría adaxial-abaxial y próximo-distal. Las hojas caulinares son esencialmente iguales que las hojas de la roseta. Por debajo de la epidermis y ocupando prácticamente todo el mesófilo (excepto en los haces vasculares) se encuentran las células del parénquima clorofílico.

Presentan estomas tanto en el haz como en el envés, y es muy llamativo el gran tamaño de las cámaras subestomáticas.

Numerosos autores han estudiado este órgano y la utilización de mutantes de hoja ha permitido identificar algunos de los genes que intervienen en su desarrollo^{53,54,55}. Otros autores han observado que los cambios en las formas de las hojas van acompañados de cambios en el patrón vascular, lo que sugiere que existe relación entre los mecanismos que controlan el crecimiento, división, y diferenciación celular, y los mecanismos que controlan la polaridad^{56,57,58,59}.

Los estomas merecen una mención especial, puesto que su localización no está restringida exclusivamente a las hojas, aunque es el órgano en el que se presentan en mayor abundancia. Están en la epidermis madura de todos los órganos, excepto en pétalos y filamentos de los estambres^{8,60}.

Se sabe que la distribución y número de los estomas están determinados genéticamente y que pueden verse alterados por mutación, pues se han descrito mutantes de *Arabidopsis thaliana* que tienen los estomas formando grupos en cotiledones y hojas, mientras que los tallos carecen de ellos⁶¹.

FLOR

Fig. 45. Inflorescencia. 4x.

La inflorescencia presenta estructura en racimo, en la que se observa una gradación en la maduración, de modo que las flores apicales están más desarrolladas que las basales.

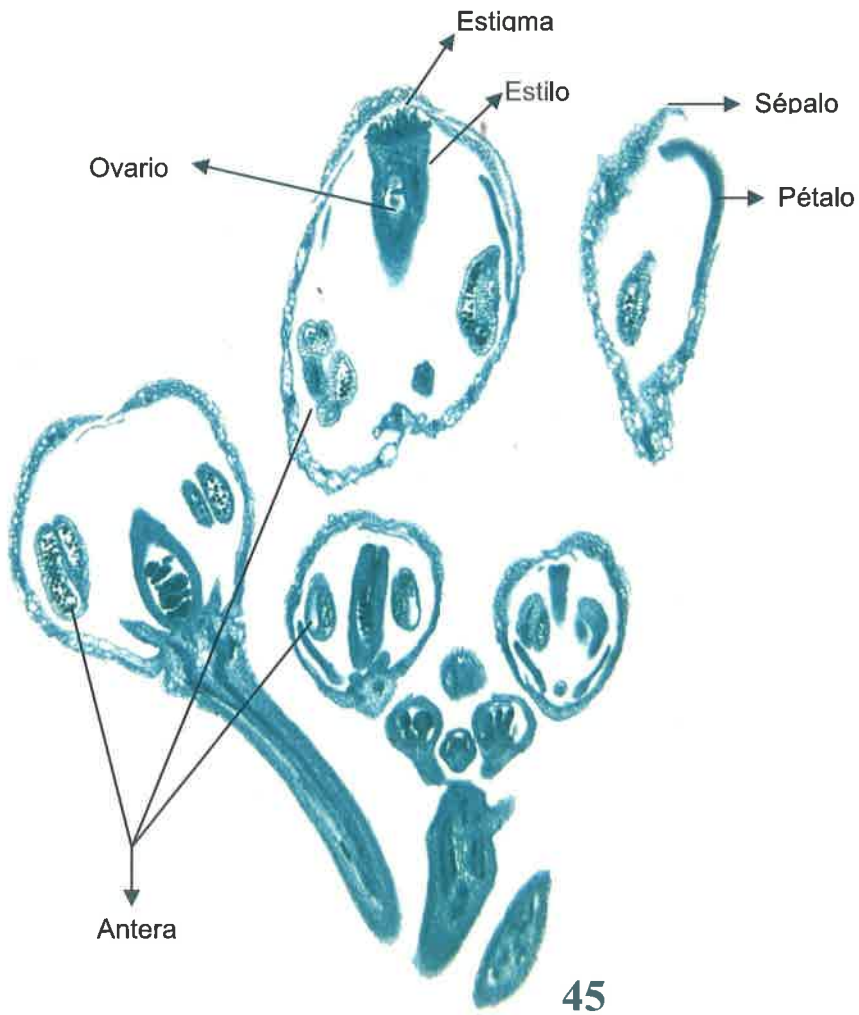


Fig. 46-51. Desarrollo de la flor. 40x.

Es posible encontrar en un racimo de una planta en el estadio fenológico estudiado, diferentes fases de desarrollo de las flores: inicialmente todo el primordio foliar es meristemático, diferenciándose enseguida dos masas de células meristemáticas, unas que darán lugar al androceo y otras que darán lugar el gineceo.

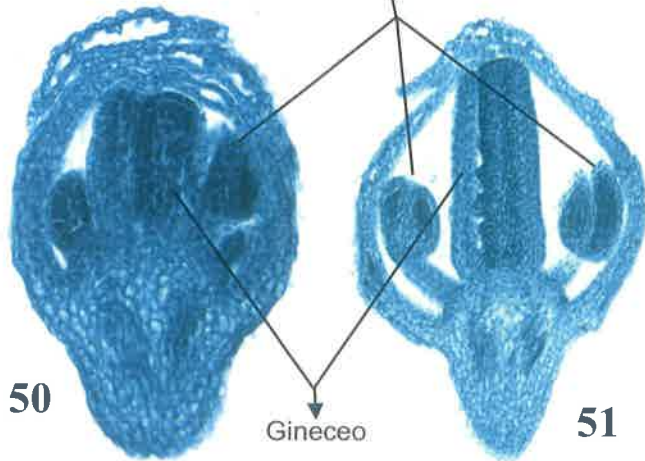
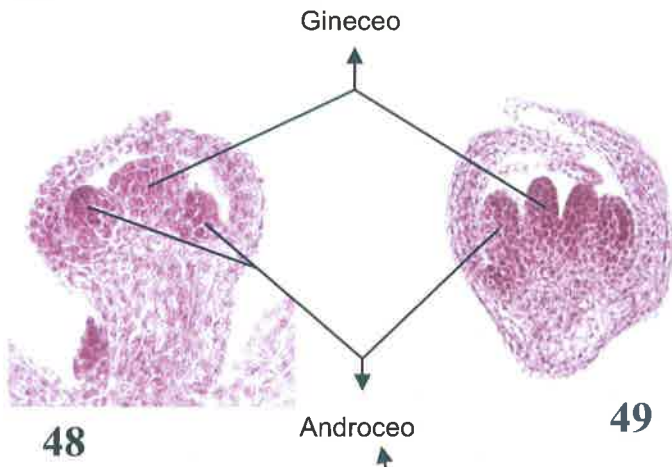
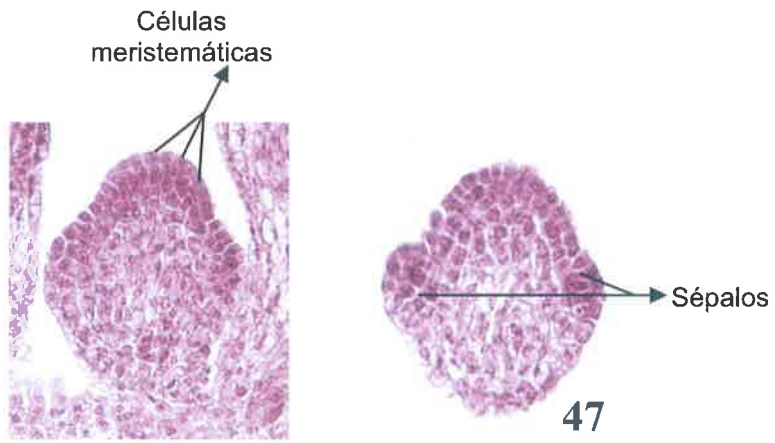


Fig. 52. Flor. Pétalo y sépalo. 40x.

Fig. 53. Flor. Pétalo. 100x.

Fig. 54. Flor. Sépalo. 100x.

Todas las piezas florales proceden de hojas modificadas, lo cual se ve claramente en el caso de los sépalos y los pétalos.

Es muy característico de los pétalos que las células epidérmicas del haz presenten papilas muy desarrolladas.

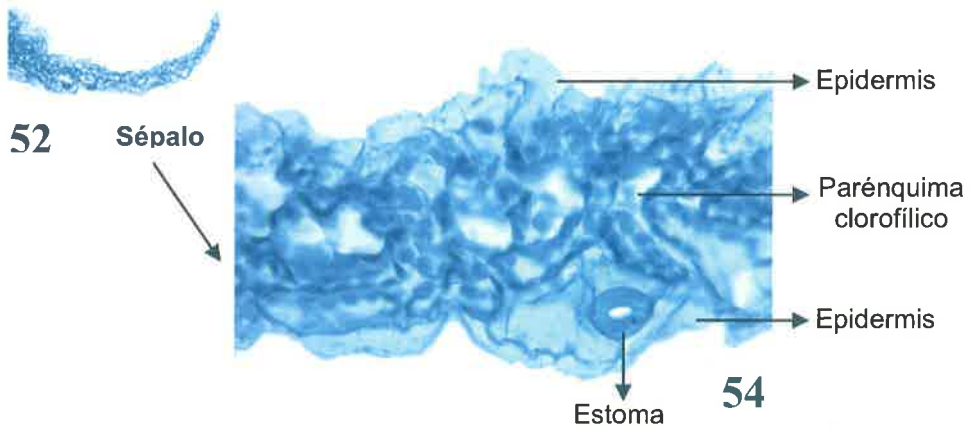
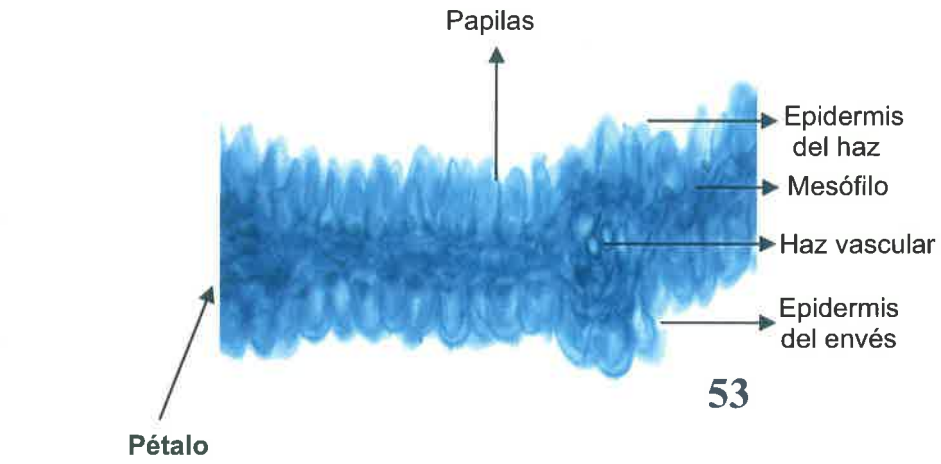


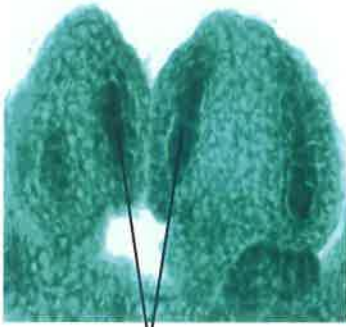
Fig. 55. Antera. 40x.

Fig. 56. Antera. 40x.

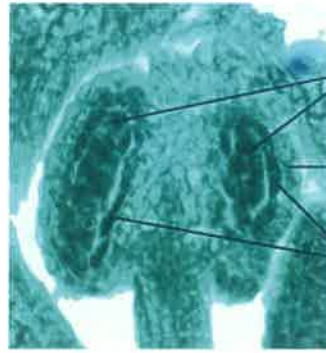
Fig. 57. Antera. 100x.

En el proceso de maduración de las anteras, inicialmente se diferencian unas células basófilas que corresponden a la capa arquesporrial (donde se dispondrán los sacos polínicos); posteriormente estas células se dividen hasta que se diferencian 3 capas: el tapete en posición interior, el endotecio en posición exterior, y la capa media que degenera casi inmediatamente tras su formación.

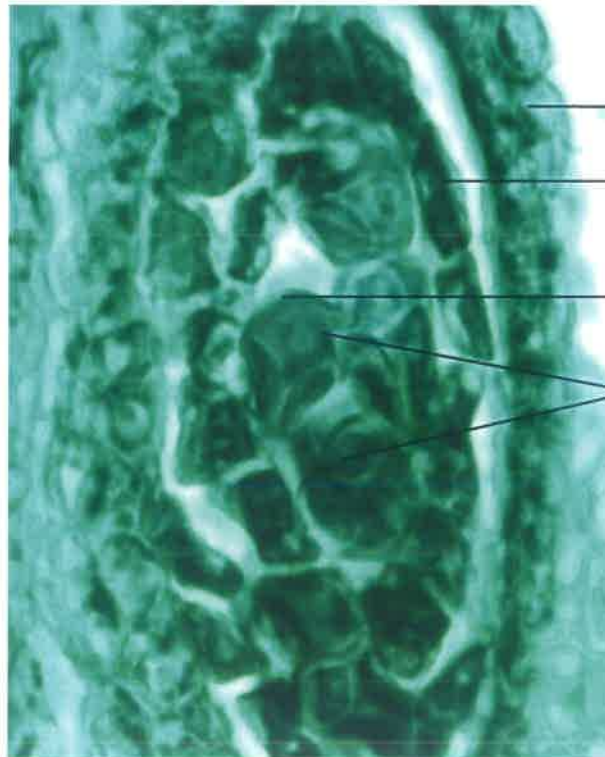
A continuación las células del saco polínico entran en meiosis observándose el resultado de la división: las tétradas de esporas.



55
Capa
arquesporial



56



57

Fig. 58. Antera. 40x.

Fig. 59. Antera. 40x.

Fig. 60. Antera. 40x.

Las cuatro células de las tétradas de esporas se liberan de la calosa que las rodea, observándose entonces granos de polen, manteniéndose íntegro el tapete. Posteriormente desaparece el tabique que separa los sacos polínicos y comienza a diferenciarse el endotecio y los estomios. Finalmente los estomios se observan abiertos y los granos de polen liberándose.



Fig. 61-65. Flor. Desarrollo del estigma. 40x.

En el proceso de maduración de los estigmas se observa cómo las células presentan expansiones (papilas) que se van desarrollando progresivamente. Cuando el estigma ha recibido granos de pólen (y se produce la polinización), las células del estigma pierden turgencia y comienzan a degradarse.

A través del tejido de transmisión el tubo polínico llega al ovario.

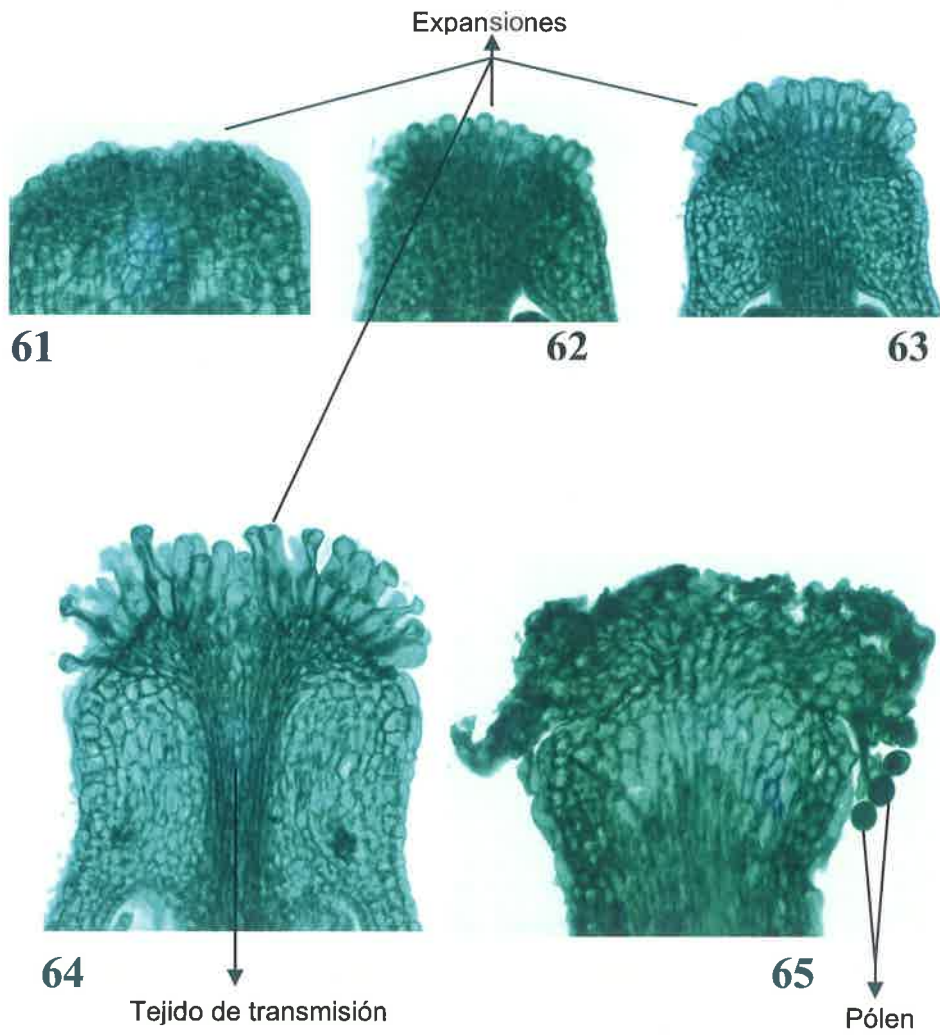


Fig. 66. Flor. Estigma en formación. La barra equivale a 4 micrómetros.

Fig. 67. Flor. Estigma. La barra equivale a 5 micrómetros.

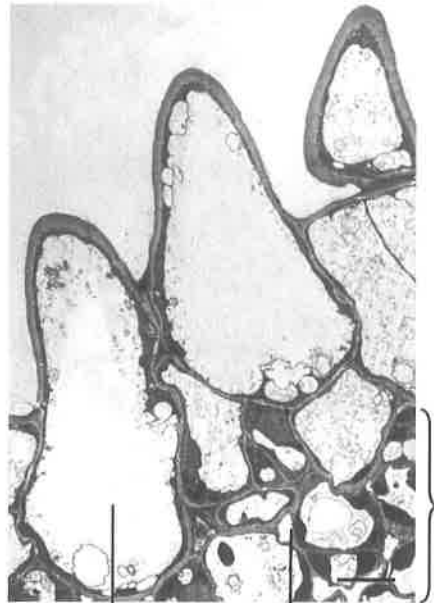
Fig. 68. Flor. Tejido de transmisión. La barra equivale a 2 micrómetros.

Las células que forman el tejido de transmisión presentan paredes primarias engrosadas, y entre ellas se observa una matriz extracelular en la que se depositan sustancias nutrientes, y a través de la cuál crece el tubo polínico hacia el ovario.

Las paredes transversales intercelulares son finas y presentan un gran número de plasmodesmos.



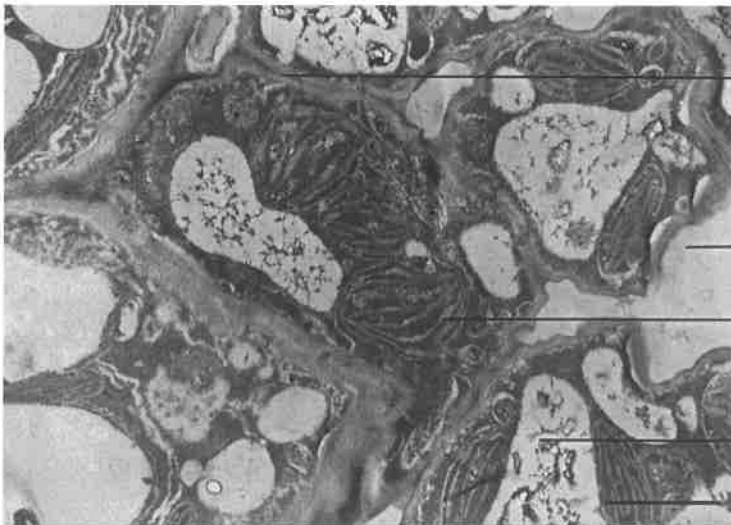
66



Papila

Tejido de transmisión

67



Plasmodesmo

Matriz extracelular

Plasto

Vacuola

68

Fig. 69. Flor. Óvulo. 40x.

Fig. 70. Flor. Óvulo. 40x.

Fig. 71. Flor. Óvulo. 40x.

Fig. 72. Flor. Óvulo. 100x.

En el proceso de maduración de los óvulos inicialmente se observa una masa meristemática indefinida, que da paso a otros estadios en los que ya se identifican los grupos celulares que darán lugar a los óvulos.

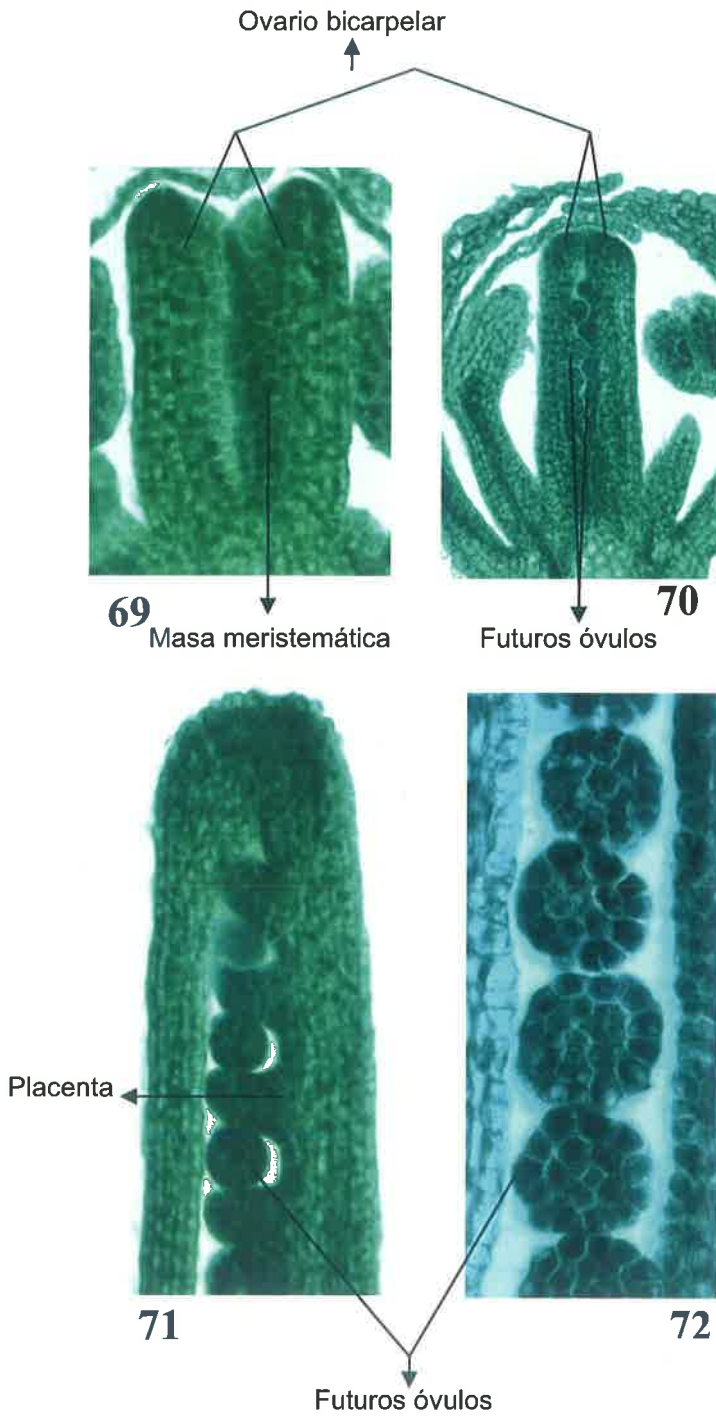


Fig. 73. Flor. Óvulo. 100x.

Fig. 74. Flor. Óvulo. 40x.

Fig. 75. Flor. Óvulo. 100x.

En un estadio posterior, se reconocen los dos tegumentos y el megasporocito. La elongación de los tegumentos constituirá el micropilo.

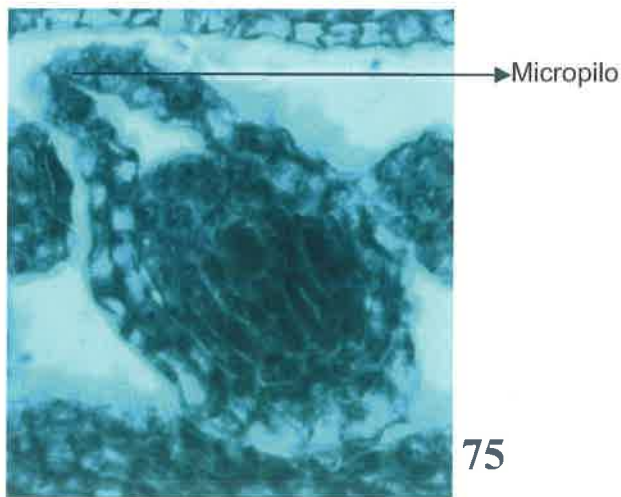
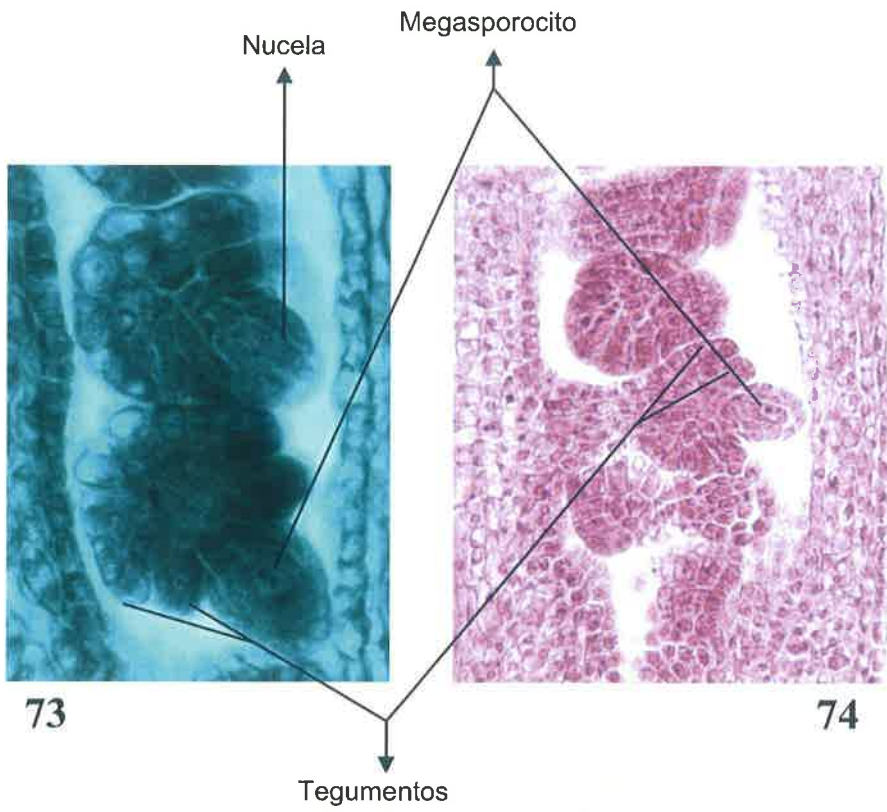


Fig. 76. Flor. Óvulo. 40x.

Fig. 77. Flor. Óvulo. 100x.

Fig. 78. Flor. Óvulo. 40x.

Fig. 79. Flor. Óvulo. 40x.

Posteriormente se reconoce el saco embrionario, observándose finalmente óvulos fecundados.

El falso septo separa los dos lóculos del ovario, conectando las dos placentas.

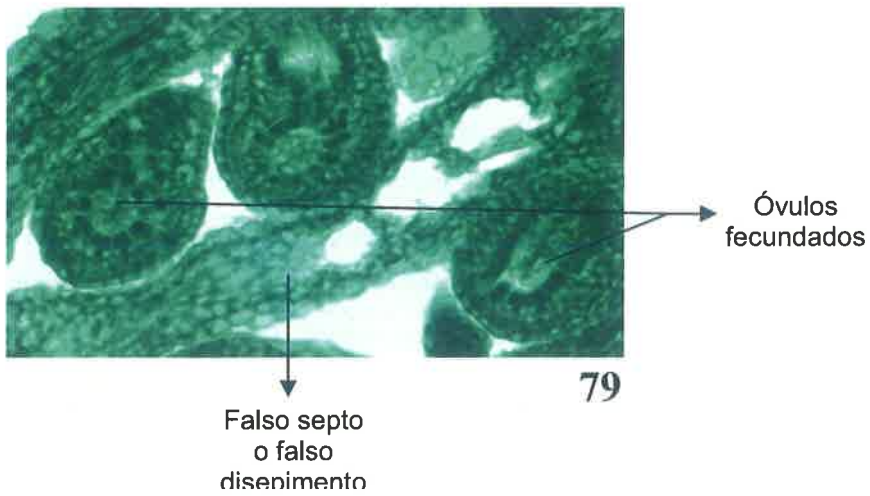
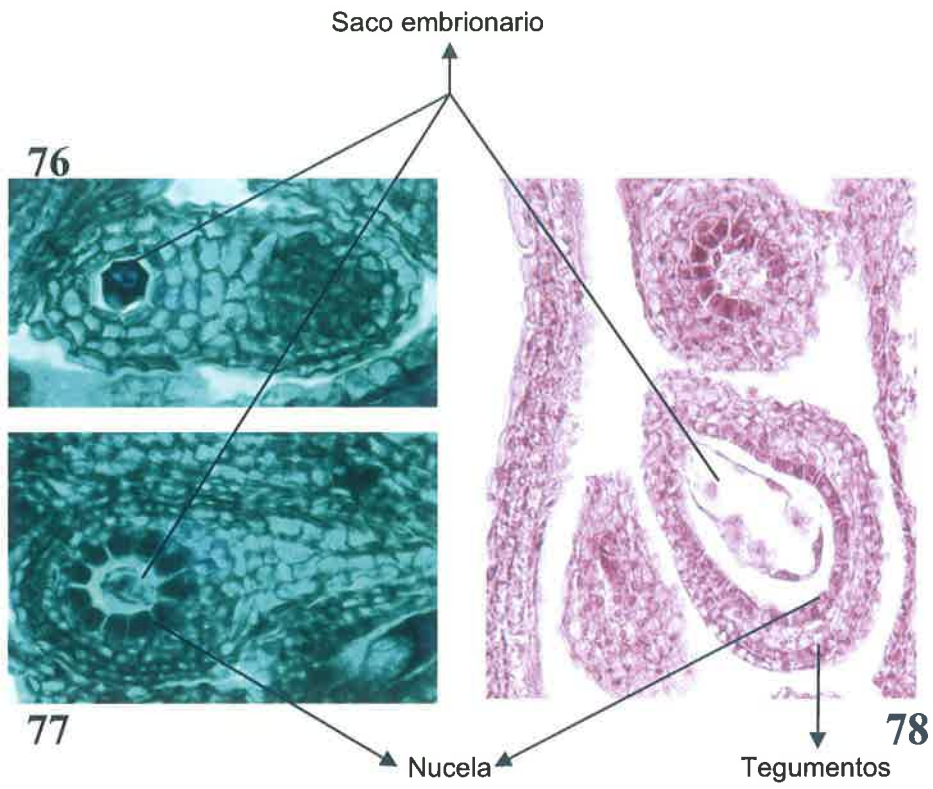
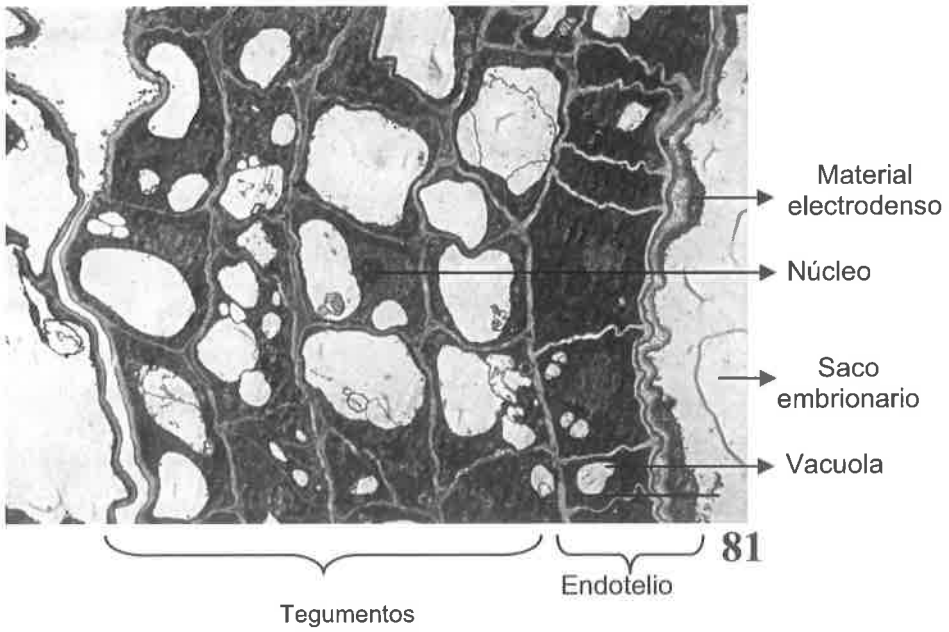
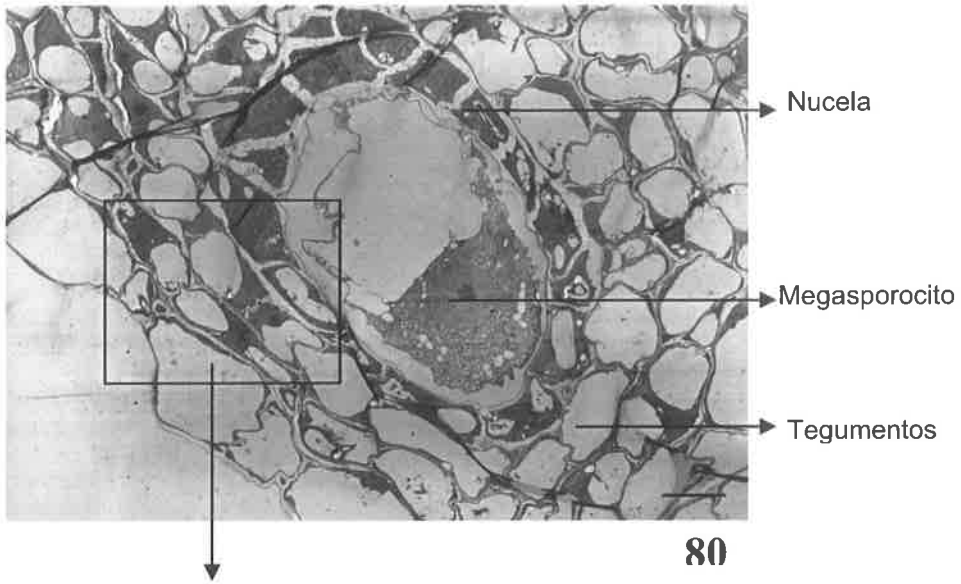


Fig. 80. Flor. Óvulo. La barra equivale a 5 micrómetros.

Fig. 81. Flor. Detalle de la pared del óvulo. La barra equivale a 5 micrómetros

Durante el desarrollo del saco embrionario, la nucela desaparece, de modo que el saco embrionario está rodeado sólo por los tegumentos, es lo que se denomina óvulo tenuinucelado.

La epidermis interna del tegumento interno desarrolla una estructura específica: el endotelio, que rodea al saco embrionario en disposición radial. Durante el desarrollo, se deposita material electrodenso y resistente a la acetólisis en las paredes en contacto con el saco embrionario.



COMENTARIO

Las flores de las angiospermas presentan 5 tipos de órganos: los sépalos, pétalos, estambres y carpelos que se desarrollan en capas concéntricas a partir del meristemo floral, y los óvulos que se desarrollan en el interior de los carpelos a partir de regiones meristemáticas específicas: las placentas⁸. Tras la fecundación, los óvulos formarán el fruto.

Son numerosos los estudios que se han realizado relacionados con las estructuras reproductoras de *Arabidopsis thaliana* ya que la obtención de mutantes de interés agronómico es uno de las prioridades en el estudio de esta planta^{32,34,62,63,64}. Debido a esta importancia agronómica de la producción de frutos, los genes implicados en el desarrollo de la flor han sido ampliamente estudiados, habiéndose caracterizado parte de los genes que regulan el desarrollo de estos órganos^{65,66,67,68}.

Las características de la flor de *Arabidopsis thaliana* son obviamente las correspondientes a los taxones a los que pertenece⁶⁹, siendo característico de la familia *Brassicaceae* un periantio formado por 4 sépalos y 4 pétalos, el androceo formado por 6 estambres tetradínamos, y el gineceo bicarpelar, estando el ovario dividido por una partición delgada no vascularizada que conecta las dos placentas (falso septo o falso disepimento)⁴¹. En *Arabidopsis thaliana* el meristemo floral difiere del meristemo apical, de modo que los órganos que proceden del meristemo floral (sépalos, pétalos, estambres y carpelos) se disponen en capas en vez de en espiral⁷⁰.

FRUTO

Fig. 82. Fruto. Sección transversal. 20x.

Fig. 83. Fruto. Sección longitudinal. 20x.

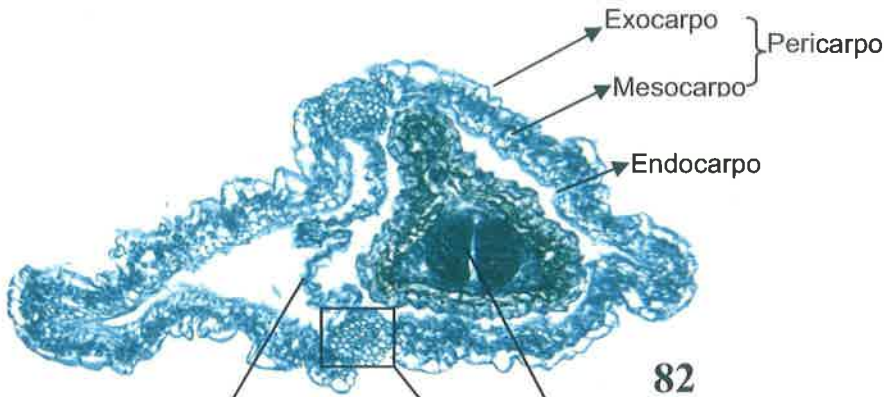
Se trata de un fruto tipo silícula, es un fruto sincárpico procedente de un ovario con dos carpelos.

La pared del fruto consta de:

- Pericarpo, que a su vez está formado por:
 - Exocarpo.
 - Mesocarpo.
- Endocarpo.

En el interior y en cada uno de los lóbulos, el fruto alberga la semilla.

Entre los márgenes de los carpelos existe una sutura llamada replo, formada por una masa de células redondeadas. De dicha estructura se extienden hacia el interior dos membranas que se sueldan formando el falso septo o falso disepimento que divide al fruto en dos lóbulos.

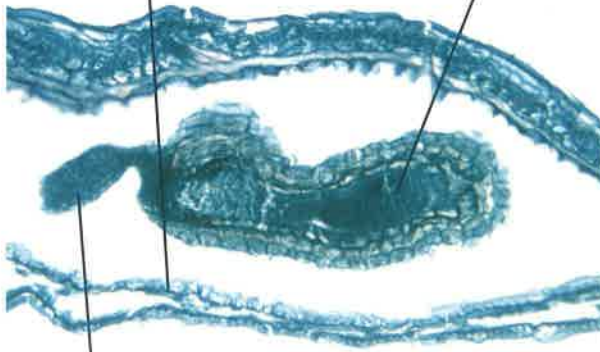


82

Falso
disepimento

Replo

Embrión



Funículo

83

Fig. 84. Fruto. Detalle de la pared. 40x.

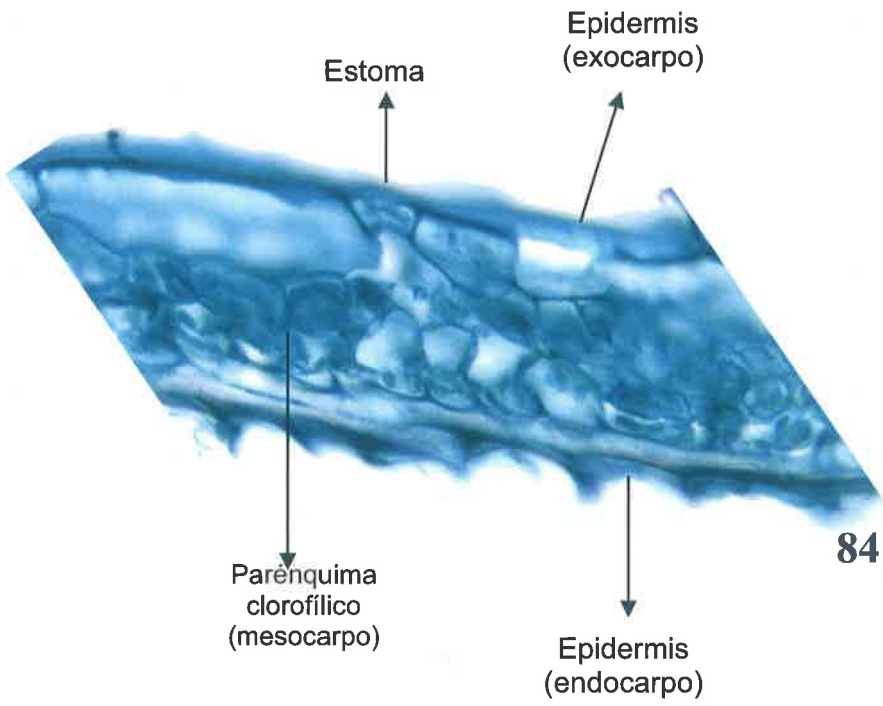


Fig. 85. Fruto. Exocarpo. La barra equivale a 4 micrómetros.

Fig. 86. Fruto. Estoma. La barra equivale a 1 micrómetro.

Fig. 87. Fruto. Mesocarpo. La barra equivale a 4 micrómetros.

Fig. 88. Fruto. Endocarpo. La barra equivale a 4 micrómetros.

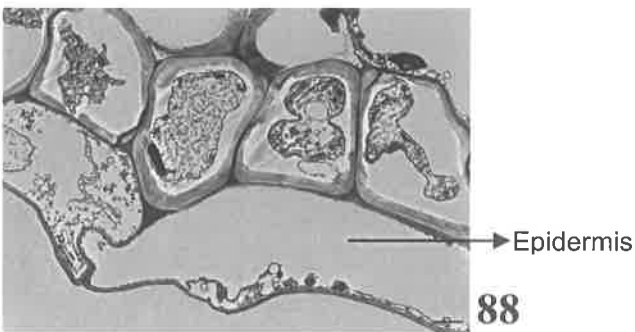
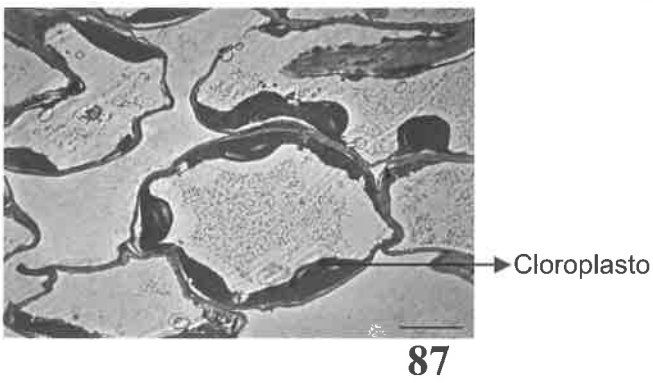
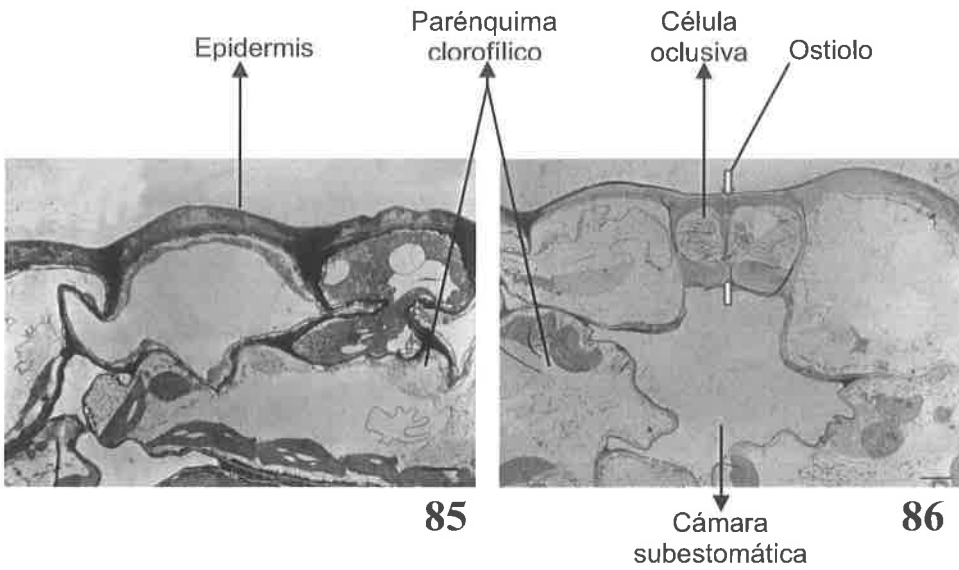
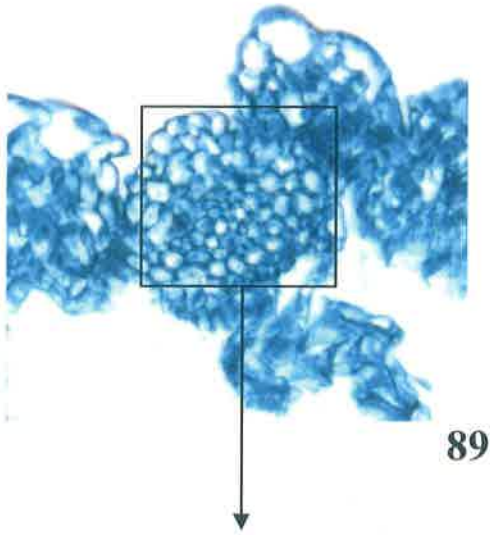
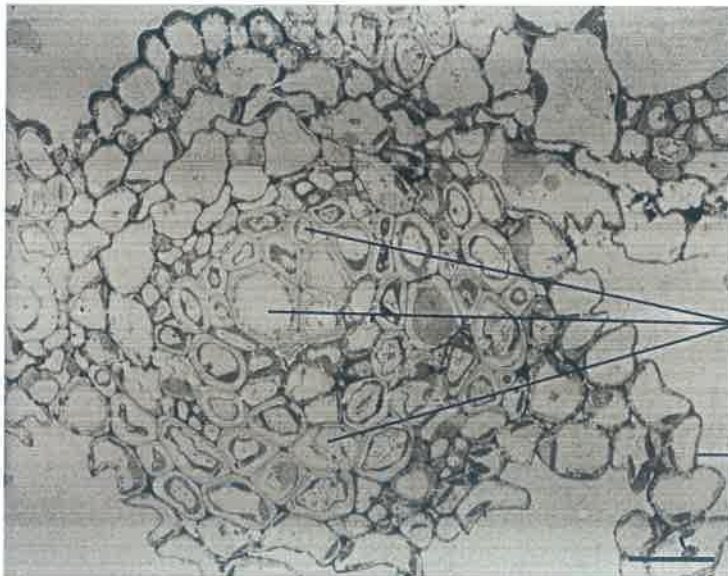


Fig. 89. Fruto. Repló. 40x.

Fig. 90. Repló. La barra equivale a 10 micrómetros.



89

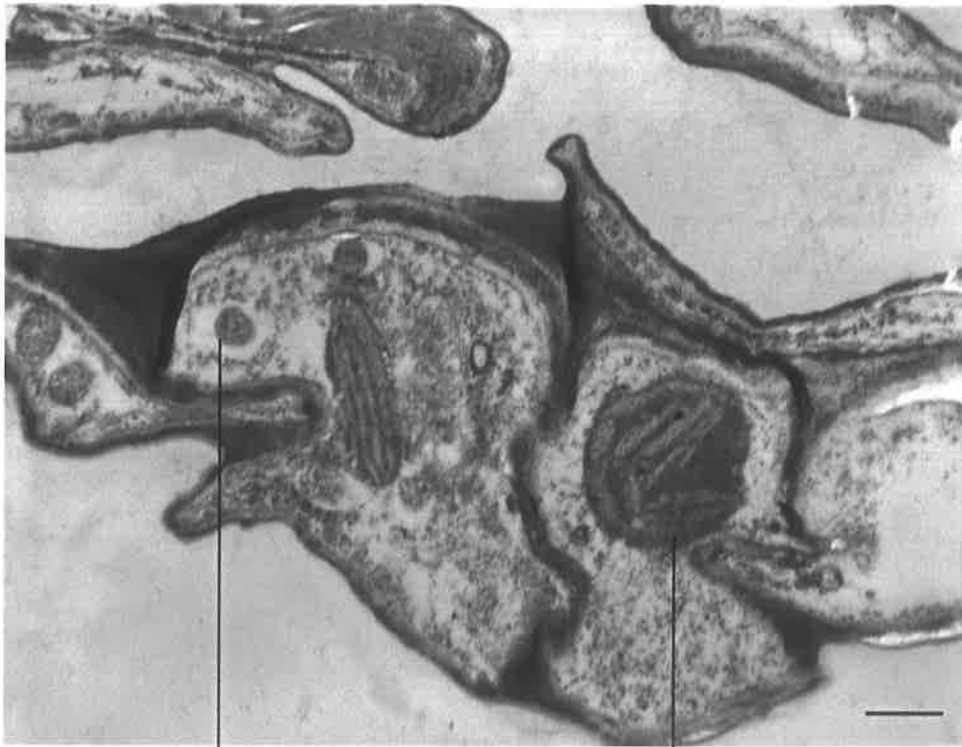


Tráqueas

Falso
dissepimento

90

Fig. 91. Fruto. Célula del falso disepimento. La barra equivale a 1 micrómetro.



Mitocondria

Plasto

91

COMENTARIO

Los frutos de *Arabidopsis thaliana* son silículas formadas por dos valvas dehiscentes separadas por un falso septo persistente constituido por el margen de las placentas y un falso tabique placentario⁴¹. Desde que se produce la polinización, el fruto se desarrolla en 2 o 3 días, alcanzando los 14 mm en el caso del ecotipo Columbia, aunque el tamaño depende del número de semillas que contienen en su interior, que varía entre 30 y 60. Se ha observado que la silícula se desarrolla normalmente aunque las semillas no lo hagan, puesto que se han encontrado plantas mutantes homocigotas para una mutación letal del embrión que pueden desarrollar frutos normales⁷¹.

SEMILLA

Fig. 94. Semilla. La barra equivale a 10 micrómetros.

Fig. 95. Semilla. Células embrionarias. La barra equivale a 1 micrómetro.

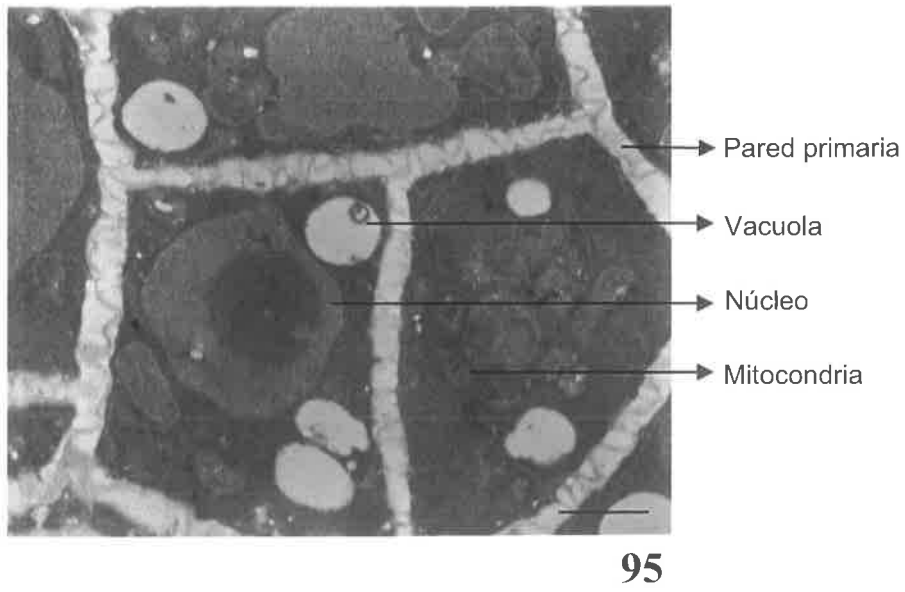
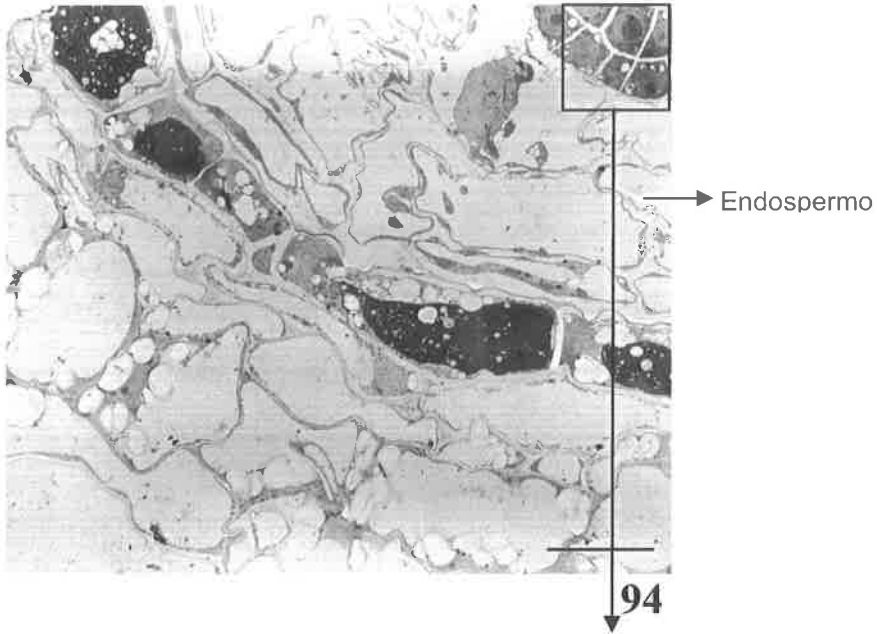
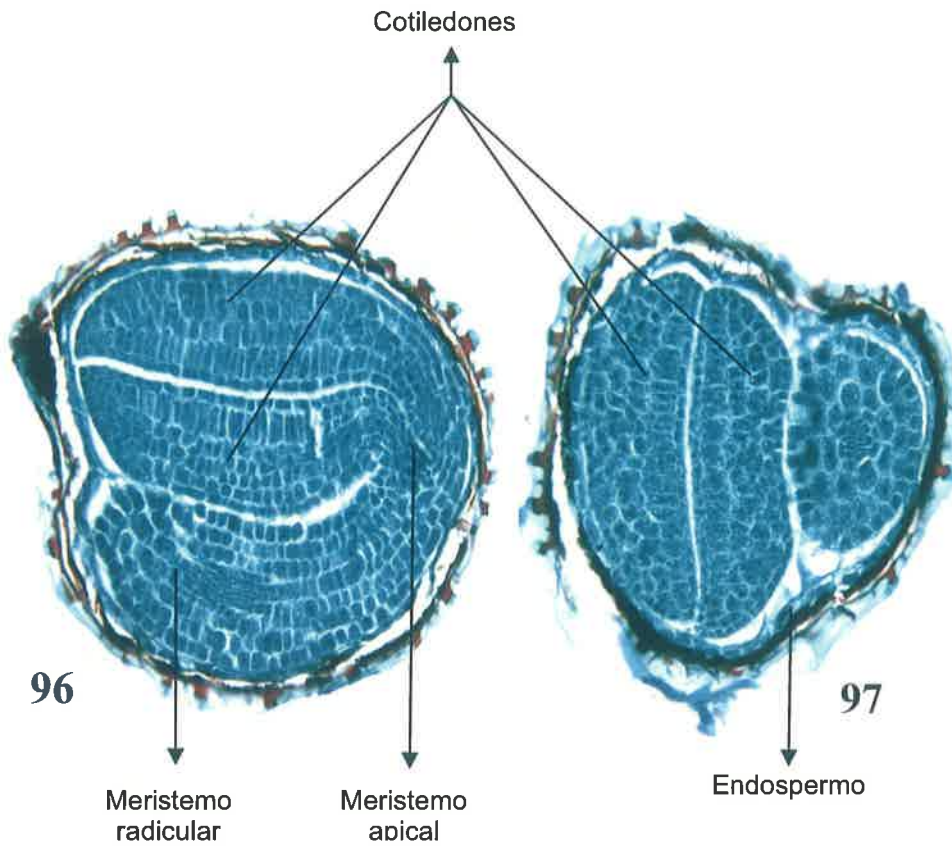


Fig. 96. Semilla. Sección longitudinal. 20x.

Fig. 97. Semilla. Sección transversal. 20x.



COMENTARIO

El desarrollo embrionario de *Arabidopsis thaliana* ha sido ampliamente estudiado durante todas las etapas del proceso⁷² y es semejante al de *Capsella bursapastoris*, otra brassicácea frecuentemente utilizada como modelo de desarrollo embrionario en plantas dicotiledóneas⁵². La embriogénesis en angiospermas comienza con una doble fertilización. Un gameto masculino fecunda el megasporocito dando lugar posteriormente al cigoto, y un segundo gameto masculino fecunda la célula diploide central, originando una célula triploide inicial conocida como endospermo primario. Esta célula inicial se divide, migrando las células hijas a polos opuestos del saco embrionario (micropilo y chalaza). Las células resultantes de las sucesivas divisiones se acumulan en la periferia del saco embrionario, siendo diferentes en cuanto a su estructura y desarrollo, por lo que puede hablarse de que el endospermo es helobial⁸.

Durante la elongación y expansión de los cotiledones, el endospermo se degrada y es absorbido por el embrión, resultando ser la semilla madura una semilla sin albúmen, en la que persiste una única fina capa de endospermo⁸.

Bibliografía

Bibliografía citada

- 1- Lee-Chen, S., Steinitz-Sears, L. M. (1967). The location of linkage groups in *Arabidopsis thaliana*. Canadian Journal of genetics and cytology, 9: 381.
- 2- Koornneef M., Van Eden J., Hanhart C. J., Stam P., Braaksma F. J., Feenstra W. J. (1983). Linkage Map of *Arabidopsis thaliana*. J. Hered., 74: 265-270.
- 3- Ruffer-Turner, M., Napp-Zinn, K. (1979). Investigations on leaf structure in several genotypes of *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis Information Service*, 16: 94.
- 4- Bouveret, R., Schönrock, N., Gruissem, W., Hennig, L. (2006). Regulation of flowering time by *Arabidopsis MSI1*. *Dev.*, 133: 1693-1702.
- 5- Dinneny, J. R., Weigel, D., Yanofsky, M. F. (2006). *NUBBIN* and *JAGGED* define stamen and carpel shape in *Arabidopsis*. *Dev.*, 133: 1645-1655.
- 6- Aharoni, A., Giri, P., Deuerlein, S., Griepinka, F., de Kogela, W. G., Verstappen, W. A., Verhoevena H. A., Jongsmaa, M., Schwab, W., Bouwmeester, H. (2003). Terpenoid Metabolism in Wild-Type and Transgenic *Arabidopsis* Plants. *Plant Cell*, 15: 2866-2884.
- 7- Robles, P., Pelaz, S. (2005). Flower and fruit development in *Arabidopsis thaliana*. *Int. J. Dev. Biol.*, 49: 633-643.
- 8- Bowman, J. (1994). *Arabidopsis: an atlas of morphology and development*. Springer-Verlag, New York.
- 9- Broughton, R. E., Milam, J. E., and Roe, B. A. (2001). The complete sequence of the zebrafish (*Danio rerio*) mitochondrial genome and evolutionary patterns in vertebrate mitochondrial DNA. *Genome Res.* 11:1958-1967.
- 10- Serrano, J. (1998). Disección genética del desarrollo de la hoja de *Arabidopsis thaliana*: estudio de ecotipos y estirpes mutantes de la colección del *Arabidopsis Information Service*. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias. Universidad de Alicante.
- 11- Herrmann, R. et al. (1996). The *Mycoplasma Pneumoniae* Genome Initiative. DNA sequence of the complete *Mycoplasma pneumoniae* genome. Herrmann's Annual Report 2000: 74-77.
- 12- Bult, C. J., White, O., Zhou, L., Fleischmann, R. D., Sutton, G. G., Blake, J. A., FitzGerald, L.M., Clayton, R. A., Gocayne, J. D., Kerlavage, A. R., Dougherty, B. A.,

- 37- Wolpert, L., Beddington, R., Jessell, T., Lawrence, P., Meyerowitz, E., Smith, J. (2002). Principles of Development. Oxford University Press.
- 38- Chien, J. C., Sussex, I. M. (1996). Differential regulation of trichome formation on the adaxial and abaxial leaf surfaces by gibberellins and photoperiod in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Plant Physiol., 111: 1321-1327.
- 39- Telfer A., Poethig R.S.(1994). Leaf Development in *Arabidopsis*. *Arabidopsis*: 379-386.
- 40- Telfer A., Bollman K. M., Poethig R. S. (1997). Phase change and the regulation of trichome distribution in *Arabidopsis thaliana*. Dev., 124: 645-649.
- 41- Strasburger, E., Noll, F., Schenk, H., Schimper, A. F. W. (1994). Tratado de botánica. Editorial Omega, S.A.
- 42- Deak, K., Malamy, J. (2005). Osmotic regulation of root system architecture. 16th International Conference on *Arabidopsis thaliana*.
- 43- Truernit, E., Siemering, K., Hodge, S., Grbic, V., Haseloff, J. (2006). A map of KNAT gene expression in the *Arabidopsis* root. Plant Mol. Biol., 60: 1-20.
- 44- Scheres, B., Benfey, P., Dolan, L. Root development (2002). En: The *Arabidopsis* Book, Somerville C. R., Meyerowitz E. M. (Eds.), American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, doi/10.1199/tab.0101, <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis>.
- 45- Nawrath, C. (2002). The biopolymers cutin and suberin. The *Arabidopsis* book, 34: 1-14.
- 46- Rudall, P. (1987). Anatomy of flowering plants: an introduction to structure and development. Edward Arnold.
- 47- Dolan, L., Linstead, P., Carol, R. J., Ryan, E., Ortega, O., Menand, B. (2003). Using root hairs to dissect cell morphogenesis in plants. 14th International Conference on *Arabidopsis* Research.
- 48- Álvarez, R. (2002). Atlas de histología y organografía de las plantas. Secretariado de Publicaciones. Universidad de León.
- 49- Keller, T.; Abbott, J.; Moritz, T.; Doerner, P. (2006) *Arabidopsis* regulator of axillary meristems1 controls a leaf axil stem cells niche and modulates vegetative development. P Cell, 45: 598-611.

- 50- Fontaine, J. X., Saladino, F., Agrimonti, C., Bedu, M., Hirel, B., Restivo, F. M., Dubois, F. (2006). Control of the synthesis and the subcellular targeting of the two GDH genes products in leaves and stems of *Nicotiana plumbaginifolia* and *Arabidopsis thaliana*.
- 51- Stahl, Y., Bleckmann, A., Simon, R. (2005). Functional analysis of CLE40 in *Arabidopsis* root meristem development. 16th International Conference on *Arabidopsis thaliana*.
- 52- Esau, K. (1976). Anatomía vegetal. Ediciones Omega, S. A.
- 53- Bohmert, K., Camus, I., Bellini, C., Bouchez, D., Caboche, M., Benning, C. (1998). AGO1 defines a novel locus of *Arabidopsis* controlling leaf development. EMBO J., 17: 170-180.
- 54- Emery, J. F., Floyd, S. K., Álvarez, J., Eshed, Y., Hawker, N. P., Izhaki, A., Baum, S. F., Bowman, J. L. (2003). Radial patterning of *Arabidopsis* shoots by class III HD-ZIP and KANADI genes. Curr. Biol., 13: 1768-1774.
- 55- Eshed, Y., Izhaki, A., Baum, S. F., Floyd, S. K., Bowman, J. L. (2004). Asymmetric leaf development and blade expansion in *Arabidopsis* is mediated by KANADI and YABBY activities. Development, 131: 2997-3006.
- 56- Sieburth, L. E. (1999). Auxin transport is required for leaf vein pattern in *Arabidopsis*. Plant Physiol., 121: 1179-1190.
- 57- Reinhardt, D., Mandel, T., Kuhlemeier, C. (2000). Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs. Plant Cell, 12: 507-518.
- 58- Mattsson, J., Ckurshumova, W., Berleth, T. (2003). Auxin signalling in *Arabidopsis* leaf vascular development. Plant Physiol., 131: 1327-1329.
- 59- Zgurski, J. M., Sharma, R., Bolokoski D. A., Schultz, E. A. (2005). Asymmetric auxin response precedes asymmetric growth and differentiation of asymmetric leaf1 and asymmetric leaf2 *Arabidopsis*.
- 60- Geisler, M., Yang, M., Sack, F. D. (1998). Divergent regulation of stomatal initiation and patterning in organ and suborgan regions of the *Arabidopsis* mutants too many mouths and four lips. Planta, 205: 522.
- 61- Nadeau, J. A., Sack, F. D. (2002). Stomatal Development in *Arabidopsis*, The *Arabidopsis* Book. Somerville C. R., Meyerowitz E. M. (Eds.) American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, doi/10.1199/tab.0066, <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis>.

- 62- Martínez Zapater, J. M., Jarillo, J. A., Cruz-Álvarez, M., Roldan, M., Salinas, J. (1995). *Arabidopsis* late-flowering five mutants are affected in both vegetative and reproductive development. *Plant J.*, 7: 543-549.
- 63- Ruiz-García, L., Madueño, F., Wilkinson, M., Haughn, G. W., Salinas, J., Martínez-Zapater, J. M. (1997). Different roles of flowering time genes in the activation of floral initiation genes. *Plant Cell*, 9: 1921-1934.
- 64- Ausin, I., Alonso-Blanco, C., Martínez-Zapater, J. M. (2005). Environmental regulation of flowering. *International Journal of Developmental Biology*, 49: 689-705.
- 65- Okamoto, J. K., den Boer, B. G. W., Jofuku, K. D. (1993). Regulation of *Arabidopsis* flower development. *Plant Cell*, 5: 1183-1193.
- 66- Weigel, D., Meyerowitz, E. M., Bowman, J., Brockman, L., Drews, G., Jack, T., Sieburth, L. (1991). A Genetic and Molecular Model for Flower Development in *Arabidopsis*. *Journal of Cell Biochemistry Supplement*.
- 67- Pylatuik, J. D., Lindsay, D. L., Davis, A. R., Bonham-Smith, P. C. (2003). Isolation and characterization of a *Brassica napus* cDNA corresponding to a B-class floral development gene. *J. Exp. Bot.*, 45: 226.
- 68- Kilinc, A., Smyth, D. (2005). Regulatory control of PETAL LOSS, a flower development gene of *Arabidopsis*. 16th International Conference on *Arabidopsis* Research.
- 69- Cresti, M., Blackmore, S., van Went, J. L. (1992). Atlas of sexual reproduction in flowering plants. Springer-Verlag, Berlin.
- 70- Levin, J., Meyerowitz, E. M. (1995). UFO: An *Arabidopsis* gene involved in both floral meristem and floral organ development. *Plant Cell*, 7: 529-548
- 71- Franzmann, L., Patton, D. A., Meinke, D. W. (1989). In vitro morphogenesis of arrested embryos from lethal mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Theoretical and applied genetics*, 77: 609-616.
- 72- Mansfield, S.G., Briarty, L. G., Erni, S. (1991). Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. The mature embryo sac. *Canadian journal of botany-revue canadienne de botanique*, 69: 447-460.

Bibliografía consultada

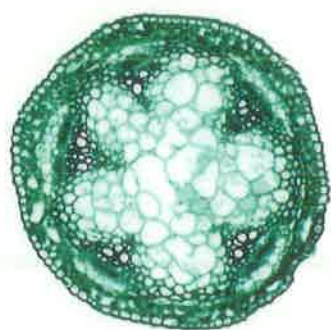
- Álvarez, R. (1998). Apuntes de Citología-Histología de las plantas. Secretariado de Publicaciones. Universidad de León.
- Álvarez, R. (2001). Estudio histológico de la floración del manzano. Consejería de Agricultura y Ganadería. Junta de Castilla y León.
- Berleth, T., Chatfield, S. (2002). Embryogenesis: Pattern Formation from a Single Cell, En: The *Arabidopsis* Book, Somerville C. R., Meyerowitz E. M. (Eds.), American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, doi/10.1199/tab.0051, <http://www.aspb.org/publications/Arabidopsis>.
- Bowes, B. G. (1996). Plant structure. Manson Publishing.
- Brown, A. H. D., Marshall, D. R., Frankel, O. H., Williams, J. T. (Eds.). The use of plant genetic resources (1988). Cambridge University Press, Cambridge.
- Chaffey, N., Cholewa, E., Regan, S., Sundberg, B. (2002). Secondary xylem development in *Arabidopsis*: a model for wood formation. *Physiol Plantarum.*, 114: 594-600.
- Dickison, W.C. (2000). Integrative Plant Anatomy. Harcourt Academic Press, Massachusetts.
- Fahn, A. (1978). Anatomía vegetal. H. Blume Ediciones.
- Flora Ibérica: plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. Vol IV, Cruciferae-Monotropaceae, Castroviejo S. *et al.* (Eds.), Real Jardín Botánico, CSIC. Madrid, 1993, pp: 40-41.
- Galser J. C., Robinson-Beers, K., Gasser, C. S. (1995). The *Arabidopsis* SUPERMAN gene mediates asymmetric growth of the outer integument of ovules. *Plant Cell*, 7: 333-345.
- Galway, M. E., Heckman, J. W., Schifelbein, J. W. (1997). Growth and ultrastructure of *Arabidopsis* root hairs: the *rhd3* mutation alters vacuole enlargement and tip growth. *Planta*, 201: 209-218.
- Goldwasser, Y., Westwood, J.H., Yoder, J.I. (2002). The Use of *Arabidopsis* to Study Interactions between Parasitic Angiosperms and Their Plant Hosts. En: The *Arabidopsis* Book, Somerville C. R.,

- Meyerowitz E. M., American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, doi/10.1199/tab.0035, <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis>.
- Grierson, C., Schiefelbein, J. (2002). Root Hairs, En: The *Arabidopsis* Book, Somerville C. R., Meyerowitz E. M. (Eds.), American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, doi/10.1199/tab.0060, <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis>.
- Gunning, B. S., Steer, M. W. (1996). Plant Cell Biology. Oxford University Press, Oxford.
- Hawes, C., Satiat-Jeunemaitre, B. (2001). Electron Microscopy. En: Plant Cell Biology. (Practical approach series; 250) Oxford university press, pp. 235-266.
- Johansen, D. A. (1940). Plant Microtechnique. McGraw-Hill, New York.
- Levin, J., Meyerowitz E. M. (1995). UFO: An *Arabidopsis* gene involved in both floral meristem and floral organ development. Plant Cell, 7: 529.
- Malmberg, R. L. (1993). Production and analysis of plant mutants, emphasizing *Arabidopsis thaliana*. En: Methods in plant molecular biology and biotechnology, editado por Bernard R. Glick, John E. Thompson CRC Press, pp. 11-28.
- Mauseth, J. D. (1988). Plant Anatomy. The Benjamin / Cummings Publishing Company, Inc.
- Meagher, R. B., Fechheimer, M. (2003). The *Arabidopsis* Cytoskeletal Genome, En: The *Arabidopsis* Book, Somerville C. R., Meyerowitz E. M. (Eds.), American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, doi/10.1199/tab.0096, <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis>.
- Millar, A. H., Day, D. A., Whelan, J. (2004). Mitochondrial Biogenesis and Function in *Arabidopsis*, En: The *Arabidopsis* Book, Somerville C. R., Meyerowitz E. M. (Eds.), American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, doi/10.1199/tab.0105, <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis>.
- Meyerowitz E. M. (1994). Structure and organization of the *Arabidopsis thaliana* nuclear genome. *Arabidopsis*, Meyerowitz, E. M., Somerville, C. R. (eds) Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. pp.: 21-36.
- Naef, J. (1999). Histologie et anatomie de l'appareil végétatif des spermaphytes. Conservatoire et Jardin Botaniques de Genève.

- Ohashi-Ito, K., Fukuda, H. (2003). HD-zip III homeobox genes that include a novel member, ZeHB-13 (*Zinnia*)/ATHB-15 (*Arabidopsis*), are involved in procambium and xylem cell differentiation. *Plant Cell Physiol.*, 44: 1350-1358.
- Paniagua, R., Nistal, M., Sesma, P., Álvarez-Uria, M., Fraile, B. (1993). *Citología e histología vegetal y animal*. McGraw-Hill-Interamericana de España.
- Pazourek, J., Votrubová, O. (1997). *Atlas of plant anatomy*. Peres Publishers.
- Pigliucci, M. (2002). *Ecology and Evolutionary Biology of Arabidopsis*. En: *The Arabidopsis Book*. Somerville C. R., Meyerowitz E. M. (eds.), American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, doi/10.1199/tab.0003, <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis>.
- Raven, J. D., Evert, R. F., Eichhorn, S. E. (1992). *Biología de la plantas*. Editorial Reverté, S.A.
- Reig, J. (2002). *Ontogenia floral de las Cistáceas de la Península Ibérica. (Estudio Anatómico Histológico)* Tesis doctoral, Facultad de Farmacia. Universitat de Valencia.
- Ridge, I. (2002). *Plant growth and development*. En: *Plants*. Oxford University Press, pp 221-238 *Plant Evolution and Structure* pp. 23-52.
- Rodermel, S. (2002). *Arabidopsis Variegation Mutants*, En: *The Arabidopsis Book*, Somerville C. R., Meyerowitz E. M. (Eds.), American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, doi/10.1199/tab.0079, <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis>.
- Scholl, R., Rivero-Lepinckas, L., Crist, D. (2005). *Growth of Plants and Preservation of Seeds*. En: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 82: *Arabidopsis Protocols*. Martínez Zapater J. M., Salinas J. (Eds.), Humana Press, pp. 1-12.
- Shaw, P. J. (2001). *Introduction to optical microscopy for plant cell biology*. En: *Plant Cell Biology. (Practical approach series; 250)* Oxford university press, pp. 1-34.
- Truernit, E., Siemering, K. R., Hodge, S., Grbic, V., Haselof, J. (2006). *A map of KNAT gene expression in the Arabidopsis root*. *Plant Mol. Biol.*, 60: 1-20.
- Turner, S., Sieburth, L., *Vascular, Patterning (2002)*. En: *The Arabidopsis Book*, Somerville C. R., Meyerowitz E. M. (Eds.), American Society of Plant Biologists,

Arabidopsis thaliana a través del microscopio óptico de campo claro y del MET.

Rockville, MD, doi/10.1199/tab.0073,
<http://www.aspb.org/publications/arabidopsis>.



Universidad de León
Secretariado de Publicaciones

Caja España 