CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE UNA SECUENCIA HOMÓLOGA DEL GEN LEAFY EN GIMNOSPERMAS (*PINUS RADIATA* LEMM.)

LIZ Y. IZQUIERDO, ROSALINDA TAPIA, FRANCISCO VERGARA Y ELENA ÁLVAREZ-BUYLLA

Laboratorio de Genética y Evolución Molecular, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-275, Coyoacán, 04510 México, D.F., México.

Resumen. Un fragmento de una secuencia homóloga del gen LEAFY (LFY), que codifica para una proteína que tiene la capacidad de regular la transcripción de muchos genes involucrados en la iniciación de la floración y la morfogénesis floral en las angiospermas fue clonado a partir de ADN genómico de tejido foliar de *Pinus radiata*, una planta que no produce flores. Utilizando la técnica de PCR se amplificó un segmento de 85 pb flanqueado por dos oligonucleótidos degenerados y diseñados a partir de secuencias de ortólogos putativos de este gen clonados para varias especies de angiospermas. El fragmento clonado presentó considerable similitud con la secuencia de LFY de *Arabidopsis thaliana* entre las bases 5077 y 5143 y además hibridó con una clona de LFY proveniente de esta misma especie. Este resultado sugiere que algunos componentes moleculares involucrados en la complejidad funcional y estructural del desarrollo de las estructuras reproductivas en las plantas superiores tuvieron su origen antes de la aparición de las plantas con flores.

Palabras claves: Pinos, *Arabidopsis thaliana*, LFY, factores de transcripción, biología del desarrollo.

Abstract. A fragment from an homologous sequence of LEAFY (LFY) gene that encodes for a transcription factor involved in early events during inflorescence development was cloned from genomic DNA of *P. radiata*, a non flowering seed plant. Using PCR technic we amplified an 85 bp fragment flanked by two primers designed from some DNA sequences obtained from different species of angiosperms. The fragment obtained was highly similar to *A. thaliana* gene LFY between 5077 and 5143 bases and hybridized with a LFY clone from this species. This result suggests that some molecular components of the functional and structural complexity of the development of reproductive structures in higher plants are an ancestral property of seed plants and not a novelty in the angiosperm lineage.

Key words: Pines, *Arabidopsis thaliana*, LFY, transcription factors, developmental biology.

La biología del desarrollo estudia los mecanismos a través de los cuales una célula no diferenciada se transforma en un organismo multicelular. Dentro del genoma de los organismos superiores existe un programa de instrucciones que especifica y coordina cada una de las fases del desarrollo de un organismo (Griffiths *et al.*, 1993; Robinson *et al.*, 1993). El uso de múltiples técnicas de biología molecular en los estudios de la base genética del desarrollo en los organismos multicelulares, ha revolucionado la manera de analizar las relaciones entre los procesos ontogenéticos y la evolución de las especies (Bryant y Cuming, 1993; Wray, 1994). La información obtenida ha permitido comparar secuencias, genomas y patrones de expresión entre especies y grupos de especies filogenéticamente poco cercanas y relacio-

nar estos datos con las funciones de genes particulares (Griffiths *et al.*, 1993). Los estudios de la morfogénesis han revelado la existencia de algunos genes críticos cuyas proteínas (factores de transcripción) pueden reconocer determinadas secuencias de ADN y determinar los patrones de expresión de cientos de genes, que participan tanto en procesos de diferenciación celular como en la formación de estructuras específicas en diferentes organismos. Estos factores de transcripción operan a manera de redes regulatorias en una secuencia espacio-temporal, desde etapas inmediatamente posteriores a la fertilización hasta las fases terminales del desarrollo de individuos adultos (Sommer *et al.*, 1990; Coen, 1991; Griffiths *et al.*, 1993). Los estudios más recientes en este campo coinciden en señalar que estas redes regulatorias se han con-

servado a lo largo de la historia evolutiva de los eucariontes (Kenyon, 1994; Palopoli y Patel, 1996). En este sentido, los genes que se han caracterizado en diversos taxa eucariontes presentan un alto porcentaje de similitud en sus secuencias, aunque algunos de los fenotipos macroscópicos resultantes son profundamente diferentes entre sí. Probablemente, las variaciones en estas redes constituyan la base molecular de la diversidad morfológica y funcional de los eucariontes. Un ejemplo clásico, de lo anteriormente expuesto, es el descubrimiento de los genes *Pax-6* en ratones (Quiring *et al.*, 1994) y *eyeless* en *Drosophila* (Halder *et al.*, 1995). Ambos genes son indispensables en el desarrollo del ojo y presentan una similitud del 90%, por lo que se les considera genes homólogos. Sin embargo, el plan general de diseño y organización de las estructuras visuales en estos organismos es muy distinta.

Esta nueva perspectiva de las relaciones entre la dinámica del genoma y la morfología multicelular incluye también a las plantas. Particularmente en las angiospermas se han encontrado redes de regulación genética muy conservadas (Cohen y Meyerowitz, 1991; Weigel y Meyerowitz, 1994; Yanofsky, 1995) que controlan los procesos de diferenciación y organogénesis, dando como resultado una variedad de estructuras vegetativas y reproductivas. Es justamente en el contexto del estudio de la evolución de estas últimas que se ubica este trabajo.

La formación de flores como estructuras reproductivas es una de las características distintivas de las angiospermas. Los estudios fundamentales sobre la morfogénesis de la flor se han realizado en dos dicotiledóneas, *Arabidopsis thaliana* (Cruciferae) y *Antirrhinum majus* (Scrophulariaceae). Estas dos especies se han utilizado como modelos para estudiar los mecanismos genéticos y moleculares que controlan el desarrollo de las estructuras reproductivas (Schwarz-Sommer *et al.*, 1992; Yanofsky, 1995). Análisis genéticos, utilizando mutantes con morfologías florales distintas a la silvestre, y la tecnología del ADN recombinante (Griffiths *et al.*, 1993) han sido la base para estudiar el fenómeno de homeósis en plantas (ver revisión de Bernier, 1988; Yanofsky, 1995), que se refiere a los cambios (mutaciones) en el patrón de desarrollo de un órgano o sistema de órganos (e.g. la presencia de pétalos donde normalmente se formarían carpelos). Los factores de transcripción asociados a la morfogénesis floral juegan un papel muy importante en regular la transcripción de los genes involucrados en la formación de la flor (Weigel y Meyerowitz, 1993; Yanofsky, 1995).

Una flor típica de dicotiledónea consiste de cuatro verticilos concéntricos que comprenden, de la

periferia hacia el centro, a los sépalos, pétalos, estambres y carpelos. El desarrollo floral se inicia con la transición de un meristemo vegetativo a un meristemo de inflorescencia. Posteriormente, el meristemo de inflorescencia se compromete a formar una flor transformándose así en un meristemo floral. La iniciación de la floración está fuertemente influenciada por factores ambientales. Una vez que esta inducción se da, se forman los primordios de los órganos florales en el meristemo floral. Estos primordios toman diferentes destinos dependiendo de la posición que ocupen dentro de la flor; finalmente los primordios se diferencian en los órganos florales (Weigel y Meyerowitz, 1993; Van Tunen *et al.*, 1994).

Entre los genes que se han caracterizado mejor, estructural y funcionalmente está LFY, que codifica para un factor de transcripción localizado en el núcleo y que se caracteriza por presentar en su extremo amino terminal un dominio rico en prolina y una región ácida en la parte central (Weigel, 1995). Además, parece ser el primer marcador molecular de células destinadas a la morfogénesis de la flor y en particular del meristemo floral. En *Arabidopsis thaliana* fenotipos mutantes de este gen tienen vástagos de inflorescencias en vez de flores, al igual que su homólogo *Floricaula* en *Antirrhinum majus* (Coen *et al.*, 1990; Schwarz-Sommer *et al.*, 1992). Estos resultados, junto con experimentos de hibridaciones *in situ*, han demostrado que LFY interviene en la transición del meristemo de inflorescencia a meristemo floral (Weigel, 1995; Weigel y Nilsson, 1995); aunque también se expresa en pétalos, estambres y carpelos (Weigel y Meyerowitz, 1993). A diferencia de los genes MADS-box, involucrados fundamentalmente en la determinación de la identidad de los órganos de la flor (Sommer *et al.*, 1990; Van Tunen *et al.*, 1994), LFY no es parte de una familia génica. De hecho codifica para un tipo de factor de transcripción que no se parece a ninguno de los anteriormente caracterizados.

Se han aislado varios alelos mutantes del locus LFY cuyas flores varían en el grado de alteración del fenotipo pero en general presentan características asociadas a vástagos de inflorescencias (Haughn y Somerville, 1988; Feldmann, 1991; Weigel *et al.*, 1992; Weigel y Meyerowitz, 1993). La expresión de LFY sigue una dinámica espacio-temporal, y ligeras modificaciones en el patrón establecido generan cambios importantes en la morfología de las inflorescencias de las plantas. Por ejemplo, si la expresión de LFY ocurre en el meristemo primario al inicio del desarrollo de la inflorescencia, se producirá una flor terminal. Por el contrario, si la activación de este mismo gen se da en el meristemo lateral tendremos un racimo de flores, simple o compuesto.

El estudio de las secuencias de LFY ha demostrado que en éstas existen regiones muy conservadas entre especies filogenéticamente muy distantes como *Arabidopsis thaliana*, *Antirrhinum majus*, *Lycopersicon esculentum* y *Zea mays* (Coen *et al.*, 1990; Coen, 1991; Weigel, 1995). El hecho de que este gen se encuentre en mono y dicotiledóneas sugiere que debería estar presente en el ancestro de las angiospermas. Con esta perspectiva es relevante preguntarse si LFY está en gimnospermas y qué tan conservada está su estructura primaria.

En este trabajo se reporta la caracterización preliminar de una secuencia probablemente homóloga del gen LFY de *Pinus radiata*. Las coníferas constituyen el grupo hermano de un clado que incluye a las Gnetales y a las angiospermas (Bremer, 1985; Taylor y Kirchner, 1996); a su vez, las Gnetales son el grupo hermano de las plantas con flores (Crane *et al.*, 1995). Aunque estos dos grupos de plantas presentan estructuras reproductivas morfológicamente muy distintas, es probable que la base molecular de esta diferenciación esté, al menos parcialmente, conservada entre todas las plantas con semillas.

Métodos

Extracción de ADN y amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

La especie seleccionada para el estudio fue *Pinus radiata* Lemm. Esta es la especie modelo en pinos y hay varios laboratorios de biología molecular trabajando con ella. Se extrajo ADN genómico a partir de hojas siguiendo el protocolo MINI-PREP (Vásquez-Lobo, 1996). Este ADN se utilizó como molde en una reacción de PCR cuyo volumen final fue de 100 µl, conteniendo: dd H₂O, 1x buffer (Tris-HCL 10 mM, pH: 8.3, KCl 50 mM, MgCl₂ 1.5 mM, Tween 20 y NP-40 al 0.005% y gelatina al 0.001%), 1.5 mM de MgCl₂, 0.25 µM de dNTP, 50 pM de cada oligonucleótido, 100 ng de ADN molde y 2.5 U de enzima Taq-ADN polimerasa. Los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados por William H. Rottmann a partir de las regiones más conservadas, que resultaron al comparar diversas secuencias del gen LFY de angiospermas. Sus secuencias son, para el oligonucleótido izquierdo (lado 5'): CGGAATTCATGMGICAYTAYGTICAYTGTYTAYGC y para el derecho (lado 3'):

GGATCCGG YTRTARCAIGCYTGICKCCA, donde M = A/C, I = Inosina, Y = C/T, R = A/G y K = A/G.

La reacción se realizó en un termociclador Perkin Elmer modelo 9600; las condiciones de la reacción de amplificación fueron: 1 min a 94° C (desnaturalización del ADN), 4 min a 72° C para incorporar la enzima,

seguidos por 35 ciclos de amplificación que comprenden 10 s a 94° C (desnaturalización), 30 s a 52° C (alineación) y 30 s a 72° C (extensión) y finalmente, 5 min de extensión final. El producto obtenido se analizó con electroforesis en un gel de agarosa al 2%; la banda correspondiente se cortó y purificó con el protocolo de MICROPURE (AMICON) y se mandó a secuenciar. Una vez que se tuvo la secuencia se comparó, utilizando el programa Gene Works 2.3.1, con la de LFY de *A. thaliana*.

Extracción del gen LFY de *Arabidopsis thaliana*

Disponíamos de una clona de LFY proveniente de *Arabidopsis thaliana* insertada en el plásmido pDW124 dentro de la bacteria *Escherichia coli* (suministrada por Detlef Weigel). Inicialmente se sembró una colonia de esta bacteria en 5 ml de medio LB con ampicilina al 5% (Sambrook *et al.*, 1989) y se incubó a 37° C durante 8 h con agitación constante. Posteriormente, con 1 ml de este precultivo se inocularon 200 ml del mismo medio, y se incubó bajo las mismas condiciones toda la noche. La extracción del plásmido se hizo por el método de lisis alcalina (Ausubel *et al.*, 1995). Para liberar el fragmento del gen LFY del plásmido se hizo una digestión doble con las enzimas Bam HI y Kpn I siguiendo las especificaciones del proveedor (New England Biolabs). El producto de la digestión se separó con electroforesis en un gel de agarosa al 1% y la banda correspondiente a LFY (aproximadamente 1495 pb) se recuperó del gel, se purificó con el protocolo MICROPURE, se marcó con biotina (BIO-PRIME, Gibco-BRL) y posteriormente se utilizó como sonda en el experimento de hibridación.

Southern blotting

Esta técnica fue desarrollada por Southern en 1979 y consiste en la transferencia, por capilaridad, de ADN de un gel a una membrana de nitrocelulosa o nylon cargada positivamente a través del flujo de un buffer apropiado (Griffiths *et al.*, 1993; Landry, 1993). Antes de la transferencia el gel se despurinó sumergiéndolo en una solución 0.25 N de HCL durante 15 min. Posteriormente, el gel se enjuagó con agua destilada y se colocó en una solución 1.5 M de NaCl y 0.5 M de NaOH (pH: 7.2) por 30 min para desnaturalizar el ADN y generar así cadenas sencillas; se volvió a enjuagar con agua y se sumergió 30 min en una solución neutralizadora (1.5 M de NaCl y 0.5 M de Tris-HCl; pH: 7.2) para detener la desnaturalización. La transferencia consistió en poner en contacto al gel con una membrana de nylon (Hybond-N) en una solución de SSC 10X durante toda una noche permi-

Figura 1. Fragmentos de ADN amplificados con oligonucleótidos diseñados a partir de secuencias de ADN de diferentes especies de angiospermas. Se utilizó como marcador molecular a λ en escaleras de 100 pb (a). La secuencia de *P. radiata* (b) obtenida por PCR se ubicó entre las bandas correspondientes a 100 y 200 pb del marcador. Como control positivo se utilizó a *A. thaliana* (c).

Figura 2. Autorradiografía de la hibridación entre el ADN del plásmido pdw24-LFY (a) y de los fragmentos amplificados por PCR de *A. thaliana* (b) y *P. radiata* (c) con la sonda biotilada del plásmido pdw24-LFY.

tiendo la migración, por capilaridad, del ADN del gel a la membrana (Sambrook *et al.*, 1989). El gel transferido tenía cargado los fragmentos de ADN de *P. radiata* y *A. thaliana* amplificados por PCR y ADN del plásmido-LFY; estos dos últimos sirvieron como controles positivos en el experimento de hibridación. Finalmente, se separó la membrana del gel, se dejó secar a temperatura ambiente y se inmovilizó el ADN transferido en un horno de luz UV (Stratalinker 2400).

Hibridación

La hibridación es una técnica que consiste en poner en contacto cadenas sencillas complementarias de ADN provenientes de diferentes organismos y permitir que se peguen bajo determinadas condiciones de temperatura y salinidad. El experimento de hibridación se hizo siguiendo el protocolo del Photogene 2.0 (Gibco-BRL) y comprendió cuatro etapas, la prehibridación, la hibridación, el lavado y el revelado. Las tres primeras se llevaron a cabo en tubos cilíndricos en un horno rotatorio (STOVALL). La fase de prehibridación permitió saturar la membrana con ADN no específico en nuestro caso utilizamos ADN desnatu-

ralizado de salmón. En la etapa de hibridación se incorporó la sonda biotilada al recipiente que contenía la membrana. Se realizaron tres lavados, el primero con SSC 2X y SDS 0.5% por 10 m a 25° C, el segundo con SSC 2X y SDS 1% por 10 m a 25° C y el tercero con SSC 2X y SDS 0.5% por 8 m a 55° C. En la fase de lavado se eliminó la sonda no incorporada mientras que las secuencias que lograron hibridar permanecen unidas. Como paso final se reveló la membrana por autorradiografía.

Resultados y discusión

La secuencia de ADN de *Pinus radiata* obtenida por PCR (Figura 1) correspondió a un fragmento de 85 pares de bases (considerando la distancia a la que complementaron los oligonucleótidos utilizados con el ADN genómico). Al comparar esta secuencia con la de LFY de *A. thaliana* se encontró una similitud del 65.1 % entre las bases 5077 y 5143 indicando que nuestro fragmento probablemente corresponde a un ortólogo del gen LFY. Así mismo, el experimento de hibridación fue positivo tanto para los controles como para *Pinus radiata* (Figura 2), corroborando nuestro hallazgo.

La presencia de esta secuencia (85 pb), similar a una región del gen LFY, en *Pinus radiata*, una especie perteneciente a las gimnospermas, podría sugerir que este gen no es exclusivo de las plantas con flores. El análisis filogenético de algunos genes (asociados al desarrollo) que codifican para factores de transcripción y que tienen funciones regulatorias, ha señalado que éstos se han conservado extensamente a lo largo de la evolución de los eucariontes (Kenyon, 1994; Palopoli y Patel, 1996). La flor es una innovación evolutiva probablemente homóloga con los estróbilos de los pinos, de manera que la presencia de la función del gen LFY en gimnospermas podría indicar que las redes regulatorias de genes, que determinan el desarrollo morfológico en ambos grupos de plantas, son probablemente homólogas. Sin embargo, sería necesario clonar el gen completo, comparar su secuencia con las de LFY y Floricaula (homólogo de LFY en *A. majus*) y hacer experimentos de hibridación *in situ* para conocer si este gen se expresa en plantas que no producen flores.

Nuestro resultado podría sugerir que un gen ortólogo a LEAFY existía ya en el ancestro de las plantas con semillas. Recientemente se ha señalado que los estróbilos femeninos de las coníferas son homólogos a las estructuras reproductivas de su grupo hermano interno, conformado por las Gnetales y Cordaitales (ya extinto). En los tres grupos las plantas presentan un vástago femenino corto, compuestos por óvulos distales y escamas estériles proximales. Estas últimas están sustentadas por brácteas, y cuando se agrupa el conjunto se tiene un órgano reproductivo más grande que podría ser homólogo a la placenta de la flor, en la cual las escamas formarían el integumento. En relación a los estambres, se considera que las flores de las Chloranthaceae representan los estados ancestrales de las estructuras masculinas de la flor. Aparentemente los estambres aparecieron a partir de una reducción progresiva de los ejes de las inflorescencias y las brácteas, originando un antión (antera ancestral) único, distal, o bien un par proximal ubicado por encima de la bráctea de una inflorescencia de segundo orden (Hickey y Taylor, 1996). En este contexto, es interesante señalar las similitudes entre las Chloranthaceae y las Gnetales, y la hipótesis de LeRoy (1983), quien consideraba que las estructuras reproductivas de Chloranthaceae y *Pinus* eran homólogas.

Lo anteriormente expuesto abre muchas interrogantes en relación a las diferencias en la morfología de las estructuras reproductivas entre gimnospermas y angiospermas. Si los genes asociados presentan una considerable similitud, ¿qué parte de las secuencias o cuáles son las interacciones que determinan las

diferencias morfológicas tan marcadas entre ambos linajes? ¿Se deberán algunas de las diferencias a regulación transcripcional, post-transcripcional o post-traduccional. En las plantas con flores LFY sólo se presenta una copia: ¿ocurrirá lo mismo en las gimnospermas, donde los procesos de duplicación de genes han sido más frecuentes?

Agradecimientos

Los autores agradecen a los doctores William H. Rottmann y Detlef Weigel el suministrar parte del material biológico utilizado en este trabajo, y a la ingeniero agrónomo Caroline Burgeff por su revisión al manuscrito final.

Literatura citada

- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. 1995. *Short protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons.
- Bernier G. 1988. The control of floral evocation and morphogenesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **39**:175-219.
- Bremer K. 1995. Summary of green plant phylogeny and classification. *Cladistic* **1**:369-385.
- Bryant J.A., Cuming A.C. 1993. Molecular control of development. En: Lea P.J., Leegood R.C., eds. *Plant biochemistry and molecular biology*. John Wiley & Sons, England, 312.
- Coen E.S. 1991. The role of homeotic genes in flower development and evolution. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42**:241-279.
- Coen E.S., Meyerowitz E.M. 1991. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* **353**:31-37.
- Coen E.S., Romero J.M., Doyle S., Elliot R, Murphy G., Carpenter R. 1990. Floricaula: A homeotic gene required for flower development in *Antirrhinum majus*. *Cell* **63**:1311-1322.
- Crane P.R., Friis E.M., Pedersen K.R. 1995. The origin and early diversification of angiosperms. *Nature* **374**:27-33.
- Feldmann K.A. 1991. T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: Mutational spectrum. *Plant Journal* **1**:71-82.
- Griffiths A.J.F., Miller J.H., Suzuki D.T., Lewontin R.C., Gelbart W.M. 1993. *An introduction to genetic analysis*. W. H. Freeman and Company. New York. 840.
- Halder G., Callaerts P., Gehring W. 1995. Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in *Drosophila*. *Science* **267**:1788-1792.
- Haughn G.W., Somerville C.R. 1988. Genetic control of morphogenesis in *Arabidopsis*. *Developmental Genetics* **9**:73-89.
- Kenyon C. 1994. If birds can fly, why can't we? Homeotic genes and evolution. *Cell* **78**:175-180.

- Landry B.S. 1993. DNA mapping in plants. En: Glick B.R., Thompson J.E., eds. *Methods in plant molecular biology*. CRS Press.
- Le Roy J.P. 1983. The origin of angiosperms: an unrecognized ancestral dicotyledon, *Hedyosmum* (Chloranthaceae), with a strobiloid flower is living today. *Taxon* **32**: 169-175.
- Palopoli M.F., Patel N.H. 1996. Neo-Darwinian developmental evolution: can we bridge the gap between pattern and process? *Current Opinion in Genetics and Development* **6**:502-508.
- Quiring R., Walldorf U., Kloter U., Gehring W. 1994. Homology of the eyeless gene of *Drosophila* to the small eye gene in mice and aniridia in humans. *Science* **256**:785-789.
- Robinson N.J., Shirsat A.H., Gatehouse J.A. 1993. Regulation of gene expression. En: Lea P.J., Leegood R.C., (eds.) *Plant biochemistry and Molecular Biology*. John Wiley & Sons, England, 312.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.
- Schwarz-Sommer Z., Hue I., Huijser P., Flor P., Hansen R., Tetens F., Lönning W.E., Saedler H., Sommer H. 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 Journal* **11**:251-263.
- Sommer H., Beltan J., Huijser P., Pape H., Lönning W.E., Saedler H., Schwarz-Sommer Z. 1990. *Deficiens*, a homeotic gene involved in the control of flower morphogenesis in *Antirrhinum majus*: The protein shows a homology to transcription factors. *EMBO Journal* **9**:605-613.
- Taylor D.W., Kirchner. 1996. The origin and evolution of the angiosperm carpel. En: Taylor D.W., Hickey L.J., eds. *Flowering plant origin, evolution and phylogeny*. Chapman and Hall, USA. 403.
- Van Tunen A.J., Busscher M., Columbo L., Franken J., Angenent G.C. 1994. Molecular control of floral organogenesis and plant reproduction in *Petunia hybrida*. En: Scott R.J., Stead A.D., (eds.) *Molecular and cellular aspects of plant reproduction*. Cambridge University Press, 315.
- Vásquez-Lobo A. 1996. Evolución de hongos endófitos del género *Pinus* L.: Implementación de técnicas moleculares y resultados preliminares. Tesis profesional. UNAM.
- Weigel D. 1995. The genetics of flower development: From floral induction to ovule morphogenesis. *Annual Review of Genetics* **29**:19-39.
- Weigel D., Alvarez J., Smyth D.R., Yanofsky M.F., Meyerowitz E.M. 1992. *LEAFY* controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell* **69**:843-859.
- Weigel D., Meyerowitz E.M. 1993. *LEAFY* controls meristem identity in *Arabidopsis thaliana*. En: Amasino R.M., (edr.) *Cellular Communications in Plants*. New York: Plenum Press.
- Weigel D., Meyerowitz E.M. 1994. The ABCs of floral homeotic genes. *Cell* **78**:203-209.
- Weigel D., Nilsson O. 1995. A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants. *Nature* **377**:495-500.
- Wray G.A. 1994. Developmental evolution -new paradigms and paradoxes. *Developmental Genetics* **15**:1-6.
- Yanofsky M.F. 1995. Floral meristem to floral organs: Genes controlling early events in *Arabidopsis* flower development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **46**:167-188.