



Paul Starsky Herrera Pola  
CINVESTAV del IPN



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE  
BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**“Estudio del Gen para una Cinasas Dependiente de Ciclina  
(CDK) Potencialmente Involucrado en el Desarrollo de Floema”**

**T E S I S**

Que presenta

**M. en C. PAUL STARKY HERRERA POLA**

Para obtener el grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA**

**Director de tesis: Dr. Roberto Ruiz Medrano.**

Ciudad de México

MARZO, 2017

**El presente trabajo de investigación se realizó dentro del departamento de biotecnología y bioingeniería en el laboratorio 24 de biología molecular de plantas perteneciente al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN unidad Zacatenco, bajo la dirección del Dr. Roberto Ruiz Medrano y con asesoría de la Dra. María Eugenia Hidalgo Lara, Dra. Beatriz Xoconostle Cázares, Dr. Rodolfo Marsch Moreno y el Dr. Ramón Gerardo Guevara González, durante el periodo comprendido de septiembre de 2010 a Septiembre 2014.**

**DEDICATORIA.**

A mi mama Olga Lidia Pola Solano. Por su doble esfuerzo que ha hecho por darnos estudios a mi hermano y a mí, siendo padre y madre al mismo tiempo. Además de siempre estar apoyándome en todas las situaciones que me he encontrado en la vida, sean buenas o malas.

## **AGRADECIMIENTOS.**

Al Dr. Roberto Ruiz Medrano por darme la oportunidad de ser parte de sus estudiantes de doctorado y brindarme la confianza de ofrecerme seguir sus investigaciones realizadas en el extranjero, así como compartir sus conocimientos adquiridos donde tuve la oportunidad de aprender de su amplia experiencia profesional.

A mis asesores; Dra. Beatriz Xoconostle Cázares, Dra. María Eugenia Hidalgo Lara, Dr. Rodolfo Marsch Moreno y el Dr. Ramón Gerardo Guevara González, por aceptar ser parte de mi comité tutorial y darme sus atinados comentarios así como motivación y consejos durante las investigaciones realizadas.

A Bety Altamirano por sus consejos y apoyo en las técnicas de tinción de GUS y cuidado de las plantas en invernadero entre otras cosas.

A Marco Luna Guido por sus comentarios no solo en el aspecto científico sino también de vida y estar siempre como un amigo para escucharme y brindarme consejos.

A mis compañeros de posgrado Valentín Galván, Angie Martínez, Roberto Toscano, Alejandra Agreda, Jorge, Brenda, Verónica, Francisco y Leonardo. Por compartir estos años de vida estudiantil, y asesorarme en técnicas así como consejos de diversas experiencias que pasamos en el laboratorio.

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, por brindarme la oportunidad de ser parte del alumnado de posgrado del plantel.

Al CONACYT por proporcionarme la beca (105985 y 156162) para realizar mis estudios de Doctorado.

## Contenido

INTRODUCCIÓN.....	13
ANTECEDENTES .....	17
JUSTIFICACIÓN.....	19
HIPÓTESIS .....	19
OBJETIVO GENERAL .....	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	20
MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
Crecimiento de plantas.....	24
Extracción y Purificación de Ácidos Nucleicos. ....	24
Extracción de DNA Plasmídico (Lisis alcalina) .....	25
Extracción y purificación de DNA plasmídico (con bromuro de etidio).....	26
Extracción de DNA en Plantas .....	27
Extracción de DNA Plasmídico y Genómico con Sistemas Comerciales y Equipos Qiagen. .....	28
Extracción de RNA .....	28
Extracción de RNA por medio de sistema Qiagen y uso del equipo QIACUBE (QIAGEN). .....	29
Electroforesis en gel de agarosa.....	29

Electroforesis de Gel virtual QIAxcel.....	31
Preparación de medios de cultivo LB y YEB .....	31
PCR Punto final. ....	33
Obtención de plásmidos recombinantes a partir de productos de PCR.....	36
Método de Hanahan o Choque térmico para transformar células competentes de <i>E. coli</i> ..	37
Transformación de bacterias por Electroporación. ....	38
Análisis por RT-PCR cuantitativo. ....	38
Síntesis de cDNA y LD-PCR.....	39
Transformación de Arabidopsis por Método de inmersión floral (Floral Dip). ....	41
Selección de líneas transgénicas .....	42
Transformación transitoria de Calabaza. ....	42
Hibridación <i>in situ</i> . ....	43
Tinción de GUS .....	44
Análisis de fluorescencia de GFP por microscopia confocal.....	44
Secuencia de nucleótidos del marco abierto de lectura de <i>CmCDKP</i> de calabaza (método de Sanger). ....	45
Construcción de árbol filogenético .....	46
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	47
Condiciones óptimas de crecimiento de calabaza, recolección de semillas y savia. ....	47
Generación de construcciones para análisis de promotor, silenciamiento y sobreexpresión de <i>CmCDKP</i> .....	51
Construcción de análisis de la región de promotor.....	51
Construcción para el silenciamiento de genes homologos a <i>CmCDKP</i> en arabidopsis ...	54
Obtención de la secuencia completa de <i>CmCDKP</i> .....	57
Clonación del marco de lectura de <i>CmCDKP</i> y sus homólogos en Arabidopsis en un vector para sobreexpresión .....	61

Resumen de las construcciones realizadas.....	63
Análisis de expresión de <i>CmCDKP</i> en diferentes tejidos de calabaza por qRT-PCR.....	64
Actividad del Promotor.....	67
Análisis histoquímico para identificar la actividad de GUS.....	67
Microscopía Confocal para análisis de la fusión <i>CmCDKP</i> -GFP en calabaza.....	68
.....	68
Hibridación <i>in situ</i> para detección del RNAm <i>CmCDKP</i> en calabaza.....	69
Análisis Filogenético de <i>CmCDKP</i> .....	69
CONCLUSIONES.....	72
EXPOSICIONES Y ARTICULOS.....	73
APÉNDICE A EXTRACCIÓN DE ACIDOS NUCLEICOS CON LA MARCA QIAGEN. .....	80
Bibliografía.....	92



## ÍNDICE DE FIGURAS.

FIGURA 1 TRANSPORTE SISTÉMICO DE DIVERSOS TIPOS DE RNA EN PLANTAS. TOMADO DE KEHR Y BUHTZ, 2008 .....	13
FIGURA 2 DESARROLLO DE FLOEMA EN CALABAZA ( <i>CUCURBITA MAXIMA</i> ). TOMADO DE ESAU, 1969.....	14
FIGURA 3 CICLO CELULAR Y SU REGULACIÓN. TOMADO DE NIEUWLAND <i>ET AL.</i> , 2009. ....	15
FIGURA 4 DIFERENTES FUNCIONES DE LAS CDKS EN DIFERENTES PROCESOS CELULARES .....	16
FIGURA 5 CORTE TRANSVERSAL EN PECÍOLO DE <i>C. MAXIMA</i> SILVESTRE HIBRIDADA CONTRA SONDA ANTISENTIDO DEL RNA RRD19.....	17
FIGURA 6 CORTE TRANSVERSAL EN PECÍOLO DE <i>C. MAXIMA</i> INFECTADA CON VIRUS DEL MOSAICO DE PEPINO (CMV) E HIBRIDADA CONTRA SONDA RRD19 ANTISENTIDO. ....	17
FIGURA 7 CORTE TRANSVERSAL EN ÁPICE DE <i>C. MAXIMA</i> SILVESTRE HIBRIDADA CONTRA UNA SONDA ANTISENTIDO RRD19. ....	18
FIGURA 8 MUTANTE NULA DE ARABIDOPSIS THALIANA EN EL GEN AT1G54610 .....	19
FIGURA 9 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA GLOBAL DE LA ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....	21
FIGURA 10 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL DE LAS CONSTRUCCIONES DE PROMOTOR, ORF Y SGPT .....	22
FIGURA 11 MAPA Y CARACTERÍSTICAS DEL VECTOR DE CLONACIÓN PCR8/GW/TOPO.....	22
FIGURA 12 VECTOR PROMOTOR PGWFS7.....	23
FIGURA 13 VECTOR DE SOBRE-EXPRESIÓN P7WG2D.....	23
FIGURA 14 VECTOR DE SILENCIAMIENTO P7GWIWG2 (II) .....	23
FIGURA 15 EQUIPO DE EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS QIACUBE.....	28
FIGURA 16 EQUIPO TISSULYSER .....	29
FIGURA 20 PLÁNTULAS DE CALABAZA DE 2 SEMANAS DE GERMINACIÓN .....	48
FIGURA 21 PLANTAS DE CALABAZA A UN MES DE CRECIMIENTO POST-GERMINACIÓN .....	48
FIGURA 22 PLANTAS DE CALABAZA A UN MES Y MEDIO POST-GERMINACIÓN .....	49
FIGURA 23 PLANTAS DE CALABAZA A UN MES Y TRES SEMANAS POST-GERMINACIÓN .....	49
FIGURA 24 PLANTAS DE CALABAZA CON DOS MESES Y MEDIO POST-GERMINACIÓN .....	50
FIGURA 25 FRUTO DE CALABAZA PARA OBTENCIÓN DE SEMILLAS SILVESTRES. ....	50
FIGURA 26 RECOLECCIÓN DE SAVIA DE FLOEMA DE CALABAZA. ....	51
FIGURA 27 PRODUCTO DE LA EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO .....	51
FIGURA 28 PRODUCTOS AMPLIFICADOS DE PCR PARA AMBOS PROMOTORES .....	51
FIGURA 29 PRODUCTO DE LA EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO DEL PROMOTOR A .....	52
FIGURA 30 PRODUCTO DE LA EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO DEL PROMOTOR B .....	52
FIGURA 31 FRAGMENTOS OBTENIDOS DEL CORTE CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN ECORV Y SAC I PARA EL PROMOTOR A .....	52
FIGURA 32 FRAGMENTOS OBTENIDOS DEL CORTE CON LA ENZIMA DE RESTRICCIÓN HINC II PARA EL PROMOTOR B.....	53

FIGURA 33 PRODUCTO DE LA EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO DEL VECTOR PROMOTOR A .....	53
FIGURA 34 PRODUCTO DE LA EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO DEL VECTOR PROMOTOR B .....	53
FIGURA 35 PRODUCTOS DE PCR COMPROBANDO FRAGMENTOS DE AMBOS PROMOTORES .....	54
FIGURA 37 DNA PLASMÍDICO DE VECTOR PCR8/GW/TOPO QUE CONTIENE EL FRAGMENTO DE SILENCIAMIENTO PARA ARABIDOPSIS .....	55
FIGURA 38 DNA PLASMÍDICO DE VECTOR PCR8/GW/TOPO QUE CONTIENE EL FRAGMENTO DE SILENCIAMIENTO PARA CALABAZA .....	55
FIGURA 39 PRODUCTOS AMPLIFICADOS DE PCR PARA COMPROBAR FRAGMENTO DE SILENCIAMIENTO .....	55
FIGURA 40 DNA PLASMÍDICO DEL VECTOR DE SILENCIAMIENTO EXTRAÍDO DE <i>AGROBACTERIUM</i> .....	56
FIGURA 41 PRODUCTOS AMPLIFICADOS DE PCR PARA COMPROBAR FRAGMENTOS DE SILENCIAMIENTO EN VECTOR DE SILENCIAMIENTO .....	56
FIGURA 43 ESTRATEGIA DE AMPLIFICACIÓN DE LOS EXTREMOS 5' Y 3' PARA OPTENCIÓN DE SECUENCIA COMPLETA CMCDKP .....	58
FIGURA 44 SECUENCIA COMPLETA REGISTRADA EN GENBANK .....	60
FIGURA 45 SECUENCIA COMPLETA TRADUCIDA DE CMCDKP .....	60
FIGURA 46 ESTRUCTURA 3D DE CMCDKP .....	61
FIGURA 47 EXTRACCIÓN DE RNA ARABIDOPSIS (A) Y CALABAZA (B) .....	61
FIGURA 48 PRODUCTO DE PCR EN GRADIENTE DE TEMPERATURA DEL ORF DE CDK DE ARABIDOPSIS A PARTIR DE CDNA .....	62
FIGURA 49 PRODUCTO DE PCR DEL ORF DE CDK DE CALABAZA A PARTIR DE CDNA ÚLTIMOS CARRILES 3 Y 4 BANDAS MÁS INTENSA .....	62
FIGURA 50 CORTE CON ECORV PARA COMPROBAR INSERTO DEL FRAGMENTO MÁS CERCANO AL 5' DEL ORF DE CALABAZA .....	62
FIGURA 51 CORTE CON ECORV PARA COMPROBAR INSERTO DEL FRAGMENTO MAS CERCANO AL 3' DEL ORF DE CALABAZA .....	63
FIGURA 53 PRODUCTO DE LA EXTRACCIÓN DE RNAS DE DIFERENTES TEJIDOS DE CALABAZA .....	64
FIGURA 54 ANÁLISIS CUANTITATIVO DE ACUMULACIÓN DE RNAM EN DIFERENTES TEJIDOS DE CALABAZA POR QRT-PCR .....	65
FIGURA 55 TRANSFORMACIÓN TRANSITORIA DE CALABAZA Y COMPROBACIÓN DEL TRANSGEN GFP .....	66
FIGURA 56 GEL VIRTUAL COMPROBANDO LOS TRANSGENES VIR, GFP Y BAR EN LAS PLANTAS TRANSFORMADAS .....	66
FIGURA 58 ESTOMAS DE PLANTAS DE CALABAZA TRANSFORMADAS CON VECTOR PROMOTOR DE AT1G54619 Y CONTROLES SILVESTRES .....	68
FIGURA 59 DETECCIÓN POR HIBRIDACIÓN IN SITU DEL RNAM DE CMCDKP EN SECCIONES TRANSVERSALES DE PECÍOLO (PARTE SUPERIOR) Y DE TALLO DE CALABAZA (PARTE INFERIOR) .....	69
FIGURA 60 ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE CMCDKP EN RELACIÓN CON OTRAS CDKS .....	70
FIGURA 61 ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE CMCDKP EN REALACIÓN CON CDKS DE PLANTAS .....	71

TABLA 1 RANGO DE SEPARACIÓN DE DNA CON RESPECTO A LA CONCENTRACIÓN DE AGAROSA EN EL GEL.	30
TABLA 2 CONCENTRACIÓN DE REACTIVOS PARA PREPARAR MEDIO LB	32
TABLA 3 CONCENTRACIÓN DE REACTIVOS PARA PREPARAR MEDIO YEB	33
TABLA 4 RESUMEN DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS USADOS PARA LAS CONSTRUCCIONES NECESARIAS.	34
TABLA 5 CONCENTRACIÓN DE REACTIVOS PARA REALIZAR UNA PCR	35
TABLA 6 MEZCLA DE REACCIÓN DE LAS DOS ETAPAS PARA SINTETIZAR CDNA.	40
TABLA 7 MEZCLA DE REACCIÓN PARA SINTETIZAR DNA POR LD-PCR	41
TABLA 8 CONSTRUCCIONES PARA EL VECTOR PROMOTOR, SILENCIAMIENTO Y DE SOBREENPRESIÓN.	63

## RESUMEN

Trabajos clásicos y evidencias más recientes sugieren que el floema distribuye señales que regulan diversos procesos en plantas, desde la inducción de la floración hasta la respuesta a patógenos (Ruiz-Medrano, Xoconostle-Cázares, & Lucas, 1999) (Chen & Kim, 2006) (Kehr & Buhtz, 2008). El floema es un conducto por el que se establece la comunicación entre tejidos distantes, pero es también un generador importante de señales distribuidas a otros tejidos. También se ha documentado la presencia de una gran variedad de proteínas en exudados de floema, algunas de las cuales están involucradas en el mantenimiento de los elementos cribosos y otras en señalización. Asimismo, diferentes especies de RNAs han sido aisladas de floema, tales como RNAs interferentes, microRNAs, segmentos de retroposones y, en particular, RNAs mensajeros (Lough & Lucas, 2006) (Kehr & Buhtz, 2008). Muchos de éstos codifican para proteínas que potencialmente pueden regular el ciclo celular. Un fragmento de éstos RNAs mensajeros, encontrado en savia de floema de calabaza, codifica una Cinasas Dependiente de Ciclina (CDK). Además localizamos este mensajero en floema durante diferentes etapas del desarrollo. Esto sugiere que dicha CDK puede estar potencialmente involucrada en el desarrollo y diferenciación de floema en plantas. A su vez esta CDK presenta una proteína con elevada semejanza en *Arabidopsis*, At1g54610. El patrón de expresión de este gen, así como el análisis de las mutantes silenciadas en los mismos, se llevó a cabo en la planta *Cucurbita maxima*, también se obtuvo la secuencia completa del fragmento de RNA mensajero encontrado en savia el cual denominamos CmCDKP. En la presente tesis, se darán a conocer los antecedentes encontrados en la literatura así como experimentos realizados previamente los cuales nos llevan a la justificación del proyecto, hipótesis, objetivo general y objetivos específicos. Posteriormente se detalla la estrategia experimental realizada, materiales y métodos utilizados en dicha estrategia así como los resultados obtenidos y sus conclusiones, estos resultados dieron pie para realizar exposiciones en congresos y publicación de artículos, por último se muestran las referencias citadas en el transcurso del proyecto.

## ABSTRACT

Classical works and recent evidence suggest that the phloem distributes signals that regulate diverse processes in plants, from flower induction to response to pathogens (Ruiz-Medrano et al., 2001) (Chen & Kim, 2006) (Kehr & Buhtz, 2008). The phloem is a conduit that establishes communication between distant tissues, and it also generates signals between these. The presence of a variety of proteins in phloem sap exudates has been reported, some of which may have a role in the maintenance of sieve elements and other in long-distance signaling. Also, different RNA species have been isolated from phloem exudates, such as small interfering RNAs, microRNAs, segments of retroposons mRNAs, and in particular, mRNAs (Lough & Lucas, 2006) (Kehr & Buhtz, 2008). Some code for potential cell cycle regulators. A fragment of one of these mRNAs, isolated from pumpkin phloem sap exudates, codes for a cyclin-dependent protein kinase (CDK). This mRNA accumulates in cambium and functional phloem in different developmental stages, suggesting a role in early phloem development for this gene. This shows elevated similarity to the At1g54610 gene from Arabidopsis. Expression pattern in different tissues was analyzed for this mRNA, termed *CmCDKP*. In the present work the complete sequence of *CmCDKP* mRNA is reported, as well as results from silencing this gene in pumpkin.

## INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años se ha demostrado que el ARNm, además de ser una copia de DNA para síntesis de proteínas, pueden ejercer una serie de importantes funciones reguladoras.

Actualmente se ha incrementado el acumulo de evidencias de que el transporte sistémico de diferentes clases de RNA a través del floema podría constituir una vía esencial para la comunicación de la planta (Lough & Lucas, 2006) (Kehr & Buhtz, 2008) (Fig.1).

En particular, la vía de transporte sistémico y no celular autónomo de ARNs específicos parece jugar un papel clave en la coordinación de importantes procesos fisiológicos, incluyendo: defensa contra virus, el silenciamiento de genes, la regulación del desarrollo, y la asignación de los nutrientes (Kehr & Buhtz, 2008).

Diferentes especies de ARN están presentes en las muestras de floema y esto, junto con estudios de injertos (Notaguchi, et al., 2009), Notaguchi y colaboradores sugieren que los ARNm, así como miRNAs, siRNAs y proteínas podrían estar implicados en una compleja red que transmite información.

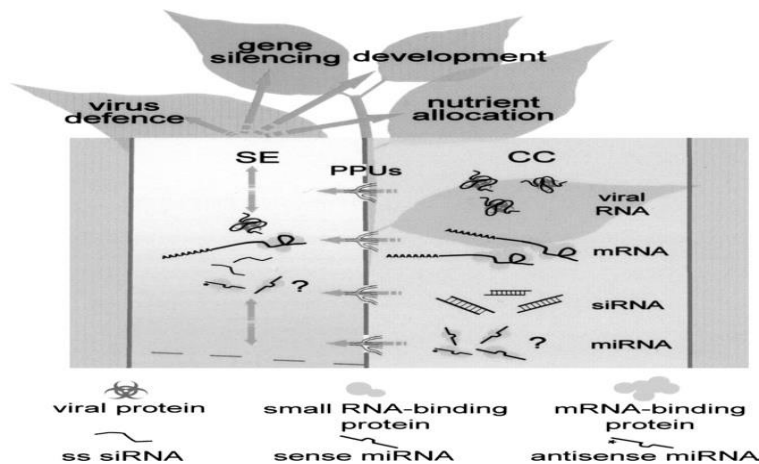


Figura 1 Transporte sistémico de diversos tipos de RNA en plantas. TOMADO DE KEHR Y BUHTZ, 2008

Esta comunicación a distancia permite que las plantas reaccionen de manera eficiente a los cambios en las condiciones de crecimiento, las presiones abióticas, o ataques de virus, y para coordinar estas reacciones con los recursos necesarios para el crecimiento y el desarrollo.

Una alta especificidad así como una estricta regulación de entrada y salida del floema son esenciales (Chen & Kim, 2006), dado los efectos fisiológicos diversos e importantes que los transcritos transportados podrían ejercer. Por lo tanto, el principal futuro reto será comprender los mecanismos de importación y transporte del RNA e identificar los desencadenantes internos y externos que inducen señales sistémicas de RNA en el floema.

El floema consta en su madurez de dos tipos celulares, la célula acompañante y el elemento criboso, interconectadas por plasmodesmos (Figura 2). Mientras que la estructura de la célula acompañante se mantiene intacta y con actividad metabólica normal, el elemento criboso en su madurez pierde el núcleo y casi todos sus organelos, y las divisiones con los vecinos anticlinales se transforman en placas cribosas que permiten el libre movimiento de moléculas de hasta 50 kDa.

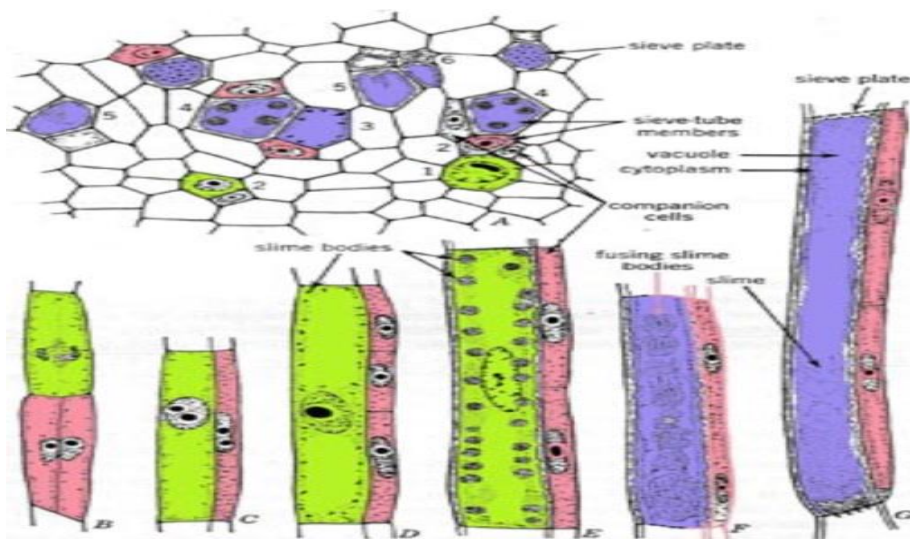


Figura 2 Desarrollo de floema en calabaza (*Cucurbita maxima*). Tomado de Esau, 1969.

Durante el desarrollo del floema, tanto la diferenciación como la proliferación celular están reguladas por Cinasas Dependientes de Ciclinas (CDK), las cuales son las encargadas de permitir el paso entre etapas a lo largo del ciclo celular (Nieuwland, et al., 2009) (Van Montagu, & Inzé, 1999) (Wang, et al., 2004).

El ciclo celular (Fig. 3) es una secuencia ordenada de eventos que conducen a la replicación del ADN y, en los ciclos de mitosis, la división posterior (citocinesis). El ciclo celular mitótico se divide en cuatro fases, la fase de intervalo 1 (G1), fase de síntesis de DNA (S), fase de intervalo 2 (G2) y mitosis (M) (Berckmans & De Veylder, 2009). En muchos tejidos en diferenciación de la planta, un ciclo celular alternativo conocido como el endociclo, se puede producir la participación de la fase S sin la mitosis o división posterior, de tal manera que las rondas del endociclo consisten en fases S y Gap (G) repetidas (Mironov & Inzé, 1999).

Endociclos repetidos en algunos tipos de células, tales como los tricomas de Arabidopsis, dan lugar a núcleos con contenido de ADN 32C o más, en relación con el diploide 2C (Boudolf, et al., 2004). A pesar de esos aumentos de ploidía se producen en determinados tipos de células animales, que parecen ser un fenómeno mucho más general en las plantas.

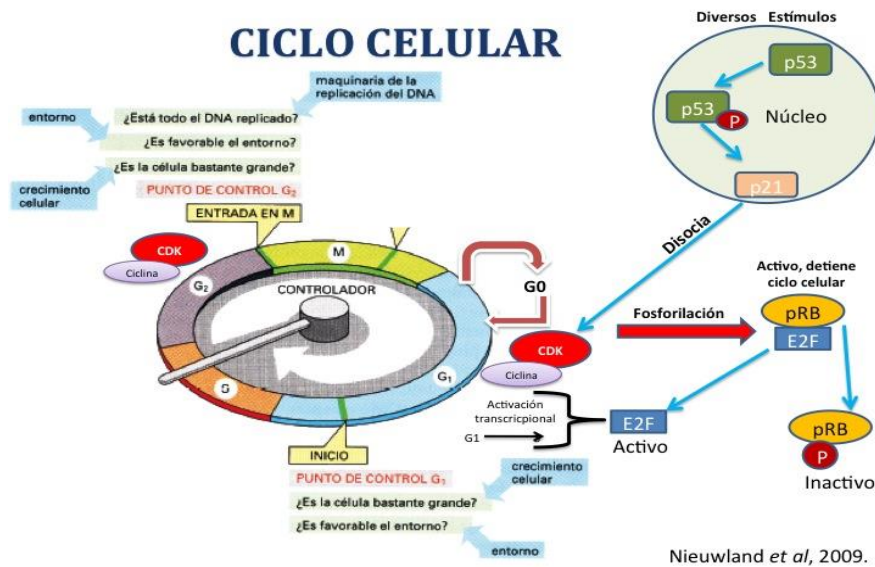


Figura 3 Ciclo celular y su regulación. Tomado de Nieuwland *et al.*, 2009.

Los puntos de control principales de la progresión del ciclo celular mitótico se llevan a cabo en las transiciones de G1-S y G2-M. En general se acepta que una vez que un punto de control es rebasado, se compromete a la síntesis del ADN o la mitosis, respectivamente; a



pesar de rigurosas pruebas esto no se ha demostrado en las células vegetales (Menges, et al., 2005).

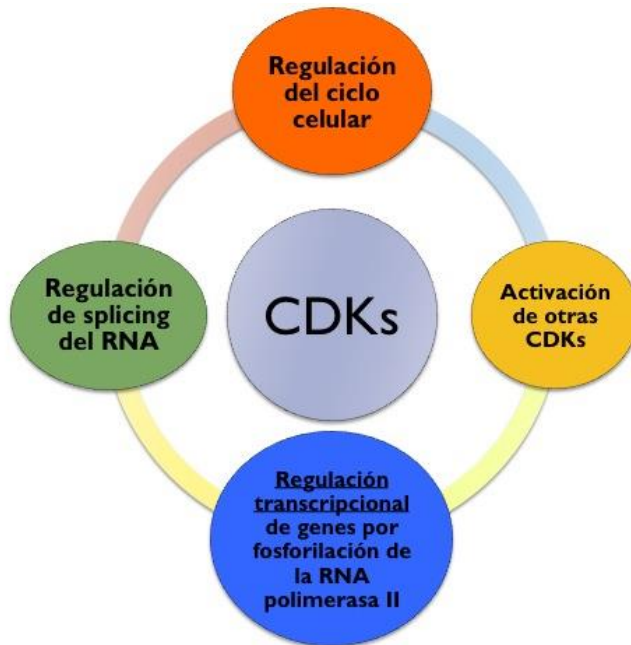


Figura 4 Diferentes funciones de las CDKs en diferentes procesos celulares

En la transición G1-S, complejos activos de CDK/ciclina (ciclina cuyo componente es principalmente de las ciclinas de tipo D) fosforilan a la proteína relacionada al Rb (RBR), que, a diferencia de las ciclinas, es codificada por un gen único en Arabidopsis. Como todos los organismos eucariontes superiores, las plantas contienen los miembros de la familia E2F y DP de los reguladores de la transcripción que se heterodimerizan para controlar la expresión de los factores intermedios necesarios para el inicio de la fase S y la evolución posterior del ciclo celular (Berckmans & De Veylder, 2009). Dado que la actividad de los complejos E2F/DP es suprimida por la unión de RBR en una forma no fosforilada, la activación de la ciclina tipo D/CDK ocurre a través de una mayor expresión de ciclina tipo D y niveles reducidos de proteínas KRP/SIM conducen a la fosforilación de RBR, la activación de E2F/DP y la entrada en fase S (Fig. 4).

## ANTECEDENTES

En nuestro grupo de trabajo se han descrito diversos RNAs mensajeros (RNAm) presentes en la savia de floema de calabaza, los cuales se inducen durante la infección por virus. (Ruiz-Medrano, et al., 2007). Mediante hibridación *in situ* se detectó un RNAm en peciolo de calabaza silvestre (Fig. 5) y calabaza infectada por el virus del mosaico del pepino (Fig. 6) correspondiente a una cinasa dependiente de ciclina (CDK-L). Este transcrito se encontró acumulado ambas plantas, sin embargo, en la planta infectada por el virus se pudo observar un incremento en los niveles de acumulación de este en los elementos cribosos, por lo que se sugiere la posibilidad de que su expresión esté inducida por virus.

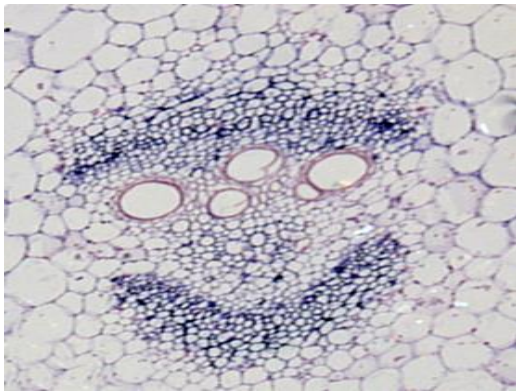


Figura 5 Corte transversal en peciolo de *C. maxima* silvestre hibridada contra sonda antisentido del RNA RRd19

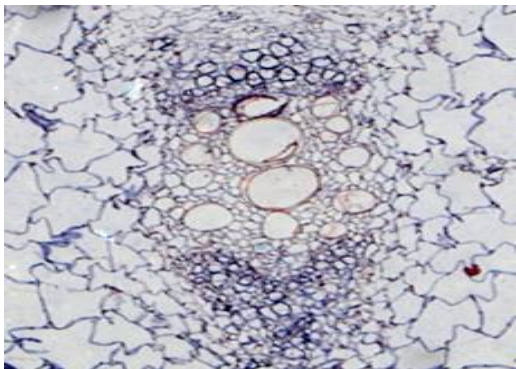


Figura 6 Corte transversal en peciolo de *C. maxima* infectada con virus del mosaico de pepino (CMV) e hibridada contra sonda RRd19 antisentido.

Este ARNm también se encontró acumulado en floema de ápice de calabaza durante etapas muy tempranas de su desarrollo, e incluso en células que aparentemente se diferencian en meristemos apicales (Fig. 7).

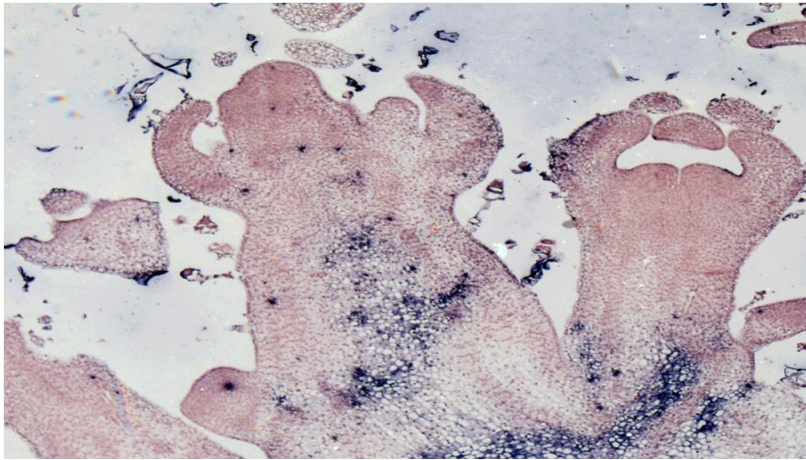


Figura 7 Corte transversal en ápice de *C. maxima* silvestre hibridada contra una sonda antisentido RRd19.

Consideramos que este gen podría estar involucrado en el desarrollo temprano del floema, un evento que estaría siendo aprovechado por virus para favorecer su propagación a través de la planta. El objetivo del presente trabajo es el análisis de la expresión y del fenotipo de mutantes de Arabidopsis en este gen, considerando la gran conservación que existe entre el gen de calabaza y el posible ortólogo en Arabidopsis. Por lo anterior, se realizó un blast para determinar cuáles genes tienen mayor homología en Arabidopsis con el correspondiente de calabaza, siendo los tres genes con mayor homología en orden decreciente los correspondientes al número de acceso At1g54610, At1g53050 y At5g50860. Además se obtuvo la mutante de Arabidopsis inactiva del gen At1g54610 (fig. 8) y se identificó esta como letal para la planta, provocando una necrosis generalizada al día 21 después de la germinación, lo cual sugiere que este gen codifica para una cinasa dependiente de ciclina esencial para el posterior desarrollo de la planta.



Figura 8 Mutante nula de *Arabidopsis thaliana* en el gen At1g54610

## JUSTIFICACIÓN

El análisis del transporte de RNAm y proteínas a larga distancia a través del floema, utilizando diferentes herramientas (fisiológicas, bioquímicas, moleculares y genéticas), contribuirá a entender de manera precisa su papel en el ciclo celular y/o en la diferenciación.

El estudio de esta cinasa dependiente de ciclina nos permitirá conocer su papel en el desarrollo del floema.

## HIPÓTESIS

Una cinasa dependiente de ciclina, cuyo RNAm se encuentra en savia de floema, está involucrada en el desarrollo de este tejido.

## OBJETIVO GENERAL

Estudiar el papel de una cinasa dependiente de ciclina (CDK) en el desarrollo del floema, usando como modelos a Calabaza (*Cucurbita maxima*) y *Arabidopsis thaliana*.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A. Analizar la expresión del gen **en** Calabaza
- B. Analizar la función del **gen** en Calabaza inactivando ambos genes por silenciamiento génico postranscripcional.
- C. Determinar la capacidad de transporte intercelular y a larga distancia del RNA.

**Comentado [a1]:** Poner el nombre del gen o número de acceso

**Comentado [a2]:** Lo mismo

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Se analizará la función del gen *CmCDKP* encontrado en calabaza (*Cucurbita maxima*) así como de sus homólogos en *Arabidopsis* (Figura 9), para esto se analizarán los cambios en los fenotipos en plantas en donde estos genes CDKP estén silenciados o sobreexpresados. Las diferencias fenotípicas que presenten nos proporcionarán una guía para sugerir la funcionalidad de los productos de dichos genes. También se analizará la expresión de estos genes en ambas plantas modelo, para lo cual se realizará hibridación *in situ* y se analizarán los promotores homólogos de calabaza al gen At1g54610.

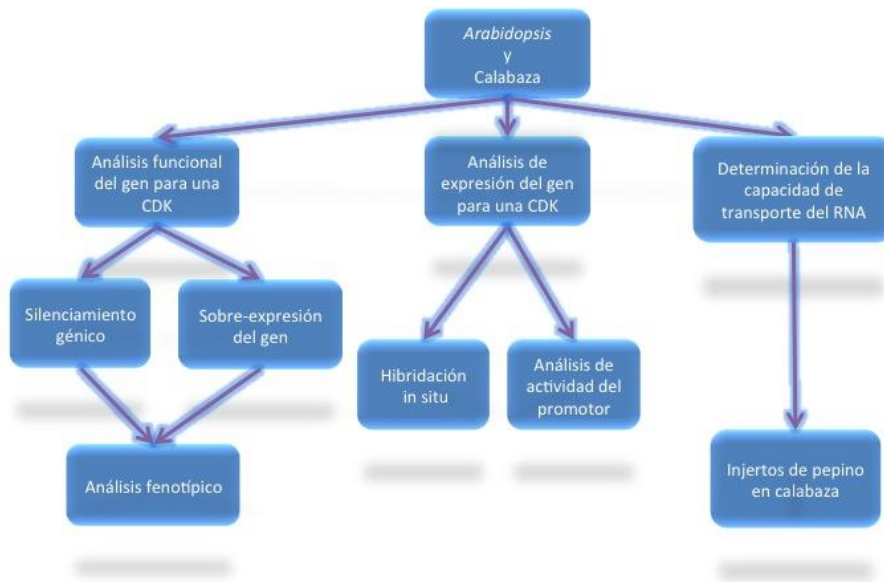


Figura 9 Representación esquemática global de la estrategia experimental

Para la elaboración de las construcciones empleadas para la generación de las plantas silenciadas, sobre-expresoras y de análisis de promotores homólogos en *Arabidopsis*, primero se extrajo DNA genómico y RNA total (para el caso de sobre-expresión), se amplificó la región específica para cada construcción por medio de PCR y cDNA con LD-PCR (en el caso de sobre-expresión), los productos amplificados se ligaron al vector de clonación pCR8/GW/TOPO (Fig. 11), y se introdujeron los plásmidos en *E. coli* (por choque térmico) para así obtener clonas con dicho plásmido conteniendo el fragmento de interés. Posteriormente se extrajo el DNA plasmídico y se comprobó la presencia del inserto deseado, para posteriormente sub-clonar el fragmento de interés en los vectores de sobre-expresión, de silenciamiento y de análisis del promotor (p7WG2D , p7GWIWG2 y pGWFS7 respectivamente). Por último estas construcciones fueron introducidas en *Agrobacterium tumefaciens* el cual sirvió como vehículo para la introducción de las construcciones de interés para así finalmente transformar genéticamente a las plantas de *Arabidopsis* y *C. maxima*.

Se analizaron las plantas transformadas mediante PCR punto final para detectar a los transgenes y a través de microscopia confocal y análisis histoquímicos de tinción de GUS

para la detección de la presencia de CDK fusionada a GFP y determinación del patrón de actividad del promotor.

**Comentado [a3]:** No puedes hablar de un análisis fenotípico si estas haciendo estudios moleculares y de microscopía. Es mejor quitar "los fenotipos"

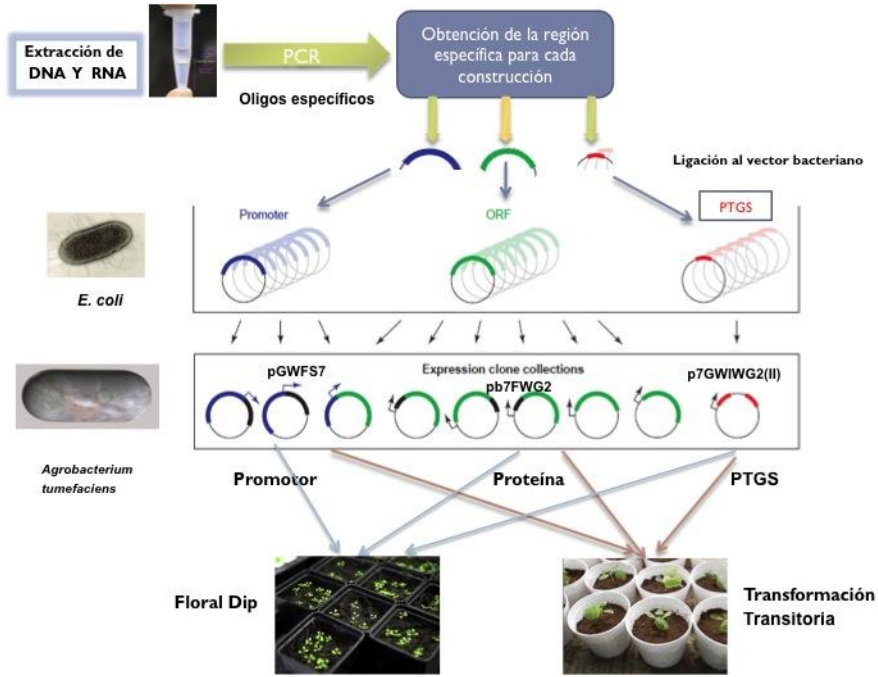


Figura 10 Estrategia experimental de las construcciones de Promotor, ORF y SGPT

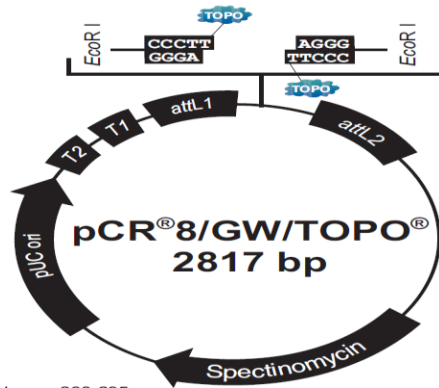


Figura 11 Mapa y características del vector de clonación pCR8/GW/TOPO



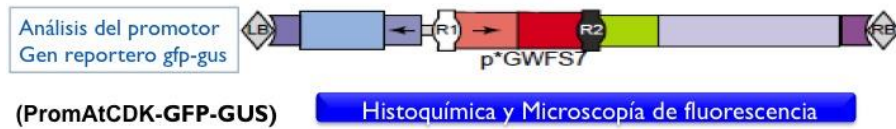


Figura 12 Vector promotor pGWFS7

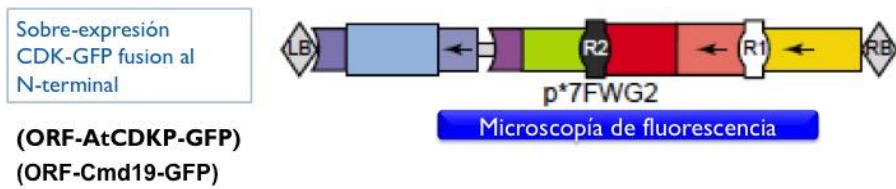


Figura 13 Vector de sobre-expresión p7WG2D

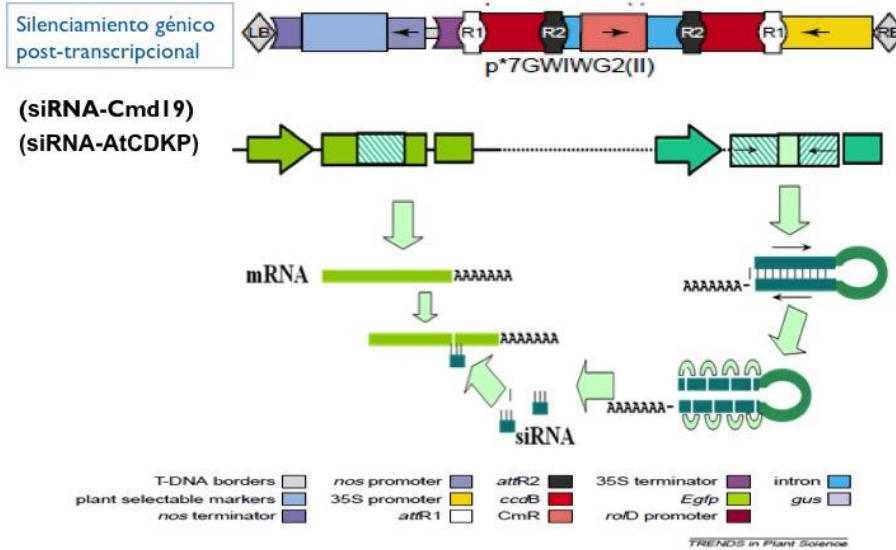


Figura 14 Vector de silenciamiento p7GWIWG2 (II)



## MATERIALES Y MÉTODOS.

### Crecimiento de plantas

Se germinaron semillas de *C. maxima* (calabaza) en germinadores que contenían suelo húmedo al 100% de saturación y se mantuvieron en condiciones controladas en invernadero durante 5 días. Tres días posteriores a su germinación, las plántulas silvestres y/o tratadas se colocaron en macetas sobre un suelo adecuado para su crecimiento (franco-arenoso) que contiene una mezcla de 45% de suelo, 35% de turba y 20 % de agrolita. Estas fueron regadas cada tercer día y además se agregó solución nutritiva de la marca Miracle-Gro cada 6 días.

Para el crecimiento de *Arabidopsis* se realizó de una manera similar a calabaza. Se hizo una mezcla de suelo con 40% tierra, 40% turba y 20% de agrolita, se saturó con agua y se colocó dentro de macetas especiales para *Arabidopsis*, sobre la superficie del suelo se colocaron semillas con agarosa al 0.1 %. Posteriormente las macetas se cubrieron con plástico transparente y se germinaron en invernadero hasta la aparición de plántulas para ser regadas con solución nutritiva de la marca Miracle-Gro cada tercer día.

Las plantas silvestres son necesarias para su transformación por lo métodos de “floral dip” (inmersión floral) y transformación transitoria para *Arabidopsis* y calabaza, respectivamente, con el fin de ser analizadas y estudiadas. También se utilizaron para extracción de su DNA genómico, el cual nos sirve para manipularlas genéticamente, amplificando los genes de interés para cada construcción requerida en la estrategia experimental.

### Extracción y Purificación de Ácidos Nucleicos.

Principalmente se extrajo y purificó DNA (genómico y plasmídico) de plantas y bacterias; para bacterias se utilizó la técnica de lisis alcalina con SDS así como el protocolo de extracción de QIAGEN y haciendo uso del equipo QIACube; otra técnica utilizada fue con bromuro de etidio, protocolo usado en nuestro laboratorio, y la tercera técnica fue para extracción de DNA en plantas, técnica modificada de miniprep (Doyle, et al., 1987). A continuación se detallan los pasos realizados en cada una de las técnicas.

**Comentado [a4]:** Poner referencia

**Comentado [a5]:** Colocar el nombre completo del kit y compañía

## **Extracción de DNA Plasmídico (Lisis alcalina)**

Extracción y purificación de DNA plasmídico por lisis alcalina con SDS

1. Se inoculó 2 ml de medio rico (LB, o YEB; ver preparación de medios) que contenía el antibiótico apropiado con una sola colonia de las bacterias transformadas. Se incubó el cultivo por 16h a 37°C con agitación vigorosa.
2. Se tomó 1,5 ml del cultivo y se agregó en un tubo de microcentrífuga. Se centrifugó a velocidad máxima durante 60 segundos a 4 ° C en una microcentrífuga.
3. el medió se eliminó por vertido, dejando el sedimento bacteriano tan seco como sea posible, esto se puede hacer eliminando por absorción con micropiteta para 1 µl el resto que quede de medio.
4. El sedimento bacteriano fue re-suspendido en 100 ♥ de solución de lisis alcalina I enfriada con hielo y se agitó vigorosamente.
5. 200 µl de solución de lisis alcalina II (recién preparada) fue añadida a cada suspensión bacteriana. Se tapó y mezcló el contenido invirtiendo el tubo rápidamente cinco veces. No por vortex! dejando reposar el tubo en hielo.
6. Se añadió 150 µl de solución de lisis alcalina III enfriado con hielo. Se cerró el tubo y dispersó en solución de lisis alcalina III a través del lisado bacteriano viscoso invirtiendo el tubo varias veces e incubando el tubo en hielo durante 3-5 minutos.
7. se centrifugó el lisado bacteriano a velocidad máxima durante 5 minutos a 4°C en una microcentrífuga y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo.
8. se añadió un volumen igual de fenol: cloroformo. las fases orgánica y acuosa, se mezclaron mediante agitación con vortex y centrifugó la emulsión a la velocidad máxima durante 2 minutos a 4°C en una microcentrífuga. Se transfirió la fase superior acuosa a un tubo nuevo.
9. Se precipitaron los ácidos nucleicos desde el sobrenadante mediante la adición de 2 volúmenes de etanol a temperatura ambiente. Se mezcló la solución por agitación y se dejó reposar la mezcla durante 2 minutos a temperatura ambiente.

10. ácidos nucleicos precipitados, se recogieron por centrifugación a velocidad máxima durante 5 minutos a 4°C en una microcentrífuga.

11. el sobrenadante se eliminó por vertido y se mantuvo el tubo en posición invertida sobre una toalla de papel para permitir que todo el líquido se escurra o usar puntas de micropipeta y quitar cualquier gotas de fluido que quede adherido en las paredes del tubo, como se describe en el paso 3.

12. se añadió 1 ml de etanol al 70% al sedimento y se invirtió el tubo cerrado varias veces. El ADN se recupero por centrifugación a la velocidad máxima durante 2 minutos a 4°C en una microcentrífuga.

13. Se eliminó todo el sobrenadante por vertido o usando una micropipeta como se describe en el paso 3. Se tuvo cuidado en este paso, ya que el sedimento a veces no se adhiere firmemente al tubo.

14. se eliminó el etanol residual del tubo y se dejó reposar el tubo abierto a temperatura ambiente hasta que el etanol se evaporó y el fluido no es visible en el tubo (aproximadamente 5-10 minutos). Opcionalmente también se incubó a 50 °C para evaporar todo el etanol posible.

15. Por último se disolvieron los ácidos nucleicos en 50 µl de TE (pH 8,0) o agua bidestilada estéril. Se agitó la solución suavemente durante unos segundos y almaceno a 2-20 ° C.

### **Extracción y purificación de DNA plasmídico (con bromuro de etidio)**

1. De 250 ml de cultivo LB empastillar a 3000 rpm 10 min
2. Agregar 3 ml de solución 1 (lisis alcalina)
3. Agregar 6 ml de solución 2 (NaOH/ SDS)
4. Agregar 4.5 ml de solución 3
5. Dejar en hielo 10-15 min.
6. Centrifugar 10-15 seg a 10000rpm.
7. Pasar el sobrenadante a otro tubo (filtrándolo con servilleta)
8. Precipitar con isopropanol 0.6 Vol. (9ml ) (Congelar 2 a 3 horas a -20 o -80°C)
9. Centrifugar 15 min a 10000 rpm
10. Secar la pastilla 5-10 min

11. Resuspender la pastilla en 500ul de agua y pasar a tubo eppendorff
12. Agregar 2-4 µl de bromuro de etidio y 55 l de acetato de sodio 3M pH5.2
13. Fenolizar 3 veces (fenol: cloroformo : alcohol isoamilico)
14. Precipitación con 2 volúmenes de etanol absoluto
15. Centrifugar 20' a 4°C
16. Lavar 3 veces la pastilla con etanol al 70% con H2O bidestilada desionizada estéril
17. Resuspender en 30- 50 µl de agua bidestilada desionizada estéril

### Extracción de DNA en Plantas

Para la extracción de ADN en plantas hemos usado con éxito los siguientes protocolos, que son modificados del protocolo original conocido como miniprep (Doyle, et al., 1987).

El protocolo se realizó como se detalla a continuación:

1. En un mortero se maceró alrededor de 1 g de tejido con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino.
2. a este polvo se agregó 1 ml de amortiguador CTAB 2X y seguir moliendo. Recuperar en un microtubo de 1.5 ml.
3. se centrifugó a 8 000 x g durante 10 min. a 4°C.
4. el sobrenadante se eliminó y resuspendió con 600 µl de CTAB 2X.
5. el resuspendido se incubó a 60°C durante 10 min y se agregó 600 µl de fenol:cloroformo:etanol agitar hasta homogeneizar, .
7. una vez homogenizado se centrifugó a 5 000 x g durante 12 min. a 4°C (hasta que el sobrenadante quedó transparente).
8. Se trasladó el sobrenadante a un nuevo tubo, cuidando de no tomar la interface una vez trasladado se agregó 2/3 del volumen final de isopropanol frío para precipitar el ADN y se dejó reposar durante toda la noche a -20°C
11. al siguiente día se centrifugó a 8000 x g durante 5 min a 4°C. Eliminando perfectamente el sobrenadante.
12. el ADN se limpió agregando 1 ml de etanol 70% frío y centrifugando a 7,000 x g durante 5 min. Se eliminó el sobrenadante y dejó un rato secar a temperatura ambiente o 50°C para evaporizar el etanol restante.
14. por último se re-suspendió con 100 µl de agua libre de DNAsa y almacenó a -20°C para su uso posterior.

**Comentado [a6]:** Manejar el mismo tiempo en todos los protocolos .En los anteriores protocolos lo cambie a tercera persona, pero me parece que esta bien que lo dejes en pasado.

## **Extracción de DNA Plasmídico y Genómico con Sistemas Comerciales y Equipos Qiagen.**

El principio fisicoquímico es muy similar a la extracción de DNA manual. Sin embargo, haciendo uso de sistemas comerciales y equipos especializados se asegura una mejor reproducibilidad de resultados así como una menor manipulación, mejorando así la limpieza y descartando contaminaciones cruzadas lo que impacta fuertemente en una mayor purificación del producto y brinda resultados reproducibles. Debido a que en la gran mayoría de las instituciones gubernamentales no se tienen áreas blancas adecuadas para realizar este tipo de operaciones, ni se llevan a cabo buenas prácticas de laboratorio, ni tampoco existe normatividad alguna que regule a los laboratorios nacionales, optamos por ocupar estos sistemas y equipos de la marca Qiagen los cuales nos han brindado mejores resultados. Para llevar a cabo extracción de DNA se utilizan los protocolos proporcionados, solo modificando el último paso, en el cual en lugar de agregar el amortiguador del sistema comercial agregamos agua bidestilada desionizada y estéril para resuspender el DNA de interés. Los protocolos de extracción y pasos detallados para realizar la extracción de DNA así como uso del equipo Qiagen, se muestran en el apéndice A.



Figura 15 equipo de extracción de ácidos nucleicos QIAcube

## **Extracción de RNA**

La extracción de RNA se llevó a cabo por la técnica de (Logemann, *et al.* 1987). En esta técnica se toman 100 mg de tejido en un tubo eppendorff y se homogeneiza en un tampón que contiene hidrocloreuro de guanidina 8M, 20 mM MES y 20 mM EDTA, seguido por

extracción directa con 1 volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (24:24:1). El RNA se precipita de la fase acuosa, se lava con acetato de sodio 3 M pH 5.2, y 70% de etanol, y finalmente se disuelve en agua bidestilada desionizada estéril libre de RNasa. El rendimiento de RNA es de hasta 500 mg/g de tejido.

### **Extracción de RNA por medio de sistema Qiagen y uso del equipo QIACUBE (QIAGEN).**

La extracción de DNA se llevó a cabo haciendo uso del kit RNAeasy mini Kit y los equipos TissuLyser LT y QIACube para triturar tejido de plantas y extracción de RNA, respectivamente. Los protocolos de extracción y pasos detallados para realizar la extracción de RNA al igual que el de DNA así como uso del equipo QIAGEN y TissuLyser, se muestran en el apéndice A.



Figura 16 equipo TissuLyser

### **Electroforesis en gel de agarosa.**

Los productos amplificados de PCR se visualizaron por medio de electroforesis en gel de agarosa o en algunos casos por electroforesis virtual con el equipo QIAxcel. A continuación se enlistan los pasos a seguir para electroforesis y visualización, en un transiluminador, de los amplicones de interés.

1. Primero se sellaron los bordes de una placa de plástico tipo plexiglas limpio y seco con cinta (o los extremos abiertos de la bandeja de plástico que se suministran con el aparato de electroforesis) con cinta para formar un molde.

2. Preparar suficiente tampón de electroforesis (por lo general TAE 1X o 0,5X TBE) para llenar el tanque de electroforesis y cubrir el gel. Es importante utilizar el mismo lote de tampón de electroforesis, tanto en el tanque de electroforesis y el gel.

3. Se preparó una solución de agarosa en un tampón de electroforesis a una concentración adecuada para la separación de los fragmentos de tamaño particulares previstos en la muestra (s) de ADN: Añadir la cantidad correcta de agarosa en polvo (consulte la tabla siguiente) a una cantidad medida de tampón de electroforesis en un matraz Erlenmeyer o una botella de vidrio. Gama de separación de células que contienen diferentes cantidades de estándar de baja EEO agarosa.

**Comentado [a7]:** Lo mismo que te comente en el anterior protocolo: o pones "preparar" o "se preparó", pero hay que homogenizar los tiempos en que redactas los protocolos.

Concentración de agarosa en gel (% peso/volumen)	Rango de separación de molécula de DNA lineal (Kb)
0.3	5-60
0.6	1-20
0.7	0.8-10
0.9	0.5-7
1.2	0.4-6
1.5	0-2-3
2.0	0.1-2

Tabla 1 Rango de separación de DNA con respecto a la concentración de agarosa en el gel.

4. se funde la agarosa en microondas y cuando la temperatura es menor a 55 ° C se añade bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 mg / ml. Se mezcló la solución de gel a fondo por agitación suave y se vierte en molde con peine adecuado.

5. se cargan las muestras de DNA en el gel después de mezclarse con azul de bromofenol y xileno cianol FF y se aplica una tensión de 1-5 V/cm. El gel es colocado directamente sobre un transiluminador para visualizar los productos de PCR.

### **Electroforesis de Gel virtual QIAxcel**

Para comprobar la presencia de transgenes en plantas transformadas se extrajo DNA genómico de éstas, se amplificaron tanto un fragmento del gen *virG* de *A. tumefaciens*, así como del gen *bar* (gen marcador de resistencia a herbicida) y el de GFP. Los productos amplificados se detectaron por medio de un gel virtual haciendo uso del equipo QIAxcel (Figura 17) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.



Figura 17 equipo de electroforesis en gel virtual QIAxcel

### **Preparación de medios de cultivo LB y YEB**

Para el crecimiento de las bacterias que contienen los plásmidos recombinantes, es necesario usar un medio adecuado que contenga el antibiótico idóneo para cada vector de interés. En el



caso de *E. coli* el medio utilizado principalmente fue LB y dependiendo de la resistencia fue el antibiótico que se le agregó al medio.

Medio LB 500ml	
Reactivos	gramos
Peptona de Caseína	5
Extracto de Levadura	2.5
NaCl	5
agar	10
Agua destilada	aforar a 500ml
Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos.	

Tabla 2 Concentración de reactivos para preparar medio LB

Para crecer *Agrobacterium tumefaciens* se utilizó principalmente medio YEB de igual forma que con *E. coli* con el antibiótico adecuado dependiendo la resistencia que lo confiera el plásmido introducido por choque térmico. A continuación se muestran dos tablas conteniendo los reactivos y cantidades necesarias en gramos para preparar 500 mililitros de ambos medios.

Medio YEB 500ml	
Reactivos	gramos
Sacarosa	2.5
Peptona de Caseína	2.5
Extracto de Carne	2.5
Extracto de Levadura	0.5
Agar	10
Agua destilada	aforar a 500ml
Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos.	

Tabla 3 Concentración de reactivos para preparar medio YEB

### PCR Punto final.

La técnica de PCR o reacción en cadena de la polimerasa, fue usada para amplificar genes de interés y también comprobar éstos en bacterias o plantas transformadas. Dependiendo del gen de interés se ocuparon oligonucleótidos específicos y ciclos de tiempo y temperatura correspondientes a cada uno (Fig. 18). Los diversos oligonucleótidos utilizados para cada construcción así como los ciclos de tiempo y temperatura se resumen en la tabla 4, mientras que las mezclas de reacción usadas para esta técnica se muestran en la tabla 5.

Numeración	Descripción de Oligonucleótido	Secuencia
1	Protomotor A Directo ( AtCmd19APro5)	GTTCTCTCTTCGACAAAACGTGCATAAGC
2	Promotor A Reverso (AtCmd19APro3')	CATCGGCTAAATGATTTTGAATCGGTGAA
3	Promotor B Directo (AtCmd19BPro5')	CAACAATTACAATATGTTTCACTATTGAC
4	Promotor B Reverso (AtCmd19BPro5')	ACCCATAACTTAAATCTCAATCTAAGCTT
5	ORF At1g54610 Directo WT	ATGGGTTGTGTATTTGGCCGAGAGGCGCG G
6	ORF Directo At1g54610	ATGGGTTGTGTATTTGGCCGAGAGGCG
7	ORF Directo At1g54610 Stop	TGAATGGGTTGTGTATTTGGCCGAGAGGCG GGCG
8	ORF Reverso At1g54610	GGCCACTACTGCTCTCTTTCCTTACT
9	At1g54610 5'UTR FOR	5'-seeQC Sheet
10	At1g54610 3'UTR REV	AATAGCAACAAAAGAAGTAGTGATATAT AATAA
11	RRd19-3At	TATACATGAAGTAGTAAACACTTTCTCTT
12	RRd19-5At	GGTAGA

Tabla 4 Resumen de los oligonucleótidos usados para las construcciones necesarias.

Mezcla de reacción para PCR	
Reactivos	ul de reacción
Amortiguador de reacción (10X)	2.5
dNTPs (2.5mM)	1.1
Oligonucleótido 5´	0.3
Oligonucleótido 3´	0.3
Takara	0.1
H2O	12.5
DNA	1.0

Tabla 5 Concentración de reactivos para realizar una PCR

#### Ciclos de Temperaturas de PCR

95°C 5 min

ciclo de 35 repeticiones de

95°C 35 seg

61 °C 40 seg

72°C 1 min.

Posterior a los ciclos 72°C 7 minutos

Por último pausar a 5°C

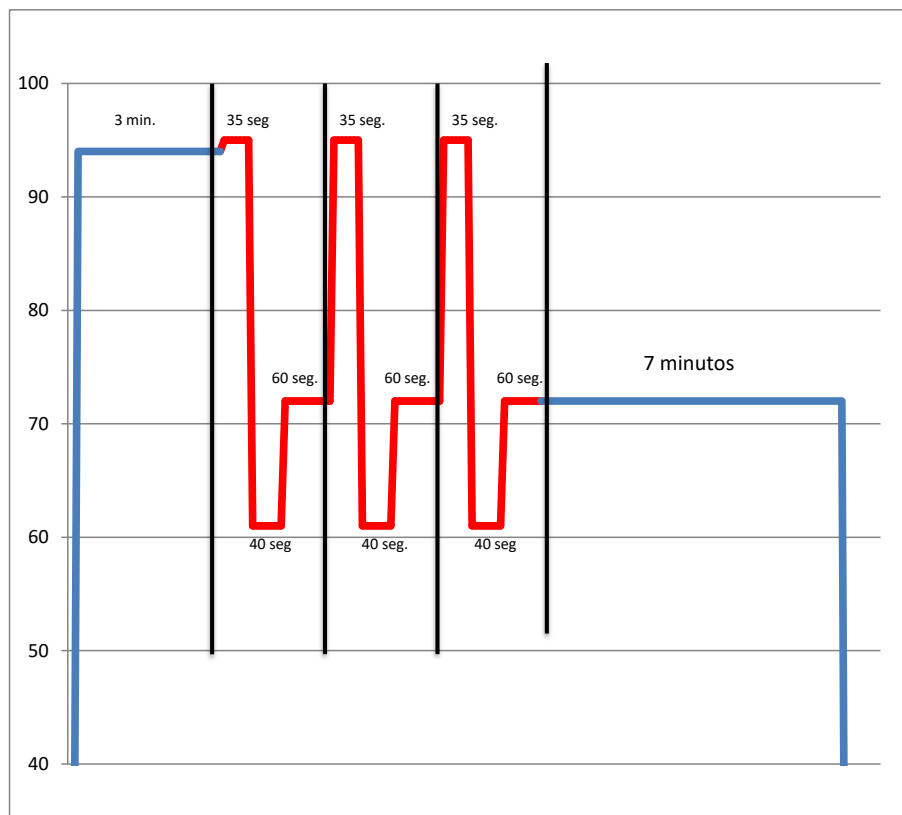


Figura 18 Ciclos de temperatura de PCR

### Obtención de plásmidos recombinantes a partir de productos de PCR

Los productos amplificados por medio de PCR fueron después ligados al vector de clonación comercial pCR8GWTOPO (Invitrogen; Carlsbad, CA) siguiendo las indicaciones del proveedor. Se utilizaron 2  $\mu\text{l}$  del producto amplificado de PCR y purificado, 0.5  $\mu\text{l}$  del vector pCR8GWTOPO, 1  $\mu\text{l}$  de solución salina y 2.5  $\mu\text{l}$  de agua bidestilada estéril, llegando a un volumen final de 6  $\mu\text{l}$  de mezcla. La mezcla se agitó suavemente por pipeteo y se incubó a 22 °C por 8 horas. Después de pasado el tiempo se purificó y utilizó el producto de la reacción para transformar células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  de Invitrogen por la técnica de choque térmico, como se describe a continuación.

## Método de Hanahan o Choque térmico para transformar células competentes de *E. coli*.

Una vez obtenido los amplicones de interés por medio de PCR se ligaron estos fragmentos al vector PCR8GWTOPO. Ya ligados los productos al vector de clonación, estos se introdujeron a las bacterias electrocompetentes de *E. coli* con el fin de que proliferen y poder obtener mayor cantidad de plásmidos recombinantes. Los pasos de la técnica utilizada se enlistan a continuación:

1. se añadió el plásmido de interés (hasta 25 ng por cada 50 µl de células competentes) en un volumen que no exceda 5% de la de las células competentes. los tubos se agitaron suavemente varias veces para mezclar su contenido. se configuró al menos dos tubos de control para cada experimento de transformación, incluyendo un tubo de bacterias competentes que recibió una cantidad conocida de una preparación estándar de ADN de plásmido superhelicoidal y un tubo de células que no recibe ningún ADN de plásmido en absoluto. Incubar en hielo durante 30 minutos.

2. los tubos se incubaron a 42°C. Se dejan reposar los tubos en el bastidor durante exactamente 50 segundos sin agitación.

3. los tubos se trasladaron rápidamente a un baño de hielo por 10 minutos.

4. se añadieron 250 µl de medio SOC a cada tubo. Posteriormente se incubó con agitación a 37°C. durante 45 minutos a 1 hora para permitir que las bacterias se recuperaran y que expresen el marcador de resistencia a antibióticos codificada por el plásmido.

5. se transfirió el volumen apropiado (hasta 200 µl por placa de 90 mm) de las células

6. se guardaron las placas a temperatura ambiente hasta que se absorbió el líquido.

7. por último se incubó placas a 37°C. Las colonias transformadas aparecieron después de 16 horas.

Las clonas transformadas fueron cultivadas en medio líquido y recolectadas por centrifugación para extraer su DNA plasmídico para posteriormente subclonar estos frgamentos en los vectores de interés, ya sea para análisis de promotor, silenciamiento o

**Comentado [a8]:** Lo mismo, manejar un formato uniforme en cuanto a los tiempos gramaticales

sobreexpresión. Una vez obtenidos los plásmidos recombinantes, estos fueron introducidos en *A. tumefaciens* por electroporación.

### **Transformación de bacterias por Electroporación.**

Partiendo de los plásmidos recombinantes obtenidos anteriormente, se realizó la transformación de células electro-competentes de *A. tumefaciens* (C58C1) previamente congeladas a -80°C. Se tomaron 2 µl de plásmido y se agregaron a un tubo eppendorf conteniendo células competentes (50 µl aprox), se homogenizó la mezcla y se trasladó a una celda de electroporación de 1 ml que se mantuvo en hielo durante 15 min antes de la transformación. Esta celda que contiene la mezcla se colocó dentro del electroporador y se dio un choque eléctrico de 1800 mV, posteriormente se agregaron 500 µl de medio SOC (triptona 2 %, Extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, glucosa 20 mM, pH7.0) dentro de la celda de electroporación y se homogenizó. Este homogenizado fue transferido a un tubo Eppendorff estéril para ser incubado durante 3 horas a 28 °C en agitación constante (150-200 rpm). Una vez transcurrido el tiempo se tomaron 100 µl de esta mezcla y se esparcieron en placas conteniendo medio solido YEB con espectinomicina (100 µg/ml) como antibiótico de selección; estas placas se incubaron a 28°C durante 48 horas y así obtener las clonas candidatas de *Agrobacterium* conteniendo la construcción deseada. Por último, se realizó la comprobación de la presencia de cada uno de los insertos en las clonas candidatas mediante PCR punto final, utilizando los oligonucleótidos específicos para cada de una de las construcciones.

### **Análisis por RT-PCR cuantitativo.**

El análisis cuantitativo por qRT-PCR de los niveles del RNAm de *CmCDKP* es descrito a detalle a continuación.

Primero se extrajo RNA de tejido de cinco diferentes plantas de calabaza silvestre; se tomaron 50 mg para cada tejido (polen, hojas, tallos, ápice, bulbo floral y flores maduras) y se agruparon. Se usaron 10 ng de RNA total en un volumen de 10 µl por reacción para cada corrida de qRT-PCR. En el caso de la savia de floema, el RNA fue aislado como ha sido

**Comentado [PS9]:** 1.Chassy B.M. and Flickinger J.L. 1987. Transformation of *Lactobacillus casei* by electroporation. FEMS Microbiol. Lett. 44:173-177.  
2. Chassy B.M., Mercenier A., and Flickinger J. 1988. Transformation of bacteria by electroporation. Trends Biotechnol.6:303-309.  
3. Dower W.J., Miller J.F., and Ragsdale C.W. 1988. High efficiency transformation of *E. Coli* by high voltage electroporation. Nucleic Acids Res.16:6127-6145.

descrito por Ruiz-Medrano et al., 1999. Se usó un sistema comercial de acuerdo con las recomendaciones de los fabricantes (KAPA SYBR FAST Universal One-Step qRT-PCR Kit) y oligonucleótidos específicos para CmCDKP; Cmd19 Directo, 5'-GTGGCTCCCCTTCAGATGAATATTGGA-3' y reverso CmdREV2.

Comentado [a10]: Falta esta secuencia

Las reacciones de qRT-PCR en tiempo real fueron incubadas en un sistema de detección de DNA en tiempo real-RotorGene 3000 (Corbett Research, Australia) usando las siguientes condiciones de PCR: 5 minutos a 42°C para la transcripción reversa seguida por 3 minutos a 95 °C con 45 ciclos de desnaturalización (95°C por 3 segundos), alineamiento (58°C por 20s ) y extensión (72°C por 3 segundos). Para verificar que no fueran amplificados productos adicionales en la reacción, se generó una curva de disociación de oligonucleótidos calentando la muestra progresivamente (60-95 °C) para cada muestra de tejido; el valor de CT de cada producto se determinó por triplicado técnico, y también se utilizó el 18S rRNA para normalizar la expresión del gen. Los primer usados fueron 18S directo 5'-GCCCGGGTAATCTTTGAAATTTTCAT-3' y 18S reverso, 5'-GTGTGTACAAAGGGCAGGGACGTA-3, la cuantificación relativa de la acumulación del transcrito se llevó a cabo de acuerdo al método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  descrito por Livak y Schmittgen (2001) y se analizó cada tejido por triplicado.

### Síntesis de cDNA y LD-PCR

Primero se sintetizó cDNA partiendo de RNAtotal a una concentración de 10 µg/ml, para lo cual se utilizaron los oligonucleótidos SMART y dTGAGA. La mezcla de reacción se muestra en la tabla 5. Esta mezcla se incubó a 72°C durante 2 a 5 minutos, posteriormente se incubó en hielo durante 2 minutos, se centrifugó 10 segundos y se volvió a colocar en hielo, después se agregaron los reactivos de la etapa dos, mostrados en la tabla 5. Una vez que se agregaron los reactivos de la etapa dos, se mantiene a temperatura de 42°C durante 2 horas y se purifica con un sistema comercial QIAGEN obteniendo finalmente cDNA para posterior amplificación por LD-PCR.



Mezcla de reacción para síntesis de cDNA	
Reactivos	ul de reacción
RNA	1.0
SMART (10 mM)	1.0
DTGAGA (10mM)	1.0
H2O	5.0
Etapa 2	
Amortiguador 5X (superscript)	2
DTT	1
dNTPs	1
RNAsin	0.2
RT superscript	0.2
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	0.6

Tabla 6 Mezcla de reacción de las dos etapas para sintetizar cDNA.

Para la obtención del fragmento de interés se utilizaron los oligonucleótidos específicos de la región a amplificar, y se agregaron los demás reactivos como se muestra en la tabla 6. La mezcla final se incubó en un termociclador Biometra (Jena, Alemania) programando ciclos de temperaturas de PCR, primero un paso de desnaturalización a 94 °C por 3 minutos, seguido por 30 ciclos de 94 °C por 35 segundos, 68 °C durante 6 minutos, tomando muestras durante los ciclos 20, 22, 24, 26, 28 y 30 de producto de PCR. La muestra con mejores resultados como molde para amplificación de fragmentos de interés fue la del ciclo 28 la ser clonado en el vector pDrive (QIAGEN) y este se secuenció por el método de Sanger.

**Comentado [a11]:** En donde fue secuenciado?

Mezcla de reacción para síntesis DNA por LD-PCR	
Reactivos	ul para una reacción de PCR
cDNA	0.5
Oligo 5' PCR	1.0
Oligo 3' dTGAGA	1.0
Takara amortiguador	2.5
dNTPs (2.5mM)	2.0
Takara	0.1
H <sub>2</sub> O c.b.p	20.0

Tabla 7 Mezcla de reacción para sintetizar DNA por LD-PCR

### **Transformación de Arabidopsis por Método de inmersión floral (Floral Dip).**

El método de inmersión floral o Floral Dip (Clough y Bent., 1998) aprovecha la característica que tiene la bacteria *A. tumefaciens* para poder infectar óvulos en proceso de desarrollo y por tanto transferirles su T-DNA. Además el amortiguador usado en la técnica contiene sacarosa como fuente de carbono para *A. tumefaciens*, así como citocininas que permiten la inducción de la proliferación de células vegetales. Este método se realizó generando céspedes de *A. tumefaciens* en cajas Petri que contengan medio sólido YEB con espectinomicina (28°C por 48 horas), se realizó un raspado del césped bacteriano con una espátula estéril y se resuspendió en 30 ml de amortiguador de inmersión floral que contiene 5% de sacarosa, 0.02 % de silwet L 77 y 10 mg/l de Bencilaminopurina (BAP), se homogenizó y centrifugó a 6000 rpm a 4°C durante 10 min. Se removió el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en otros 30 ml de amortiguador de inmersión floral, después se

adicionaron otros 270 ml de amortiguador y se colocaron en una charola contenedora previamente desinfectada. Cada planta fue sumergida en este amortiguador con *A. tumefaciens*, durante 60 segundos, en donde se procuró embeber bien los bulbos florales jóvenes. Después, las macetas se colocaron horizontalmente en charolas amplias previamente desinfectadas y se cubrieron con paños de papel humedecidos, en donde se mantuvieron en reposo en cámaras de crecimiento a 20° C durante dos días, y posteriormente se trasladaron al invernadero y se mantuvieron en riego con solución nutritiva cada tercer día.

### **Selección de líneas transgénicas**

Las semillas primarias se obtuvieron a partir de las plantas tratadas por inmersión floral. Estas fueron recolectas y sembradas en macetas de plásticos especiales (Arabipot®) que contenían suelo con una mezcla de 40% tierra, 40 % turba y 20% agrolita, usando herbicida (glufosinato de amonio) como marcador de selección de las plantas transgénicas. Se hicieron aplicaciones de este herbicida una vez por semana durante un mes. Estas semillas primarias son sembradas masivamente, debido a la baja eficiencia del método de transformación (2-3%).

### **Transformación transitoria de Calabaza.**

Se crecieron las bacterias *A. tumefaciens* con el vector binario de interés en cajas Petri, se recolectaron y diluyeron en 10 ml de medio de infiltración (5% sacarosa, 0.044mM Bensilaminopurina, 50 ml/litro de silwet L-66). Se tomó con jeringas para insulina, 50 ml de inóculo y se infectó en el ápice de la planta. Para transformar las plántulas de calabaza de manera eficiente, la aguja de la jeringa tenía que cruzar los haces vasculares. Las plantas se cubrieron con una bolsa de plástico para mantener la humedad en 90 %. También se infectaron plantas con *A. tumefaciens* sin vector como control.

Las macetas tratadas como sus controles se pusieron en invernadero y al tercer día se quitaron las bolsas de plástico. Después las plantas fueron regadas cada tercer día con solución nutritiva de la marca Miracle-Gro.

### **Hibridación *in situ*.**

Ésta fue llevada a cabo esencialmente como ha sido descrito por Ruiz-Medrano et al., 1999. Los tejidos fueron embebidos en parafina y colocados en laminillas. Posteriormente fueron desparafinados y tratados con citrisol v durante 10 min. Los tejidos fueron hidratados en un gradiente de alcohol desde 100% durante 2 minutos (dos veces), 90 %, 70 %, 50 % y 30 % (con 0.01 % de safranina y 0.85 % de NaCl) durante 1 min. Se hizo un lavado en NaCl 0.85 % durante 2 min, después se lavaron las laminillas con PBS 1X (PBS 10X: NaCl 1.3 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.07M y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.03 M, pH 7) durante 2 min. Inmediatamente se hizo un tratamiento con 500 µl/laminilla de proteasa (2 µg/ml) disuelta en amortiguador 1X para proteinasa K (10X: Tris-HCl 100mM y EDTA 50mM, pH8) incubando a 37°C durante 45 minutos en una cámara húmeda. Después se bloqueó con glicina 0.2% disuelta en PBS 1X durante 2 minutos para posteriormente deshidratación de los tejidos en el gradiente de alcohol 30-90% por 1 minuto y 2 veces en alcohol al 100% durante 1 min en cada uno. Las laminillas se colocaron en una cámara húmeda para iniciar la hibridación.

Se mezclaron 4 µl de cada sonda, previamente desnaturalizadas a 80°C por 2 minutos, en la solución de prehibridación (NaCl 300mM, Tris-Hcl 10mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, EDTA 5 mM, formamida 50% sulfato de dextran 10%, solución Denhardt 1X) 500 µl de esta mezcla se colocaron sobre cada laminilla cubriéndolas con un trozo de parafilm e incubaron a 42°C toda la noche. A continuación las laminillas fueron lavadas dos veces en una solución de formamida al 50% en SSC 2X (20X: 175.3g NaCl, 88.2g de citrato de sodio en 1 L de H<sub>2</sub>O, pH 7 Esterilizada) a 42°C durante 30 min, y 5 minutos en la misma solución fresca. Después se bloqueó con leche descremada al 2% BSA disuelta en PBS 1X por 45 min a temperatura ambiente. El exceso de leche se lavó con PBS 1X. El anticuerpo contra digoxigenina (Roche) fue disuelto 1:2000 en la solución de leche descremada al 4%; de esta mezcla se colocaron 300 ul por laminilla y se incubó a 4°C toda la noche. El anticuerpo fue lavado con PBS 1X durante 30 min a temperatura ambiente.

El revelado se realizó con 300 µl por laminilla de una solución de NBT-BCPI (Cloruro de nitro azul tetrazolio/5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato; Roche) incubando de 2 a 3 días en oscuridad a temperatura ambiente. Las laminillas se sumergieron por 1 minuto en el gradiente de alcoholes desde 30 a 100%. Finalmente, se colocó sobre cada laminilla unas gotas de la resina Permount (Fisher), un cubreobjetos y se incubaron 2 días a temperatura

ambiente. Se tomaron fotografías con una cámara digital en un microscopio de campo claro HFX-DX Optiphot-2 (Nikon).

### Tinción de GUS

Para analizar la actividad del promotor se realizó un ensayo histoquímico con el producto del gen reportero uida (GUS) en diferentes tejidos de calabaza, los pasos realizados para su análisis se muestran enlistados a continuación.

1. Las plantas fueron retiradas con cuidado del suelo, teniendo cuidado de no dañar las raíces al retirar las plantas de la tierra, se cortaron con cuidado las hojas, tallos, bulbo floral y raíces de las plantas y fueron lavadas con agua.
2. Se colocaron las plantas en una placa de cultivo celular o un pequeño tubo de plástico de microcentrífuga de 1.5 ml que contiene la solución de ensayo de GUS. (La solución de ensayo se puede reutilizar varias veces) también se incluyeron controles positivos para monitorizar la extensión de la reacción
3. Se cubrió de la luz y la infiltración de tejido durante toda la noche dejando incubar a 37 °C para mejorar la expresión de la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS).

Debido a que el color azul es difícil de visualizar contra el fondo verde oscuro de las hojas maduras, las plantas se retiraron de la solución de ensayo GUS y colocaron en soluciones de lavado durante 8h en cada uno (etanol-ácido acético 3: 1; Metanol-acetona 3: 1; solución de lactofenol)

4. Las muestras fueron conservadas en el frigorífico en una solución de glicerol al 50%. Finalmente se observaron en el estereoscopio.

### Análisis de fluorescencia de GFP por microscopia confocal.

Para analizar los sitios de acumulación de la proteína se probaron las diferentes construcciones con los vectores de promotor y sobre-expresión pGWFS7 y p7WG2D respectivamente. Ambos vectores contienen como gen reportero la proteína verde fluorescente (GFP) y el promotor fuerte 35S.

**Comentado [a12]:** Quizas sería bueno poner como figuras los mapas de ambos vectores que aquí mencionas, o ponerlos como anexos, y hacer referencia a estas.

Para detectar el gen reportero (GFP) se tomaron diferentes muestras de tejido de calabaza, como hoja aérea, tallo, y bulbo floral macho, estos tejidos habían dado positivo al comprobar el transgen por PCR punto final. Los tejidos se sumergieron durante 3 días en una solución de lavado para retirar los pigmentos (etanol 50%, glicerol 20%, agua 20% y ácido láctico 10%). Los cortes se hicieron con navajas de acero inoxidable especiales para microscopía (Electron Microscopy Science TM), se colocaron sobre un portaobjetos agregándoles glicerol al 50%, ubicando encima de éste un cubreobjetos (20 x 50 mm), para finalmente fijar la preparación con esmalte.

Las imágenes fueron tomadas en microscopios Confocales TCS-SPE y TCS-SP8 Marca Leica (Objetivos 20X, 40X, 63X: ACS 1.15 IMMAN), y Multifotónico TCS-SP5/MO-TANDEM Marca Leica (Objetivos 20X y 40X: HCxPLAPO  $\lambda$ -blue IMM UV 0.7 A.N.), el cual posee un Laser Tisaph 200M 2X (resolución: 1024 x 1024 pixeles), utilizando longitudes de excitación de 515 nm/ 580 nm onda y de detección de 525-550nm/600-680 nm para GFP y la clorofila (auto-florescencia) respectivamente. Finalmente, las imágenes fueron tratadas y analizadas con el software Leica Las AF.

### **Secuencia de nucleótidos del marco abierto de lectura de *CmCDKP* de calabaza (método de Sanger).**

Se tomaron 100 mg de peciolo al cual se extrajo RNA con el kit RNAeasy (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante como se muestra en la sección de extracción de RNA, este se diluyó a una concentración de 10  $\mu$ g /ml para ser usado como molde durante la síntesis de cDNA usando la transcriptasa reversa Superscript II (Invitrogen, La Jolla CA), para la síntesis del 5' y 3'-RACE se usaron los oligonucleótidos dTGAGA y SMART de acuerdo con Diatchenko *et al.* (1994). La región mas cercana al 3' del ORF para *CmCDKP* se obtuvo usando como primer reverso una secuencia del fragmento original obtenido previamente por hibridación substractiva (Ruiz-Medrano *et al.*, 2007) (5'-TTTCGGGAGGCTAGAGGGTTTGCAAGC-3'). El oligonucleó directo fue diseñado basándose en la alineamiento de homólogos más cercanos a *CmCDKP* en melón, pepino (*Cucumis melo* y *Cucumis sativus*) y *Arabidopsis* secuencia 5'-ATGGGGTGTYYTGGTTAGCCGAGAGGCGTCTTCTAGA-3'). La región mas cercana a

la terminación 3' se obtuvo usando como primer directo una secuencia dentro del fragmento original *CmCDKP* antes mencionado (Cmd19 REV2, 5'-AGCGAGTTCTTCATGACAGAGCCTTTAGCTTGC-3') y para el primer reverso se usó el oligonucleótido dTGAGA.

Primero se sintetizó cDNA partiendo de RNA y usando la transcriptasa reversa Superscript II, seguido por LD-PCR como se muestra en la sección de síntesis de cDNA y LD-PCR. Para ambos fragmentos 5' y 3' los ciclos de PCR fueron iguales. Un ciclo de desnaturalización 3 min. A 94°C, seguido por 35 ciclos de desnaturalización por 35 segundos a 94°C, alineados por 35 segundos a 56°C y polimerización por 1 minuto a 45 segundos a 72°C, con una extensión final de 7 minutos a 72°C. Los productos de PCR amplificados, se clonaron en el vector pDrive (QIAGEN), y se secuenciaron por el método de Sanger en la Facultad de Estudios Superiores de Iztacala.

**Comentado [a13]:** Esta sección parece estar repetida, revisala por fa

### **Construcción de árbol filogenético**

Las secuencias aminoácidas de CDKs fueron obtenidas de las bases de datos Genbank y phytozome, y alineadas usando ClustalW Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

La secuencia de CmCDKP fue traducida virtualmente usando el programa del sitio de internet Sequence Manipulation Suite (<http://www.bioinformatics.org/sms2/>) e incluida en el análisis. Posteriormente se construyó un árbol filogenético usando el software Mega 5.1 por el método de Neighbor-Joining con 1000 bootstrap (Saitou y Nei, 1987).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### Condiciones óptimas de crecimiento de calabaza, recolección de semillas y savia.

Se sembraron semillas de calabaza de *Cucurbita maxima* (calabaza) para obtener semillas silvestres necesarias para posteriores tratamientos, así como para conocer las condiciones óptimas de crecimiento. También estas plantas sirvieron para extraer RNAm de diferentes tejidos y poder realizar análisis de acumulación de este mensajero, como también para amplificar la secuencia completa de CmCDKP a partir de muestras de savia de peciolo (Figura 26). A continuación se muestran las fotos del crecimiento de las calabazas silvestres durante diferentes periodos de tiempo (Figuras 19 a 25) desde su germinación (Figura 19) hasta que dieron fruto (figura 25). Las mejores condiciones fueron con un suelo franco-arenoso, es decir con un suelo que no esté tan compacto. Las macetas se pusieron en invernadero y regadas cada tercer día con solución nutritiva.



Figura 19 Germinación de semillas de calabaza a una semana





Figura 20 Plántulas de calabaza de 2 semanas de germinación



Figura 21 Plantas de calabaza a un mes de crecimiento post-germinación



Figura 22 Plantas de calabaza a un mes y medio post-germinación



Figura 23 Plantas de calabaza a un mes y tres semanas post-germinación





Figura 24 Plantas de calabaza con dos meses y medio post-germinación



Figura 25 Fruto de calabaza para obtención de semillas silvestres.

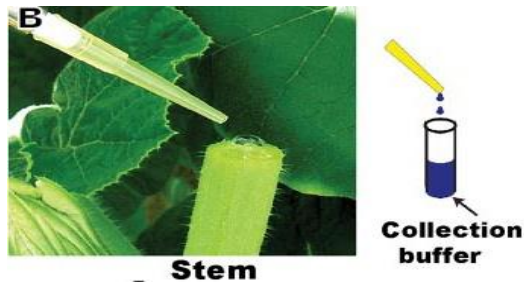


Figura 26 Recolección de savia de floema de calabaza.

## Generación de construcciones para análisis de promotor, silenciamiento y sobreexpresión de CmCDKP

### Construcción de análisis de la región de promotor

Primero se extrajo DNA genómico (figura 27) del cual, con los oligonucleótidos específicos para los genes homólogos en Arabidopsis At1g54610 y At3g50860, se obtuvieron por medio de PCR los productos correspondientes de tales promotores (Fig. 28).

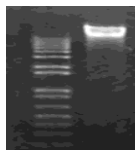


Figura 27 producto de la extracción de DNA genómico

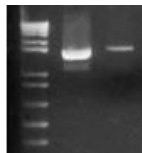


Figura 28 Productos amplificados de PCR para ambos promotores

Los productos amplificados por PCR se ligaron al vector de clonación pCR8/GW/TOPO (figura 10) estos fueron introducidos a *E. coli* por la técnica de choque térmico, las bacterias transformadas se seleccionaron en medio LB con espectinomicina. A las colonias resultantes se les extrajo DNA plasmídico con la técnica conocida como miniprep, se verificaron los

productos en un gel de agarosa (Figuras 29 y 30) tanto para el promotor A (At1g50860) como el B (At1g54610).

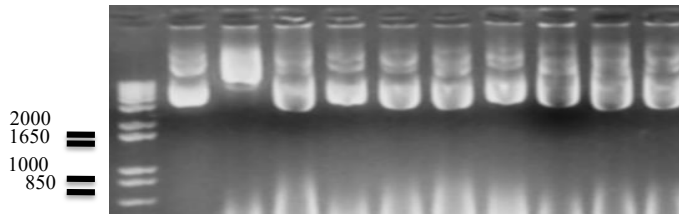


Figura 29 Producto de la extracción de DNA plasmídico del Promotor A

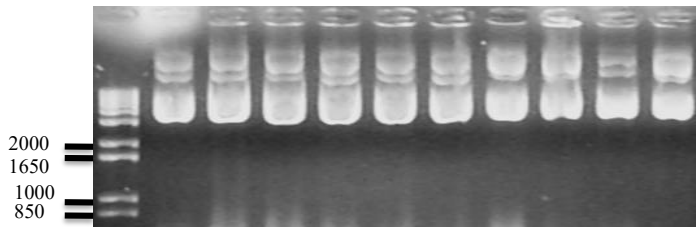


Figura 30 Producto de la extracción de DNA plasmídico del Promotor B

También se verificaron la orientación adecuada los plásmidos obtenidos para ser subclonados en el vector de expresión. Para esto se digirieron dichos plásmidos con las enzimas de restricción EcoRV/ SacI y HincII para el promotor A y promotor B, respectivamente (Figuras 31 y 32).

Comentado [a14]: Cual usaste?

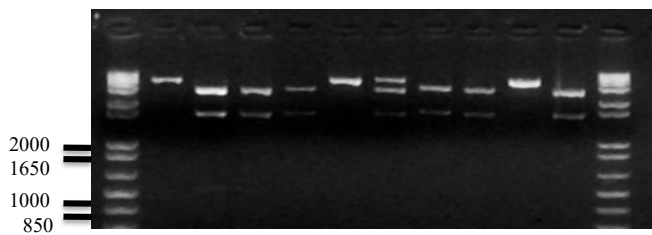


Figura 31 Fragmentos obtenidos del corte con enzimas de restricción EcoRV y Sac I para el Promotor A

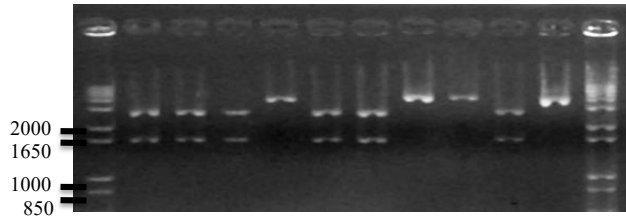


Figura 32 Fragmentos obtenidos del corte con la enzima de restricción *HinC II* para el Promotor B

Las orientaciones (+) para subclonar corresponden a clonas 1,5 y 9 en el promotor A y 4, 7,8 y 10 en el caso del promotor B (Figuras 31 y 32). Los insertos en la orientación correcta se subclonaron en los vectores de expresión correspondientes al promotor pBGWFS7 y éste se introdujo en *Agrobacterium tumefaciens* por electroporación. Las bacterias se seleccionaron en medio YEB con espectinomicina y a las clonas que proliferaron se les extrajo el DNA plasmídico (Fig. 33 y 34). Por último se comprobó la presencia de los fragmentos de interés (ambos promotores) en las respectivas construcciones por medio de PCR, utilizando los oligonucleótidos específicos y se obtuvo el fragmento esperado de 1600 pb (Figura 35).

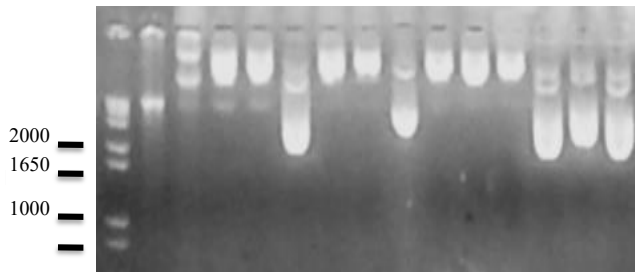


Figura 33 Producto de la extracción de DNA plasmídico del vector promotor A

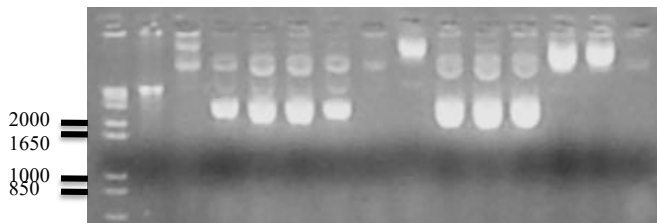
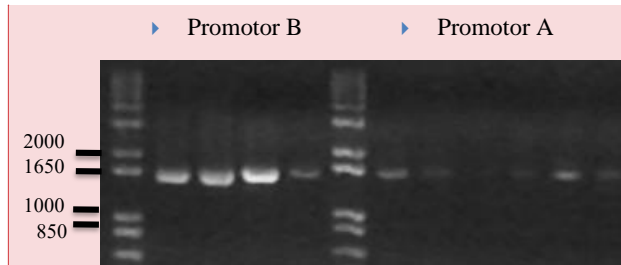


Figura 34 Producto de la extracción de DNA plasmídico del vector Promotor B



Comentado [a15]: Arreglar los pesos moleculares es el ladder

Figura 35 Productos de PCR comprobando fragmentos de ambos promotores

### Construcción para el silenciamiento de genes homologos a CmCDKP en arabidopsis

Se partió del DNA genómico extraído en calabaza y Arabidopsis. Para ello se obtuvo el fragmento de 200 pb deseado por medio de PCR con los oligonucleótidos específicos de silenciamiento para Arabidopsis y calabaza. Los productos amplificados de PCR obtenidos tienen un tamaño de base de 240 el cual corresponde a los resultados obtenidos por electroforesis (Figura 36).

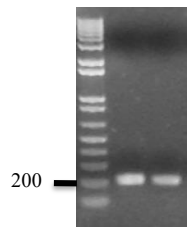


Figura 36 Productos amplificados de PCR del fragmento de silenciamiento para Arabidopsis

Estos fragmentos se ligaron al vector de clonación pCR8/GW/TOPO y se introdujeron en *E. coli* por choque térmico, la bacteria se hizo crecer en medio LB con espectinomicina ya que dicho vector le proporciona resistencia a este antibiótico. Las colonias resultantes y que se supondría contienen el vector en cuestión, se comprobaron sus tamaños por medio de electroforesis en gel de los plásmidos (Figuras 37 y 38).

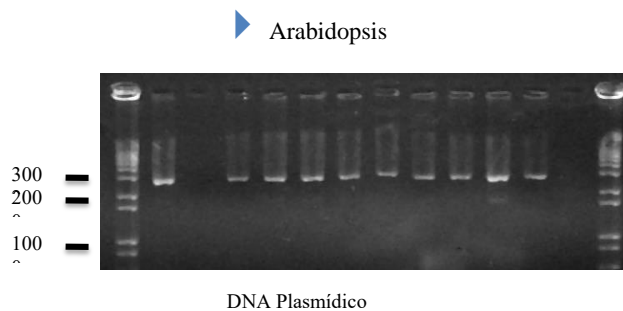


Figura 37 DNA plasmídico de vector PCR8/GW/TOPO que contiene el fragmento de silenciamiento para Arabidopsis

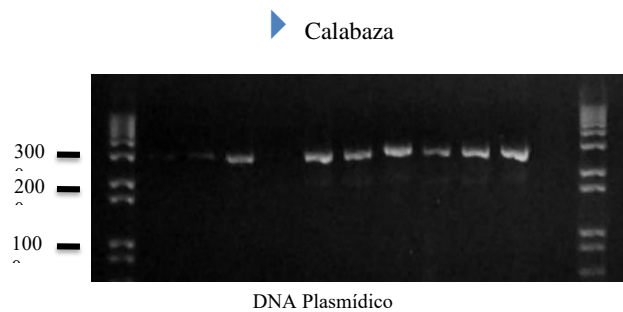


Figura 38 DNA plasmídico de vector PCR8/GW/topo que contiene el fragmento de silenciamiento para Calabaza  
Además se comprobó que estos vectores tuvieran el inserto por medio de PCR y los productos amplificados obtenidos corresponden al tamaño de base esperado (Figura 39)

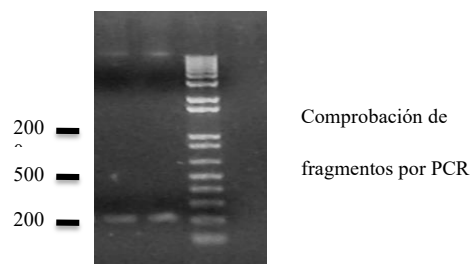


Figura 39 Productos amplificados de PCR para comprobar fragmento de silenciamiento

Posteriormente se subclonaron los insertos de los plásmidos seleccionados en el vector de expresión para silenciamiento y éstos se introdujeron en *Agrobacterium tumefaciens* por

Comentado [a16]: Cual es este?



electroporación, se crecieron las bacterias en medio YEB con espectinomicina y a las clonas que crecieron se les extrajo el DNA plasmídico (Figura 40). Por último se comprobó fragmento en el vector de silenciamiento por medio de PCR con los oligonucleótidos específicos T35S y 3 intrón para un extremo del fragmento para silenciamiento y 35S y 5 intrón para el otro extremo del fragmento, obteniéndose los fragmentos del tamaños esperados (Figura 41).

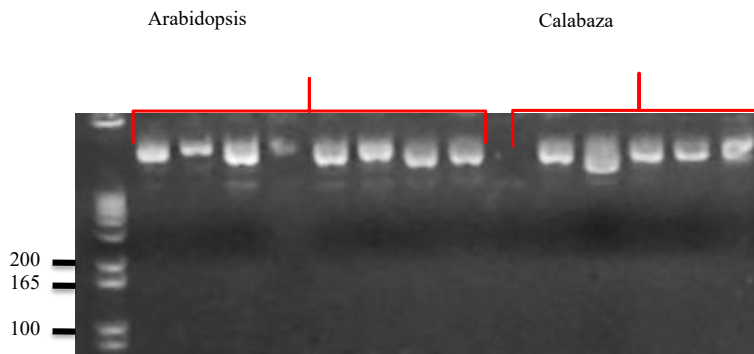


Figura 40 DNA plasmídico del vector de silenciamiento extraído de *Agrobacterium*

Ilustración 1 DNA plasmídico del vector de silenciamiento extraído de *Agrobacterium*

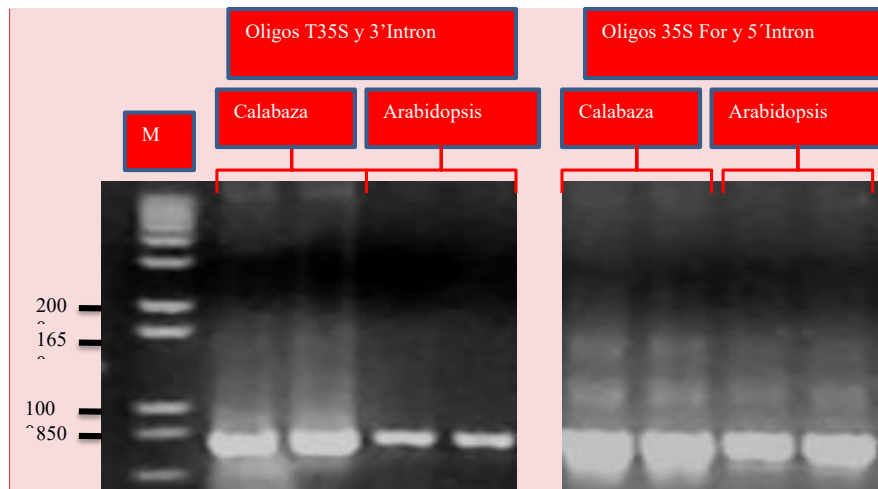


Figura 41 Productos amplificados de PCR para comprobar fragmentos de silenciamiento en vector de silenciamiento

**Comentado [a17]:** Trata de manejar un formato uniforme en todas tus figuras de gels, y una vez mas arregla el tamaño de letra del ladder

## Obtención de la secuencia completa de CmCDKP

Antes de pasar a la construcción del vector de expresión, fue necesario obtener la secuencia completa del marco de lectura abierto, ya que debido a la técnica de hibridación sustractiva realizada en trabajos previos sólo se cotaba con un fragmento de secuencia, el cual tiene alta homología con una CDK de Arabidopsis At1g54610, de 300 pares de bases. Al realizar un análisis tipo BLAST de secuencia con At1g54610 nos percatamos que correspondía a un fragmento intermedio del marco de lectura de éste, por lo que era necesario conocer el resto de la secuencia. Para obtener la secuencia completa, primeramente se extrajo RNA de savia de calabaza silvestre (figura 42), partiendo de este RNA se obtuvo DNA complementario (cDNA) para evitar secuencias no traducibles y poder obtener el ORF completo de la proteína de interés requerida a ser sobreexpresada.

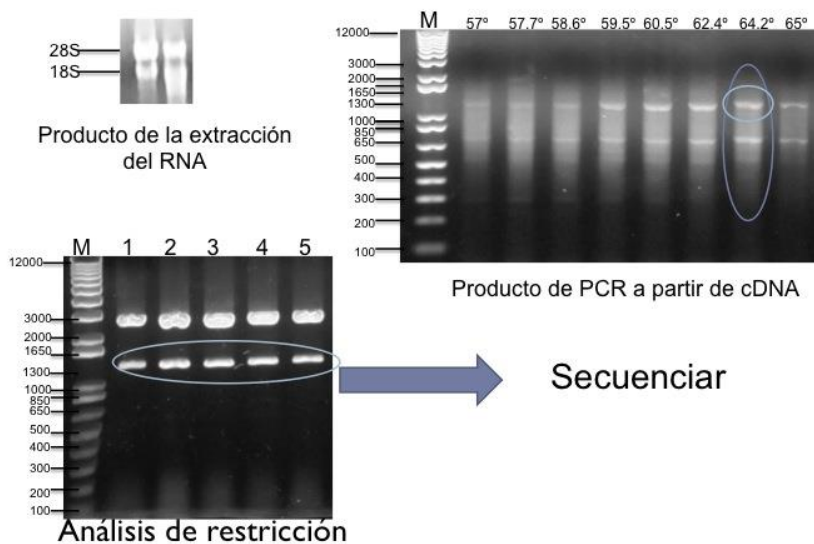


Figura 42 producto de PCR para extremo 3' mas cercano

Para el extremo más cercano al 3' se utilizó el oligonucleótido 5' directo del fragmento de 300 pb previamente obtenido y el oligo 3' dTGAGA se realizó una PCR con gradiente de temperatura a partir de cDNA y se tomó el producto que mejor se visualizó al detectarlo por electroforesis, siendo la temperatura de alineación de 64.2 °C en la que se amplificó más eficientemente (Figura 42). La banda prevista se cortó, purificó y se introdujo al vector de

clonación pDrive. Dicho vector se envió a la unidad de secuenciación en FES Iztacala para ser secuenciada por el método dideoxi de Sanger.

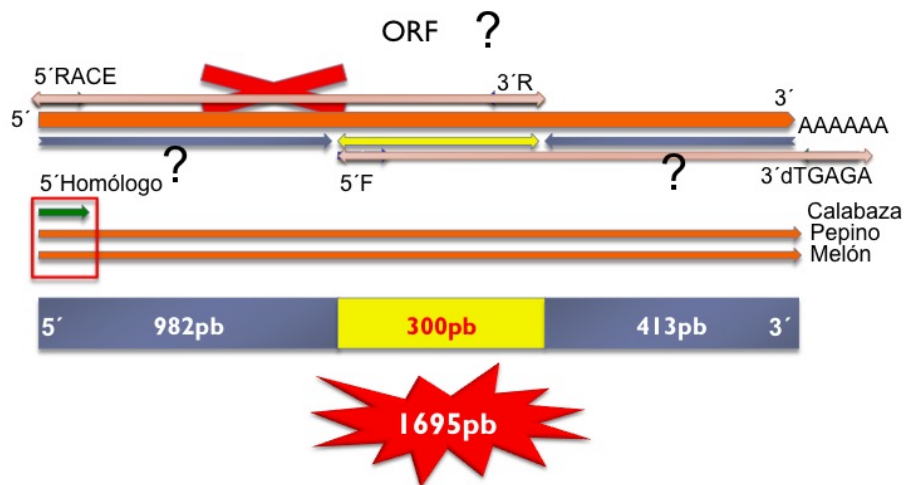


Figura 43 estrategia de amplificación de los extremos 5' y 3' para obtención de secuencia completa CmCDKP

Para el extremo más cercano al 5' primero se ocuparon los oligonucleótidos 3' de la secuencia de 300 pb y el Oligo 5 SMART (Figura 43). Sin embargo, después de numerosos intentos por amplificar esta región, este par de oligonucleótidos no amplificaron ningún fragmento y se optó por cambiar el oligonucleótido 5 SMART por otro basado en homología con las secuencias más parecidas. Para ello se realizó un alineamiento con Clustal W entre esta secuencia y otras dos CDKs de melón y pepino (las secuencias más semejantes de acuerdo con el BLAST realizado). De dicho alineamiento se obtuvo una secuencia en el extremo amino que es sumamente conservado, lo que permitió el diseño de un oligonucleótido 5' específico. Con el oligonucleótido 3' del fragmento de 300 pb fue posible amplificar un fragmento de 982 pb; dicho fragmento se envió a secuenciar y resultó empalmar perfectamente con el fragmento de 300 pb, por lo que efectivamente era la secuencia que faltaba para poder obtener la secuencia completa del marco de lectura abierto de calabaza. Esta secuencia con un tamaño final de 1695 pb y traducida virtualmente nos da una proteína de 565 aminoácidos (fig. 45), la cual denominamos CmCDKP. Esta secuencia fue depositada en la base de datos Genbank (Figura 44).

Nucleotide

Advanced

NCBI is phasing out sequence GI numbers in September 2016. Please use accession.version! [Read more...](#)

GenBank -

### Cucurbita maxima cyclin-dependent kinase mRNA, complete cds

GenBank: KM058713.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#)

**LOCUS** KM058713 1695 bp mRNA linear PLN 29-SEP-2014

**DEFINITION** Cucurbita maxima cyclin-dependent kinase mRNA, complete cds.

**ACCESSION** KM058713

**VERSION** KM058713.1 GI:68801133

**KEYWORDS** -

**SOURCE** Cucurbita maxima (winter squash)

**ORGANISM** Cucurbita maxima  
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; Gunneridae; Pentapetalae; rosids; fabids; Cucurbitales; Cucurbitaceae; Cucurbitaceae; Cucurbita.

**REFERENCE** 1 (bases 1 to 1695)

**AUTHORS** Herrera-Pola, P.S., Ruiz-Medrano, R., Hinojosa-Moya, J.J. and Xocoostle-Cazares, B.

**TITLE** Direct Submission

**JOURNAL** Submitted (25-JUN-2014) Biotecnologia, CINVESTAV, Av. Instituto Politecnico Nacional, Mexico, D.F. 07360, Mexico

**COMMENT** ##Assembly-Data-SRR##  
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing  
##Assembly-Data-END##

**FEATURES**

Location/Qualifiers

source 1..1695  
/organism="Cucurbita maxima"  
/mol\_type="mRNA"  
/db\_xref="taxon:3661"  
/tissue\_type="phloem"  
1..1695

**CDS**

1..1695  
/note="CmCDKP"  
/codon\_start=1  
/product="cyclin-dependent kinase"  
/protein\_id="A108292.1"  
/db\_xref="GI:68801134"  
/translation="MCCLVSRSSRSVEPPVDMKRNQITSEGVQVHVQKLEHV  
SANVEHANSKKEEQKADQCDPRARRRRSRKFRPNLPHNSQGVAAQNFSL  
TAVCGALNGWIPRKAFTFEKIDIGQGTYSNYYKADLILGKIVALKVVFNDLEP  
SVKFMARELILRLNHNVVKLEGLVSRMSCLYLVEYMEHDLAQLAAPSIKFT  
ESQVKCFMQLLSGLEHCHNRHVLRLDKSGLLIDSGGVKLIADFGLASFFDPKHK  
PMTSRVTLWYRPELLELGAATYGVGVLSAGCILAELLAGRIMPGRTEVQLIKI  
YKLCSPDEYKRAKLPNATLFPREPKRCIKETTKOPLSLPLLETLAIDPVE  
RKTATDNLSEFFMTEPLACKPSSLFPYPPSEMDARRRDEARRLAANKAQDGVK  
KTRTRVRAIPAPANAEIQTNIDRRLITHANAKSKSEKFFPHDDGALGFTLGSRH  
NDPSGVPPPIFSSLFTYSKEPVQWSQPLVPGACTDAPPRKRVHVGKCRINV"

**ORIGIN**

```

1 atgggggtgt tggttagcgc agagcgcctc tctagaagt tagaaccccc ttagataac
61 ggaagagaga atcaaatcag ttagctcgtt gttcaagtc agcatgtcca ggaagaaga
121 ctggagcatg ttagtgctaa ttagagaggc catgcaaat tagacaaga ggaagagcag
181 aaggtgatg gtagtcagga ttaggacaga gtagagcggc gaaggtcaag gaaggtcca
241 agcctgata acttgcaca ccatccacag gtagcgaag ttgctctg agcctcatct
301 tggctcagc cagtcttgg gtagcctctc aatggttga tccaagga gctgatac
361 ttgaaaga ttagtaagt ttagcaaga acgtataga atgtatata gctaaagt
421 atacttagc gtaaaatgt tgcactgaag aagtttag ttgacaatc ggaacggaa
481 agtgtgaat ttatgctag agagatcta ctctctgga gattaaatca taataactt
541 tgaatagg agggttggt cacatgcgg gtgcttcta gttataact ggtgttag
601 tacatgaac atgatttagc ttgctctgct gaaatccat caatcaagt taagcaatc
661 caggttaal gttcatgca acaactgcta tctgactgg acaactgca caatgctat
721 gtgctcacc gtgatataa aggatcaat ctctcattg atagtgagg agtcttag
781 atgctgatt ttgattggc ttcttctct gatctaatc acagcaacc aatgactag
841 caggttgta cttatgta tgcactcct gaactcttc ttgagcaac tgattatga
901 gtatgttag acctctgag ttgctggtg atactgctg agttatagc tggagcct
961 attagcctc gcgctacaga gttgagcaa ctacaaga tacaagct ttgtgctcc
1021 cctcagatg aatattgaa aagacaagc ctccaagt caacattat taagccaga
1081 gaaccctata aaagatgat aaagagaca taaagattt tccgctatc ttctcgcc
1141 cttatagaaa cgtctctgc aattgacca gttgaacaa agacagcaac agatcatta
1201 aatagcagc tctcatgac agagccttta gttgcaaac ctctagctc cccgaatat
1261 cctccagta agagatgga tggtagaaga cggatgatg aagcccgag actaagaca
1321 gctacaagc cccagtgga tggatgag aaacacgca cagctgtag gcaattcca
1381 gctcctgag caaatgcaa aatacaaca aatatogata gaagcgcctt aattacacat
1441 gcaatgcaa agagcaaac gcaaatgct cccccacc accagagcgg agcgttggc
1501 ttaagctag gatattcac gcatatggt caatctggt ttctccca catacattc
1561 agctgagc ttgctacta ctctaaagg caatcgaag ttgctctg tcaactgctc
1621 cccggtgct gcaactgag tccactagg cagaagaag atgtggagg taaagcaag
1681 agaatcagg tctaa
//

```

Figura 44 Secuencia completa registrada en GenBank

### TRADUCCIÓN VIRTUAL DE LA SECUENCIA OBTENIDA

MGCLVSREASSRVEPPVDN GKRNOIT ESGVQVEHVOEKELEHVSANVEEHANVSKEEQKADGGODRPAERRRSRKVPR  
PVNLPNH SQGAQVAAGW PSWLTAVCGEALNGW IPRKADTFEKIDKIGOGT YSNVYKAKDILT GKIVALKKVRFDNLEPESV  
KFMAREILRLRLNHN NVKLEGLVTSRMSCSLYLVFEYMEHDLAGLAANPSIKFTESQVCKFMQQLLSGLEHCHNRHVLHRD  
IKGSNLLIDSGGVLKIADFGLAFFDPNHKHPMTSRVVT LWYRPELLLGATDYGVGVDLW SAGCILAELLAGRPIMPGRTEV  
EQLHKIYKLCGSPSEYWKRAKLPNAT LFKPREPYKRCIKET YKDFPLSSLPIETLLAIDPVERKTATDALNSEFFMT EPLACK  
PSSLPKYPPSKEMDARRRD DEARRLRAANKAOGDGVKKT RT RVRAIPAPEANAEIQT NIDRRRLITHANAKSKSEKFPPPHOD  
GALGFTLGYSRHMPSGVPPDI PFSSTLFTYSKEPVQVW SGPLVPGAGT DAPPRQKKHVGKGGKGRIMV\*

SR=Ser/Arg



Proteínas con SR son importantes en el ensamble del spliceosoma (Shepard and Hertel, 2009).

Varias proteínas interactúan con UI-70K, tales como SRZ22 y SRZ21 (Golovkin and Reddy, 1998)



Figura 45 Secuencia completa traducida de CmCDKP.

La secuencia de aminoácidos de CmCDKP contiene secuencias con aminoácidos serina y arginina (SR = Ser/Arg), como se puede observar en la figura 45. De acuerdo con Shepard y Hertel, 2009 estas regiones son importantes en el ensamble del spliceosoma y varias de estas proteínas también interactúan con la unidad UI-70K (Golobkin y Reddy, 1998)

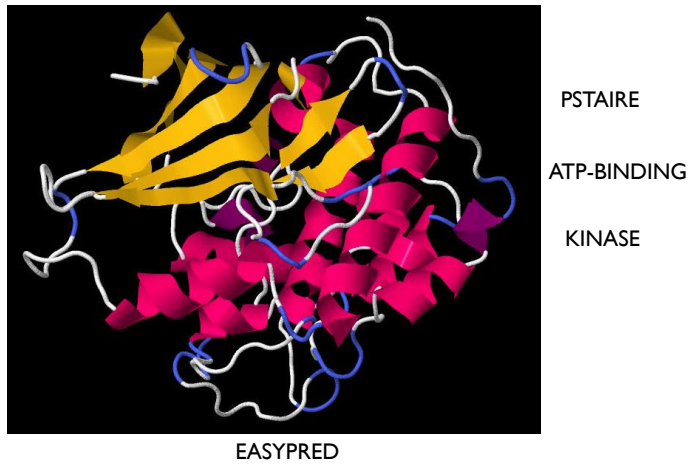


Figura 46 estructura 3D de CmCDKP

### Clonación del marco de lectura de *CmCDKP* y sus homólogos en *Arabidopsis* en un vector para sobreexpresión

Para la construcción del vector de sobre-expresión se extrajo RNA total de *Arabidopsis* y calabaza (Fig. 29), se amplificó utilizando los oligonucleótidos 5-SMART y dTGAGA, para la posterior LD-PCR. Además, se amplificó a partir de estos cDNAs como moldes, los marcos de lectura abiertos tanto para *Arabidopsis* como para calabaza por medio de PCR en gradiente de temperatura (Figuras 30 y 31). Se puede observar que se obtuvo el fragmento del tamaño esperado, de aproximadamente 1600pb para *Arabidopsis*.

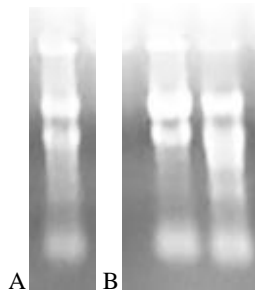


Figura 47 Extracción de RNA *Arabidopsis* (A) y Calabaza (B)

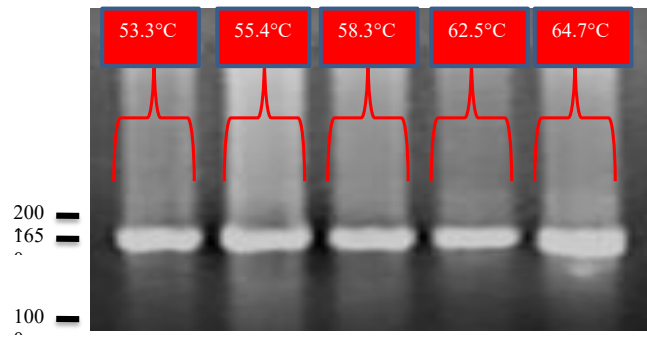


Figura 48 Producto de PCR en gradiente de temperatura del ORF de CDK de Arabidopsis a partir de cDNA

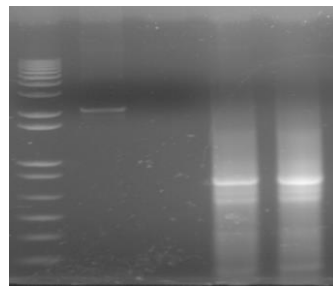


Figura 49 Producto de PCR del ORF de CDK de calabaza a partir de cDNA últimos carriles 3 y 4 bandas más intensa

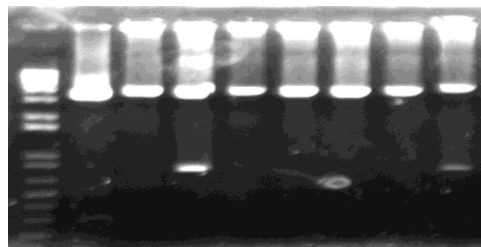


Figura 50 Corte con EcoRV para comprobar inserto del fragmento más cercano al 5' del ORF de calabaza

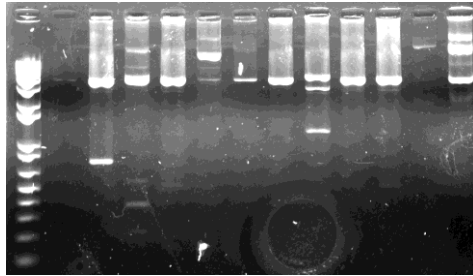


Figura 51 Corte con EcoRV para comprobar inserto del fragmento mas cercano al 3' del ORF de calabaza

### Resumen de las construcciones realizadas

Tipo de construcción	Tamaño del fragmento (pb)	Tipo de Vector	Huesped	Cepa	Medio/Resistencia
Promotor At1g54610 (Arabidopsis)	1500pb	p*GWFS7	<i>A. tumefaciens</i>	C58C I	Lb/Spc
Silenciamiento de Cmd19 (Calabaza)	300pb	pB7GW1WG2(II)	<i>A. tumefaciens</i>	C58C I	Lb/Spc
Silenciamiento de At1g54610 (Arabidopsis)	300pb	pB7GW1WG2(II)	<i>A. tumefaciens</i>	C58C I	Lb/Spc
ORF de Cmd19 (Calabaza)	1655pb	p*7FWG2	<i>A. tumefaciens</i>	C58C I	Lb/Spc
ORF de At1g54610 (Arabidopsis)	1719pb	p*7FWG2	<i>A. tumefaciens</i>	C58C I	Lb/Spc
Sonda para hibridación in situ (calabaza)	300pb	pCRII Topo	<i>E.coli</i>	Match	Ampicilina

Tabla 8 construcciones para el vector promotor, silenciamiento y de sobreexpresión.

Se sembraron plantas tanto de Arabidopsis como de calabaza para ser agro-inoculadas con los vectores promotor y silenciamiento (Fig. 32 y 33). Las plantas de calabaza y *Arabidopsis* fueron agro-inoculadas





Figura 52 Agro-inoculación transitoria en cotiledones de calabaza

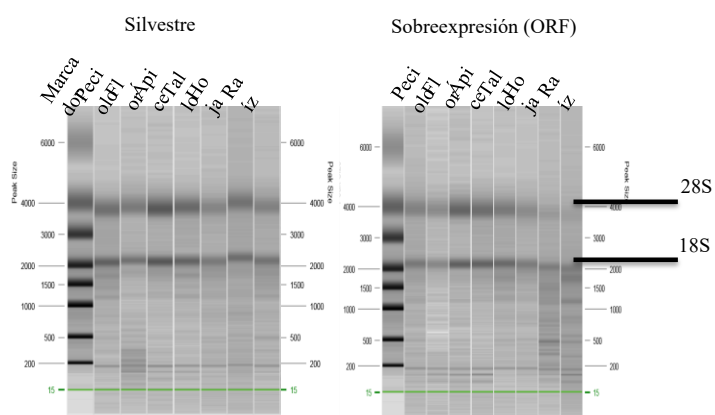


Figura 53 Producto de la extracción de RNAs de diferentes tejidos de calabaza.

### Análisis de expresión de *CmCDKP* en diferentes tejidos de calabaza por qRT-PCR.

Para determinar los niveles de transcrito de RNAm de *CmCDKP* se llevó a cabo un análisis cuantitativo por qRT-PCR en tiempo real. Los niveles más altos de acumulación de transcrito fueron encontrados en muestras de polen y hojas heterotróficas, y en menor medida en las de capullos de flor y savia (figura 26).

Estos resultados apoyan la idea de que *CmCDKP* puede tener un papel en la formación de polen, ya que otro miembro del clado CDK9 está implicado en la formación de la pared de polen a través de corte y empalme de calosa sintasa 5 mRNA (Huang *et al.*, 2013).

**Comentado [a18]:** Esto podría ir mejor en la discusión

Sorprendentemente, se encontraron niveles más bajos de acumulación de este transcrito en los tallos, los haces vasculares y exudados de savia del floema, a pesar de que el RNAm *CmCDKP* se encontró originalmente en exudados de savia del floema (Ruiz- Medrano *et al.*, 2007). Por lo tanto, es necesario analizar con más detalle el patrón de acumulación de dicho RNAm, lo que podría sugerir a su función en plantas adultas.

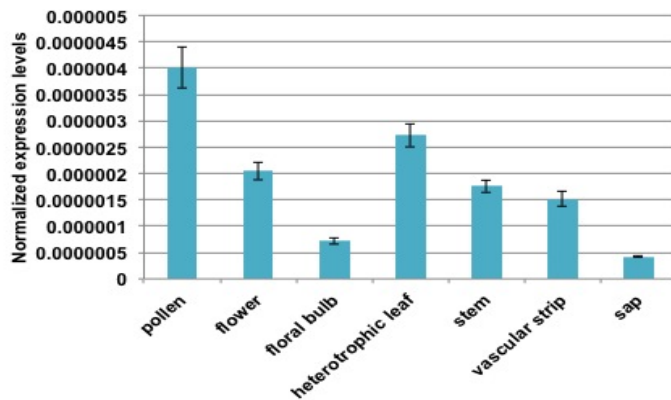


Figura 54 Análisis cuantitativo de acumulación de RNAm en diferentes tejidos de calabaza por qRT-PCR

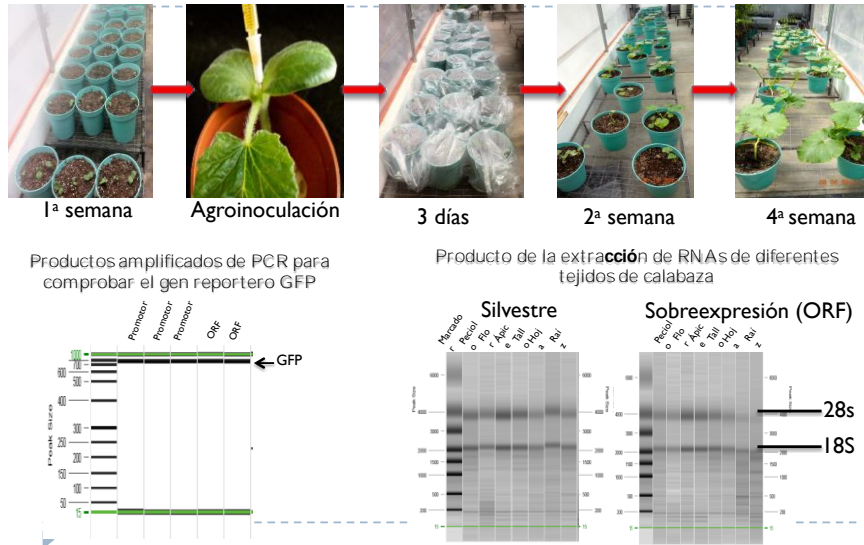


Figura 55 Transformación transitoria de calabaza y comprobación del transgen GFP

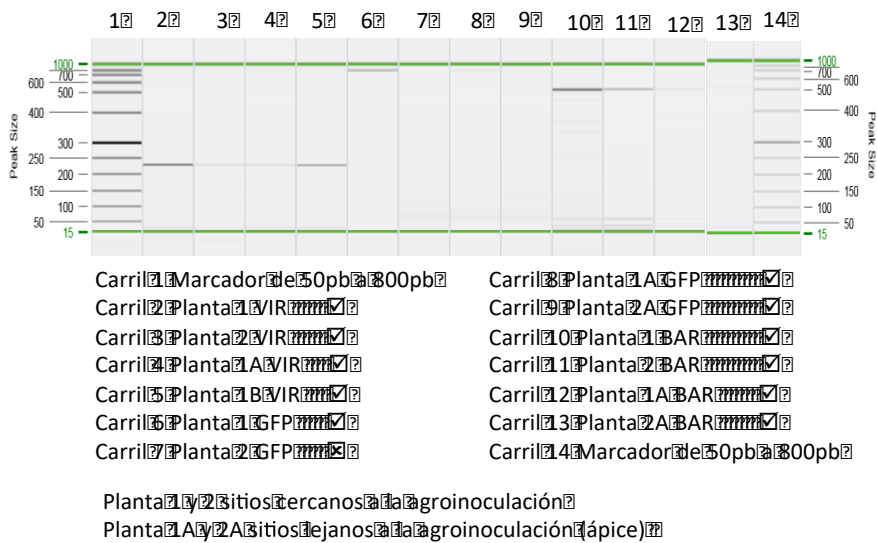


Figura 56 Gel Virtual comprobando los transgenes VIR, GFP y BAR en las plantas transformadas

## Actividad del Promotor

### Análisis histoquímico para identificar la actividad de GUS

Se analizó la actividad del promotor de Arabidopsis At1g54610.2 por transformación transitoria de calabaza, por medio de tinción de GUS.

**Comentado [a19]:** Te hace falta describir bastante más los resultados de esta sección

Corte  
transversal  
de  
anteras  
de  
calabaza



Figura 57 tinción de Gus de un corte transversal de anteras de calabaza

## Microscopía Confocal para análisis de la fusión CmCDKP-GFP en calabaza

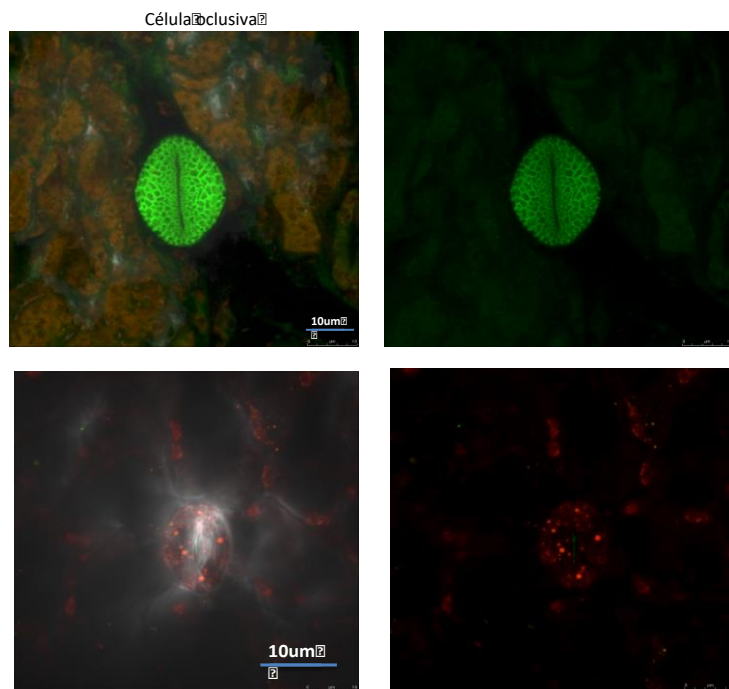


Figura 58 Estomas de plantas de calabaza transformadas con vector promotor de At1G54619 y controles silvestres.

### Hibridación *in situ* para detección del RNAm *CmCDKP* en calabaza

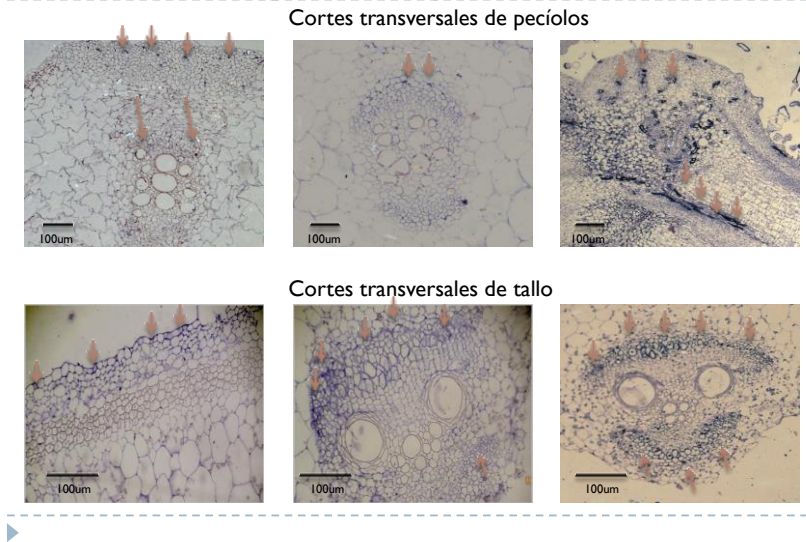


Figura 59 Detección por hibridación *in situ* del RNAm de *CmCDKP* en secciones transversales de pecíolo (parte superior) y de tallo de calabaza (parte inferior).

### Análisis Filogenético de *CmCDKP*

Para determinar las relaciones filogenéticas de *CmCDKP* con otras secuencias, y de esta manera tratar de inferir su función, se realizó un análisis filogenético con otras CDKs de plantas como son *Arabidopsis* y pepino. También se comparó con CDKs de humanos por ser estas últimas las CDKs de las que se tiene más información de su función así como secuencias completas en las bases de datos. El árbol filogenético se realizó por el método de Neighbor-Joining con 1000 bootstrap con el programa Mega 10.

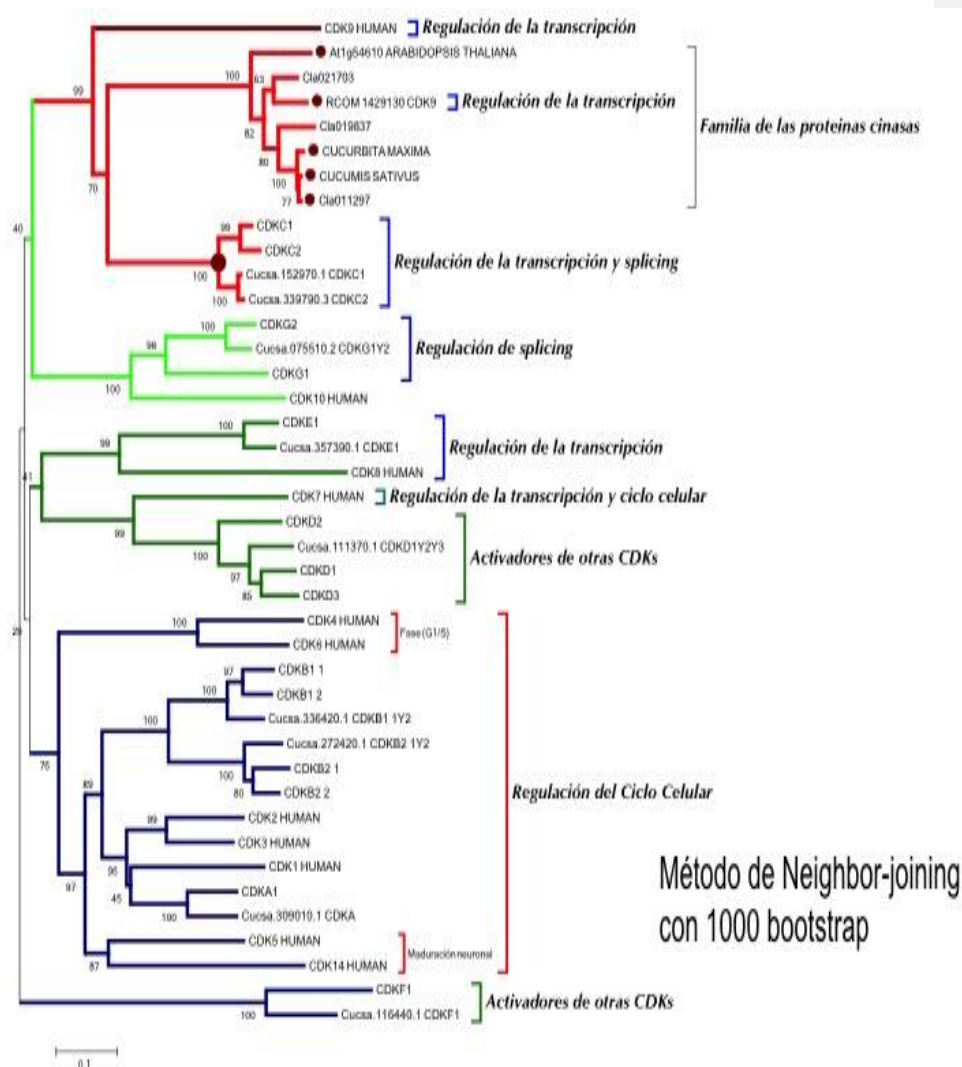


Figura 60 Análisis filogenético de CmCDKP en relación con otras CDKs

De acuerdo con este árbol filogenético, CmCDKP está más cercanamente relacionada con las CDKs que no están involucradas directamente en el ciclo celular; se puede observar que CmCDKP de calabaza se encuentra en el clado de la familia de las proteínas cinasas de CDKs que regulan la transcripción. También podemos observar que en humanos la CDK más cercana es la CDK9 y en plantas como pepino las CDKC que regulan la transcripción

así como el corte y empalme durante la maduración del RNA mensajero. Estas CDKs están involucradas en la elongación por fosforilación de la cola de dominio carboxi-terminal de la RNA polimerasa II (Tanny, 2014; Hidbring *et al.*, 2016)

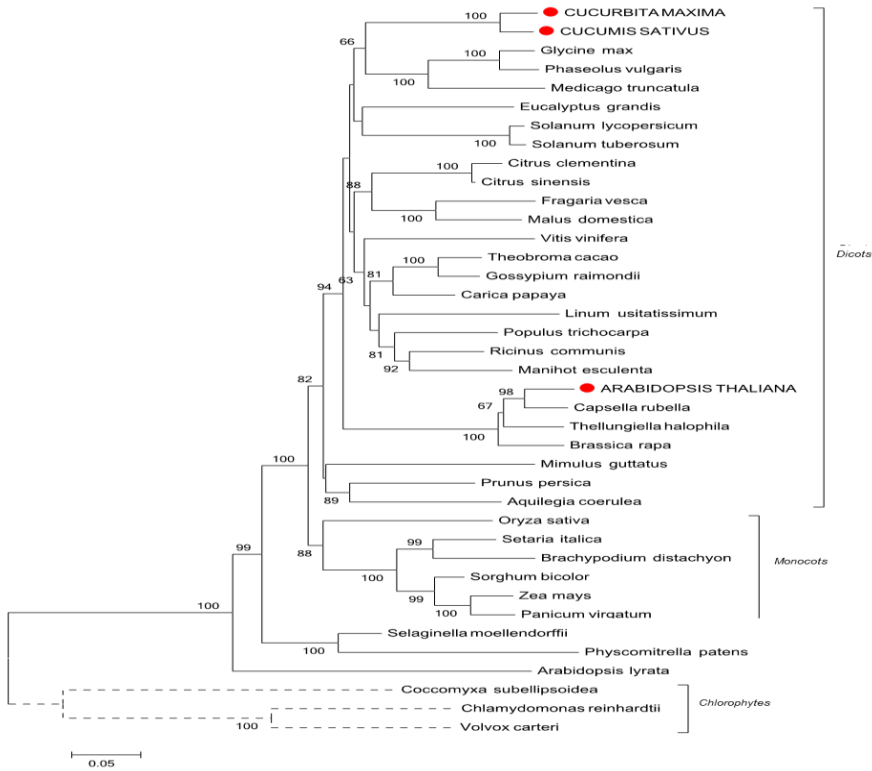


Figura 61 Análisis filogenético de CmCDKP en relación con CDKs de plantas.

Este segundo análisis filogenético que incluyó únicamente secuencias de plantas muestra que el clado CDK9 que contiene CmCDKP es bastante grande; un posible papel en la elongación de la transcripción sólo se puede asignar a estas proteínas por analogía ya que la mayoría de secuencias en este filogenia son hipotéticas (Figura 53). Otro miembro del clado CDK9, CDKC2 de Arabidopsis, colocaliza con componentes del spliceosoma y regula su distribución; Además, tienen un papel en la inmunidad a patógenos microbianos ya que median la respuesta a los efectores bacterianos (Kitsios *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2014).



## **CONCLUSIONES**

Las tejidos de peciolo, ápice y flor son los que obtuvieron mayor cantidad de RNAm correspondiente a la CDK de estudio en calabaza, probablemente porque son tejidos en desarrollo.

La secuencia traducida de CmCDKP sugiere una participación funcional en el ensamble del spliciosoma debido a las regiones SR contenidas en esta proteína (Shepard y Hertel, 2009).

CmCDKP esta estrechamente relacionada con las proteínas que regulan la transcripción en plantas y humanos (CDK C y CDK 9 respectivamente) así como el corte y empalme durante la maduración del RNAm.

Análisis histoquímico del promotor fusionado a GFP muestra acumulación de esta proteína en las anteras de flores y estomas de hojas, por lo que sugiere una participación en estos tejidos lo que podría ser en la maduración de RNAm de proteínas necesarias durante el desarrollo de estos tejidos.

## EXPOSICIONES Y ARTICULOS.

### Characterization of a pumpkin mRNA encoding a Cyclin-Dependent Protein Kinase (CDK) potentially involved in phloem development

Paul Starsky Herrera-Pola, Beatriz Xoconostle-Cázares, Roberto Toscano-Morales, Roberto Ruiz-Medrano\*

Department of Biotechnology and Bioengineering CINVESTAV-IPN, Ave. IPN 2508, Zacatenco, 07360 México DF, México

\*Corresponding author: rmedrano@cinvestav.mx

#### Abstract

The phloem is involved in the delivery of nutrients but also of long-range signals that regulate diverse processes. Several different RNAs have been found in the phloem translocation stream, which could have a role in signaling. In a previous work, we have found several RNAs in pumpkin phloem sap exudates in response to viral infection, among them a transcript encoding a potential cyclin-dependent protein kinase (CDK). In this study, we report the further characterization of the aforementioned CDK mRNA. The complete sequence of this mRNA, which we termed *CmCDKP* (for *Cucurbita maxima* CDK from Phloem), was obtained (GenBank no. AIQ82912.1). The phylogenetic analysis of the virtual translation of this sequence showed that *CmCDKP* is closely related to those involved in transcriptional regulation via RNA polymerase II CTD phosphorylation, or splicing control. The mRNA accumulated to highest levels in pollen tissue. Interestingly, the mRNA localized to the companion cell-sieve element complex in the phloem, developing phloem, and also in isolated cells in the shoot apical meristem, suggesting a role in early phloem development.

**Keywords:** RNA transport, Phloem development, CDKs, transcription regulation.  
**Abbreviations:** CDK, Cyclin-Dependent protein Kinase; CC-SE Companion Cell-Sieve Element complex.

#### Introduction

The vascular tissue was likely a powerful driving force behind the colonization of terrestrial habitats by plants, and also having an important role in its diversification. The most important function of the vasculature is nutrient transport, the xylem being involved in the distribution of water and mineral nutrients while the phloem of fixed carbon throughout the whole plant (Lough and Lucas, 2006; Lucas et al., 2013). The phloem consists mainly of two cell types, the companion cell (CC) and the enucleated sieve element (SE), which are interconnected through branched plasmodesmata (Lucas et al., 2013). The files of SEs form a network that effectively maintains distant parts of the plant communicated (Lucas et al., 2013). It has become increasingly clear, though, that the phloem is also involved in the delivery of signals that may regulate whole-plant development and response to environmental cues (Lough and Lucas, 2006; Kehr and Buhtz, 2008; Lucas et al., 2013). Potential long-range signals include phytohormones, proteins, lipids, and different types of RNA (miRNAs and small RNAs) (Lucas and Lough, 2006; Lucas et al., 2013). Flowering in response to photoperiod, tuberization, response to phosphate starvation and post-transcriptional gene silencing (PTGS) are examples of phloem-transported regulatory proteins and RNAs (Corbesier et al., 2007; Lin et al., 2007; Yoo et al., 2004; Kehr and Buhtz, 2008; Navarro et al., 2011). Massive long-distance transport of RNA in Arabidopsis and grapevine grafts, and between a parasite plant and its host suggests that this phenomenon is important

for plant viability, although its global physiological significance is not yet clear (Kim et al., 2014; Thieme et al., 2015; Yang et al., 2015).

We have previously reported that the phloem sap of Cucumber mosaic virus-infected *Cucurbita maxima* (pumpkin) cv. Big Max contains differentially-accumulated mRNAs, some of which could represent signals involved in establishing a defense response against pathogen attack (Ruiz-Medrano et al., 2007). In the present work we report further characterization of a differentially accumulated transcript coding for a putative Serine-Threonine protein kinase, possibly involved in signaling, a notion supported by the presence of the corresponding transcript in the phloem translocation stream. Here, we report the full-length sequence of the transcript, which was termed *CmCDKP* (for *Cucurbita maxima* Cyclin-Dependent Protein Kinase from Phloem) and corresponds to a Cyclin-dependent protein kinase (CDK). CDKs are key regulators of cell cycle progression in all eukaryotes, and in plants link phytohormone signaling and environmental cues to the cell cycle via phosphorylation of transcription factors that promote cell cycle progression (Joubès et al., 2001; Komaki and Sugimoto, 2012). There are several types of CDKs, which include non-canonical ones, whose main roles appear to regulate transcription elongation and splicing of genes that are not directly involved in cell cycle progression, as well as in modification of chromatin (Tanny et al., 2014; Hydrbring et al., 2016). Indeed, a closer

inspection of the sequence, as well as phylogenetic analysis supported the grouping of this protein with type C CDKs. These proteins do not regulate directly the cell cycle; rather, a role of some members of this clade in response to biotic and abiotic stress through regulation of transcription and/or splicing has been demonstrated (Huang et al., 2008; Kitsios et al., 2008; Li et al., 2014). On the other hand, the localization of this mRNA suggests an involvement in early vascular tissue and phloem development.

## Results and Discussion

### *CmCDKP* is phylogenetically related to CDKs involved in transcriptional regulation

We have previously reported the presence of an mRNA encoding a putative cyclin-dependent protein kinase (CDK) in phloem sap exudates of pumpkin experimentally infected with Cucumber mosaic virus using subtractive suppressive hybridization, which we termed *CmCDKP* (for *Cucurbita maxima* Cyclin-Dependent Protein Kinase from Phloem) (Ruiz-Medrano et al., 2007). A 433 bp cDNA fragment was originally cloned using this strategy; to obtain the full-length Open Reading Frame 5' and 3' RACE was used. For the latter a specific internal primer and an oligo dT-GAGA primer were used. As for the 5' end, after a general amplification step involving the SMART primer, several plant CDK protein sequences were aligned to obtain a more conserved consensus. Both the 5' and 3' RACE products were cloned and sequenced, and the full-length obtained by RT-PCR using specific primers. This sequence was aligned using ClustalX and subsequently analyzed to determine its relationship with other CDK sequences. Sequences from major plant species were retrieved and used to construct a phylogeny based on the Neighbor-Joining method (Fig. 1). According to this phylogeny, *CmCDKP* is more closely related to CDKs that may not be involved in cell cycle regulation. Indeed, the type member of this clade to which *CmCDKP* belongs, and which has been extensively studied, the human CDK9, which is part of the CDK9 family, has an important role in transcription elongation by interaction with and phosphorylation of the RNA polymerase II Carboxy-Terminal domain (CTD) (Tanny, 2014; Hydring et al., 2016). This analysis shows that the CDK9-like clade containing *CmCDKP* is quite large; a possible role in transcriptional elongation can only be assigned to these proteins by analogy since most sequences in this phylogeny are hypothetical. Another member of the CDK9 clade, CDK2 from *Arabidopsis*, colocalizes with spliceosomal components and regulates their distribution; further, they have a role in immunity to microbial pathogens since they mediate the response to bacterial effectors (Kitsios et al., 2008; Li et al., 2014). Indeed, it is becoming more evident that CDKs, and in particular non-canonical ones, have more diverse roles than previously thought, such as in immunity, regulation of cell death and DNA repair (Hydring et al., 2016). A more distant sequence relative to this clade, CDKG from *Arabidopsis*, regulates the splicing of callose synthase 5, involved in pollen wall formation (Huang et al., 2013). This supports the notion that members of these clades have a role in transcriptional elongation and splicing of certain transcripts. On the other hand, the induction of *CmCDKP* mRNA in response to CMV infection is consistent with a role in defense response to pathogen attack (Ruiz-Medrano et al., 2007).

### *CmCDKP* mRNA accumulates to highest levels in floral organs

Next, quantitative RT-PCR analysis was carried out to determine the transcript levels of *CmCDKP* mRNA. The highest levels found were in pollen and mature flowers, and, to lesser extent, in flower buds and source leaves (Figure 2). These results lend support to the notion that *CmCDKP* may have a role in pollen formation, since another member of the CDK9 clade is involved in the formation of pollen wall via splicing of callose synthase 5 mRNA (Huang et al., 2013). Surprisingly, lowest levels were found in stems, vascular strips and phloem sap exudates, even though *CmCDKP* mRNA was originally found in phloem sap exudates (Ruiz-Medrano et al., 2007). It was thus necessary to analyze with more detail the accumulation pattern of *CmCDKP* mRNA, which could hint to its function in adult plants.

### *CmCDKP* mRNA localizes to developing phloem and shoot apical meristem

Paraffin-embedded sections were hybridized with sense and antisense *in vitro* transcribed *CmCDKP* probe, which was labeled with digoxigenin. Sections from apices and petioles from four-week old pumpkin plants were analyzed with more detail. In the case of apical tissues, strong signal corresponding to this transcript was detected in isolated cells close to the meristem proper (Fig. 3B). In sections further away from the apex signal was detected in what appear to be vascular initials, while in leaf primordia the transcript was observed either in small clusters of cells or single isolated cells; in more basipetal regions the *CmCDKP* transcript clearly localizes to the CC-SE complex (Fig. 3C, D and I). These results suggest that the *CmCDKP* gene has a role in early vascular development. *CmCDKP* antisense transcripts yielded also a strong signal in developing and mature phloem from petiole and young stem cross sections (Fig. 3F and H). Interestingly, a specific signal was also detected in the extrafascicular developing phloem (Fig. 3J and K). It must be mentioned that it has been suggested that in cucurbits photoassimilates are distributed through the internal phloem, while the external phloem could be involved in long-distance signaling (Wang et al., 2010). Furthermore, *CmNACPI* mRNA is transmitted through a graft union from a pumpkin stock to a cucumber scion via the extrafascicular phloem (Ruiz-Medrano et al., 1999), which is again consistent with a role in phloem long-distance signaling. *CmCDKP* could be involved in development of extrafascicular phloem, but given that the mRNA apparently localizes also to sieve elements here, a role in signaling cannot be discarded. It has recently been envisaged that certain CDKs have role that may not be related directly to cell cycle regulation (Hydring et al., 2016). Indeed, in the case of mammalian CDKs, only a few have been shown to be involved in such activity; as mentioned before, members of several types of CDKs have a more direct role in splicing and/or transcriptional regulation, although this has been elucidated for only a few species. Thus, it is necessary the analysis of CDKs from diverse organisms to search for general functions of these proteins, if any.

**Table 1.** Accession numbers of protein sequences used to construct CmCDKP phylogeny.

Name or sequence ID	Genbank Accession number	Organism
CmCDKP	KM058713.1	<i>Cucurbita maxima</i>
Cucsa.289140.1	XP_004135651.1	<i>Cucumis sativus</i>
ATI.G54610.1	NP_175862.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Manes.09G159000.2.p	CK650678.1	<i>Manduca esculenta</i>
LOC288455	XP_002512278	<i>Lycium communis</i>
Lus10004144	N.D.	<i>Linum usitatissimum</i>
Potr1.005G045500.1	XP_006382713.1	<i>Populus trichocarpa</i>
Medtr7g114300.1	XP_003626368.1	<i>Medicago truncatula</i>
Phvul.006G097500.1	XP_007147119.1	<i>Phaseolus vulgaris</i>
Glyma03g40330.1	XP_003521735.1	<i>Glycine max</i>
psa003511m	XP_007222466.1	<i>Prunus persica</i>
MDP0000742986	XP_008388632.1	<i>Malus x domestica</i>
101304233	XP_004289615.1	<i>Fragaria vesca</i>
ARALYDRAFT_495150	XP_002865826.1	<i>Arabidopsis lyrata</i>
Carubv10020060m	XP_006302071.1	<i>Capsella rubella</i>
Bra027966	XP_009113426.1	<i>Brassica rapa</i>
Thhalv10023378m	XP_006392507.1	<i>Thellungiella halophila</i>
evm.TU.contig_28523.3	EX233665.1	<i>Carica papaya</i>
Gora1.007G287200.3	XP_012492925	<i>Gossypium raimondii</i>
Euegr.1033769.1	XP_010024564.1	<i>Eucalyptus grandis</i>
Solye01g098160.2	XP_004230142.1	<i>Solanum lycopersicum</i>
PGSC0003DMT400027661	XP_006342740.1	<i>Solanum tuberosum</i>
Ciclev10000698m	XP_006433109.1	<i>Citrus Clementina</i>
orange1.1g018936m	KD057098.1	<i>Citrus sinensis</i>
GSVIVT01021907001	XP_002273085.1	<i>Vitis vinifera</i>
Theec1EG0264442	XP_007030691.1	<i>Theobroma cacao</i>
Migt.N00122.1	XP_012841047.1	<i>Mimulus guttatus</i>
Auca 003_00886.3	N.A.	<i>Austroblechna coarctata</i>
LOC_0407g47180.1	XP_015647038.1	<i>Oryza sativa</i>
Seita.2G424100.1	XP_012699221.1	<i>Setaria italica</i>
Bra01g18450.1	XP_003562490.1	<i>Brachypodium distachyon</i>
Sohic.001G372900.1	KXG39386.1	<i>Sorghum bicolor</i>
GRMZM5G873277	XP_008670639.1	<i>Zea mays</i>
Pavir.B03658.1	XP_010105022.1	<i>Panicum virgatum</i>
Pp3e9_21750V3.3	XP_001784887.1	<i>Physcomitrella patens</i>
145457	XP_002968148.1	<i>Selaginella moellendorffii</i>
36844	XP_005647315.1	<i>Coccomyxa subellipsoidea</i>
Cre10.g465900.1.2	XP_001698637.1	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
Vocat.00080098.1	XP_002954450.1	<i>Volvox carterii</i>

**Materials and Methods****Plant material**

*Cucurbita maxima* Big Max seeds (RH Shumway's, Randolph, WI) were placed in germination trays containing cotton saturated with water and maintained in a greenhouse until germination, usually for 1 week. Seedlings were then transferred to pots with 5 kg of soil (mixed) and irrigated with nutrient solution every 3 days until used.

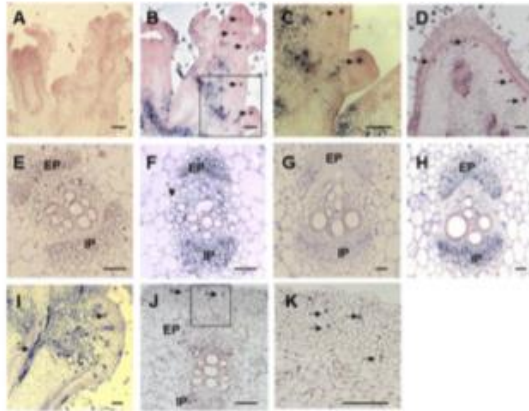
**Cloning procedures and quantitative RT-PCR analysis**

To obtain the full-length *CmCDKP* open reading frame (ORF), 100 mg of pumpkin petiole tissue was disrupted using a TissueLysor LT (Qiagen, Hilden, Germany), and RNA extracted using an RNeasy kit (Qiagen), essentially following the manufacturer's recommendations. The RNA was eluted with 50 µl ddH<sub>2</sub>O at a concentration of 100 µg/ml. 10<sup>-6</sup> µg/ml dilutions of were used as template for cDNA synthesis using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, La Jolla CA). 5'- and 3'-RACE using dTGAGA and SMART primers according to Diatchenko et al. (1996). The 5'-end of the *CmCDKP* ORF was obtained using as reverse primer a

sequence within the original *CmCDKP* fragment obtained by subtractive cloning (Ruiz-Medrano et al., 2007) (5'-TTTCGGGAGGCTAGAGGGTTGCAAGC-3'). The forward primer was designed based on the alignment of the 5' ends of the closest homologues of *CmCDKP* in *Cucumis melo*, *Cucumis sativus*, and *Arabidopsis* (NCBI accession Nos. XP\_008450739.1 and XP\_004135651.1, respectively) (sequence 5'-ATGGGGTGTYYTGGTTAGCCGAGAGGCGTCTTCTAGA-3'). The 3'-end of the sequence was obtained using as forward primer a sequence within the aforementioned original *CmCDKP* fragment (Cm19 REV2, 5'-AGCGAGTCTTCATGACAGAGCCTTAGCTTGC-3') and as reverse primer the dTGAGA primer. cDNA was first synthesized using Superscript II Reverse Transcriptase, followed by RACE using Takara Taq polymerase (Takara Bio, Japan), both following the manufacturer's instructions. The conditions for the 5' and 3' RACE were essentially the same, as follows. One cycle of denaturing, 3 min at 94°C, followed by 35 cycles of denaturing for 35 sec at 94°C, annealing for 35 sec at 56°C and polymerization for 1 min 45 sec at 72°C, with a final extension step of 7 min also at 72°C. The resulting PCR products were cloned in the pDrive vector (Qiagen), and sequenced.







**Fig 3.** *In situ* localization of *CmCDKP* mRNA in different tissues. A, longitudinal section of apex of immature flower hybridized with digoxigenin-labeled sense *CmCDKP* RNA probe. B, same as A, but hybridized with antisense probe. Arrows indicate hybridization signal in isolated cells or groups of cells close to the apex. C, magnification of the area within the small rectangle in B. D, sagittal section of region close to the apex hybridized to antisense *CmCDKP* probe; signal in phloem cells is indicated by arrows. E, cross section of petiole of heterotrophic leaf hybridized with sense *CmCDKP* probe. F, cross section of petiole hybridized to antisense probe. G, cross section of stem close (10 cm) to the apex, hybridized to sense *CmCDKP* probe. H, same as G, but hybridized to antisense probe. I, sagittal section of stem close to the apex, hybridized with antisense *CmCDKP* probe, which includes part of an emerging petiole. Arrows indicate phloem cells. J, Cross section of a petiole of a mature leaf hybridized with antisense *CmCDKP* probe. Arrows indicate extrafascicular phloem. K, enlarged image showing details of the area in the small rectangle. Arrows indicate individual companion cell/sieve element pairs. Bar is 100  $\mu\text{m}$  in all cases, except in D and I, in which it is 200  $\mu\text{m}$ .

For RT-PCR analysis, *CmCDKP* RNA levels were determined as follows. Total RNA was extracted from tissues from five independent plants, 50 mg for each tissue (pollen, leaves, stems, apex, flower buds and mature flowers), pooled, and used for one-step RT-PCR (10ng in a 10 $\mu\text{L}$  reaction). In the case of phloem sap exudates, RNA was isolated as described previously (Ruiz-Medrano et al., 1999). A commercial system was used according to the manufacturer's recommendations (KAPA SYBR FAST Universal One-Step qRT-PCR Kit). Specific primers used for *CmCDKP* were: *CmD19* FOR, 5'-GTGGCTCCCTTCAGATGAATATTGGA-3', and *CmDREV2*. The Real Time RT-PCR reactions were incubated in a RotorGene 3000 apparatus (Corbett Research, Australia) using the following PCR conditions: 5 min at 42°C for reverse transcription followed by 3 min at 95°C with 45 cycles of denaturation (95°C for 3s), annealing (58°C for 20s), and extension (72°C for 3s). To verify that no additional products were amplified in the reaction, a dissociation curve was generated progressive sample heating (60–95°C). The Ct value for each product was determined by triplicate for each tissue sample. 18S rRNA was used to normalize gene expression; the primers used were: 18S FOR, 5'-GCCCGGTAATCTTTGAAATTCAT-3'; 18S REV, 5'-GTGTGTACAAAGGCAGGGACGTA-3'. Relative quantification of transcript accumulation was performed according to the 2- $\Delta\Delta\text{CT}$  method described by Livak and

Schmittgen (2001). Three repeats were analyzed per tissue.

#### ***In situ* hybridization**

Tissues from 4-week-old pumpkin plants were excised, fixed, dehydrated and paraffin-embedded, as previously described (Ruiz-Medrano et al., 1999). The original *CmCDKP* fragment was PCR amplified using specific primers (*CmD19* forward 5'-GTGGAGCAACTACACAAGATATACAAGC-3' and *CmD19* reverse 5'-CATCTCCTTACTGGGAGGAT-3') and cloned in the pDrive vector (Qiagen). Sense and antisense riboprobes of this fragment were labeled with digoxigenin-11-UTP (Roche, México) from linearized plasmid using the Maxiscript T7/Sp6 commercial system, following the manufacturer's recommendations (Ambion, Austin, TX).

#### **Phylogenetic analysis**

Protein sequences of CDKs were retrieved from Genbank and Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) and aligned using ClustalW Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). For *CmCDKP*, this sequence was virtually translated using the Sequence Manipulation Suite (<http://www.bioinformatics.org/sms2/>) and included in this analysis. A phylogenetic tree was then constructed using Mega 5.1 and the Neighbor-Joining method (Saitou and Nei, 1987). The accession numbers of the sequences utilized in this analysis are listed in Table 1.

## Conclusion

In the present work we characterized the mRNA for a phloem-expressed Cyclin-Dependent Protein Kinase, termed CmCDKP. Analysis of its sequence indicates that it belongs to a clade whose type member, CDK9, functions in transcriptional regulation via phosphorylation of RNA Pol II CTD. Other close members of this clade are engaged in splicing of specific genes, such as CAL5, necessary for pollen wall formation. A similar role for CmCDKP could thus be suggested. In this particular case, however, a role in early vascular tissue differentiation seems also likely, given the localization of this mRNA in isolated cells close to the apex, as well as in leaf primordia. Sagittal sections close to the apex suggest that these cells become vascular tissue, which evidently become phloem tissue as observed in petioles of mature leaves (Fig.) 3B. A role in long-distance signaling is also suggested by the presence of CmCDKP mRNA in external phloem SEs. More work is required to determine whether the protein localizes to these same cell types. Also, analysis of the mutant of the Arabidopsis homologue, At1g54610, will yield valuable insight on the function of this, and related genes.

## Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Acknowledgements

This work was supported by CONACYT grants nos. 105985 and 156162 to BX-C and RR-M, respectively. PSH-P and RT-M acknowledge fellowship support from CONACYT México.

## Authors' contributions

RR-M and BX-C designed the experiments, coordinated the work, carried out plant transformation experiments, and wrote the manuscript; PSH-P and BX-C carried out plant transformation assays, PSH-P and RT-M performed quantitative PCR and quantitative RT-PCR assays, and RR-M and BX-C carried out *in situ* hybridization experiments. All authors read and approved the final version of the manuscript.

## References

- Banerjee AK, Chatterjee M, Yu Y, Suh SG, Miller WA, Hannapel DJ (2006) Dynamics of a mobile RNA of potato involved in a long-distance signaling pathway. *Plant Cell* 18: 3443-3457.
- Corbesier L, Vincent C, Jang S, Fornara F, Fan Q, Searle I, Giakountis A, Farrona S, Gissot L, Turnbull C, Coupland G (2007) FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of Arabidopsis. *Science* 316: 1030-1033.
- Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD (1996) Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 6025-6030.
- Giavalisco P, Kapitzka K, Kolasa A, Bultz A, Kehr J (2006) Towards the proteome of Brassica napus phloem sap. *Proteomics* 6: 896-909.
- Huang XY, Niu J, Sun MX, Zhu J, Gao JF, Yang J, Zhou Q, Yang ZN (2013) CYCLIN-DEPENDENT KINASE G1 is associated with the spliceosome to regulate CALLOSE SYNTHASE5 splicing and pollen wall formation in Arabidopsis. *Plant Cell* 25: 637-648.
- Huang YW, Tsay WS, Chen CC, Lin CW, Huang HJ (2008) Increased expression of the rice C-type cyclin-dependent protein kinase gene, *Oryza.CDKC1*, in response to salt stress. *Plant Physiol Biochem* 46: 71-81.
- Hydbring P, Malumbres M, Sicinski P (2016) Non-canonical functions of cell cycle cyclins and cyclin-dependent kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17: 280-292.
- Joubès J, Lemaire-Chamley M, Delmas F, Walter J, Herneault M, Mouras A, Raymond P, Chevalier C (2001) A new C-type cyclin-dependent kinase from tomato expressed in dividing tissues does not interact with mitotic and G1 cyclins. *Plant Physiol* 126: 1403-1415.
- Karimi M, Inzé D, Depicker A (2002) GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* 7: 193-195.
- Kehr J, Bultz A (2008) Long distance transport and movement of RNA through the phloem. *J Exp Bot* 59: 85-92.
- Kim G, LeBlanc ML, Wafiq EK, dePamphilis CW, Westwood JH (2014) Plant science. Genomic-scale Exchange of mRNA between a parasitic plant and its hosts. *Science* 345: 808-811.
- Kitsios G, Alexiou KG, Bush M, Shaw P, Doonan JH (2008) A cyclin-dependent protein kinase, CDK2, colocalizes with and modulates the distribution of spliceosomal components in Arabidopsis. *Plant J* 54: 220-235.
- Kornaki S, Sugimoto K (2012) Control of the plant cell cycle by developmental and environmental cues. *Plant Cell Physiol* 53: 953-964.
- Li F, Cheng C, Cui F, de Oliveira MV, Yu X, Meng X, Inierne AC, Bahilomli K, Li M, Li B, Chen S, Ma X, Xiao S, Zheng Y, Fei Z, Metz RP, Johnson CD, Kaiwa H, Sun W, Li Z, de Souza Filho GA, Shan L, He P (2014) Modulation of RNA polymerase II phosphorylation downstream of pathogen perception orchestrates plant immunity. *Cell Host Microbe* 16: 748-758.
- Lin MK, Belanger H, Lee YJ, Varkonyi-Gasic E, Tanka K, Misra E, Xocostele-Cázares B, Gendler K, Jorgensen RA, Phinney B, Lough TJ, Lucas WJ (2007) FLOWERING LOCUS T protein may act as the long-distance florigenic signal in the cucurbits. *Plant Cell* 19: 1488-1506.
- Lin MK, Lee YJ, Lough TJ, Phinney BS, Lucas WJ (2009) Analysis of the pumpkin phloem proteome provides insights into angiosperm sieve tube function. *Mol Cell Proteomics* 8: 343-356.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408.
- Lucas WJ, Groover A, Lichtenberger R, Furuta K, Yadav SR, Helariutta Y, He XQ, Fukuda H, Kang J, Brady SM, Patrick JW, Sperry J, Yoshida A, López-Millán AF, Grusak MA, Kachroo P (2013) The plant vascular system: evolution, development and functions. *J Integr Plant Biol* 55: 294-388.
- Lough TJ, Lucas WJ (2006) Integrative plant biology: role of phloem long-distance macromolecular trafficking. *Annu Rev Plant Biol* 57: 203-232.
- Navarro C, Abela JA, Cruz-Oró E, Cuéllar CA, Tamaki S, Silva J, Shimamoto K, Prat S (2011) Control of flowering and storage organ formation in potato by FLOWERING LOCUS T. *Nature* 478: 119-122.
- Ruiz-Medrano R, Hinojosa-Muñoz JJ, Xocostele-Cázares B,

- Lucas WJ (2007) Influence of Cucumber mosaic virus infection on the mRNA population present in the phloem translocation stream of pumpkin plants. *Funct Plant Biol.* 34: 292-301.
- Ruiz-Medrano R, Xoconostle-Cázares B, Lucas WJ (1999) Phloem Long-Distance Transport of *CmNACP-1* mRNA: Implications for Supracellular Regulation in Plants. *Development.* 126: 4405-4419.
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 4: 406-425.
- Tanny JC (2014) Chromatin modification by the RNA Polymerase II elongation complex. *Transcription.* 5: e988093.
- Thieme CJ, Rojas-Triana M, Stecyk E, Schudoma C, Zhang W, Yang L, Miñambres M, Walther D, Schulze WX, Paz-Ares J, Scheible W-R, Kragler F (2015) Endogenous Arabidopsis messenger RNAs transported to distant tissues. *Nature Plants* 1: 1-7.
- Yang Y, Mao L, Jitayasothon Y, Kang Y, Jiao C, Fei Z, Zhong GY (2015) Messenger RNA exchange between scions and rootstocks in grafted grapevines. *BMC Plant Biol.* 15: 251.
- Yoo BC, Kragler F, Varkonyi-Gasic E, Haywood V, Archer-Evans S, Lee YM, Lough TJ, Lucas WJ (2004) A systemic small RNA signaling system in plants. *Plant Cell* 16: 1979-2000.



## APÉNDICE A EXTRACCIÓN DE ACIDOS NUCLEICOS CON LA MARCA QIAGEN.

### Protocol: Purification of Total DNA from Plant Tissue (Mini Protocol)

#### Important points before starting

- If using the DNeasy Plant Mini Kit for the first time, read “Important Notes” (page 14).
- Ensure that you are familiar with operating the TissueRuptor or the TissueLyser. See “Disruption and homogenization using the TissueRuptor”, page 15, or “Disruption and homogenization using the TissueLyser System”, page 15. Refer to the *TissueRuptor User Manual* or the *TissueLyser Handbook* for operating instructions.
- Buffer AP1 may develop a yellow color upon storage. This does not affect the procedure.
- All centrifugation steps are carried out at room temperature (15–25°C) in a microcentrifuge.

#### Things to do before starting

- Buffer AP1 and Buffer AW1 concentrate may form precipitates upon storage. If necessary, warm to 65°C to redissolve (before adding ethanol to Buffer AW1). Do not heat Buffer AW1 after ethanol has been added.
- Buffer AW2 and Buffer AW1 are supplied as concentrates. Before using for the first time, add the appropriate amount of ethanol (96–100%) as indicated on the bottle to obtain a working solution.
- Preheat a water bath or heating block to 65°C.

#### Procedure

1. For disruption using the TissueRuptor, follow step 2; for disruption using the TissueLyser, follow steps 3–6.

Alternatively, plant or fungal tissue can be ground to a fine powder under liquid nitrogen using a mortar and pestle. Transfer the tissue powder and liquid nitrogen to an appropriately sized tube and allow the liquid nitrogen to evaporate. Do not allow the sample to thaw. Proceed immediately to step 7.

2. **TissueRuptor procedure:** Place the sample material ( $\leq 100$  mg wet weight or  $\leq 20$  mg lyophilized tissue) into a 2 ml microcentrifuge tube. Add liquid nitrogen to the tube, and freeze the sample for 30 s. Keep the sample submerged in liquid nitrogen, and disrupt for approximately 30 s at full speed. Allow the liquid nitrogen to evaporate, and proceed immediately to step 7.

Alternatively, fresh or lyophilized material can be directly disrupted in lysis buffer (after step 7) without using liquid nitrogen, but this may cause shearing of high-molecular-weight DNA. We do not recommend disrupting frozen material in lysis buffer as this can result in low yields and degraded DNA.

3. **Tissuelyser procedure:** Place the sample material ( $\leq 100$  mg wet weight or  $\leq 20$  mg lyophilized tissue) into a 2 ml safe-lock microcentrifuge tube, together with a 3 mm tungsten carbide bead. Freeze the tubes in liquid nitrogen for 30 s.

When using lyophilized tissue, the tubes do not need to be frozen in liquid nitrogen.

4. Place the tubes into the Tissuelyser Adapter Set 2 x 24, and fix into the clamps of the Tissuelyser. Immediately grind the samples for 1 min at 30 Hz.
5. Disassemble the adaptor set, remove the tubes, and refreeze in liquid nitrogen for 30 s.

When using lyophilized tissue, the tubes do not need to be frozen in liquid nitrogen.

6. Repeat step 4, reversing the position of the tubes within the adaptor set. Proceed immediately to step 7.

To prevent variation in sample homogenization, the adaptor sets should be removed from the Tissuelyser and disassembled after the first disruption step. For the second disruption step, the adaptor sets should be reassembled so that the tube order is reversed. Rotating the racks of tubes in this way ensures that all samples are thoroughly and equally disrupted.

**Note:** The majority of plant tissue is ground to a fine powder after 2 disruption steps, however, for some materials one disruption step may be sufficient. Other tissues, such as seeds and roots, may require disruption steps. Optimization of the disruption procedure may be required for some plant material.

7. Add 400  $\mu$ l Buffer AP1 and 4  $\mu$ l RNase A stock solution (100 mg/ml) to a maximum of 100 mg (wet weight) or 20 mg (dried) disrupted plant or fungal tissue and vortex vigorously.

No tissue clumps should be visible. Vortex or pipet further to remove any clumps. Clumps of tissue will not lyse properly and will therefore result in a lower yield of DNA. In rare cases, where clumps cannot be removed by pipetting and vortexing, a disposable micropestle may be used.

**Note:** Do not mix Buffer AP1 and RNase A before use.

8. **Incubate the mixture for 10 min at 65°C. Mix 2 or 3 times during incubation by inverting tube.**

This step lyses the cells.

9. **Add 130  $\mu$ l Buffer P3 to the lysate, mix, and incubate for 5 min on ice.**

This step precipitates detergent, proteins, and polysaccharides.

10. **Recommended: Centrifuge the lysate for 5 min at 20,000  $\times$  g (14,000 rpm).**

Some plant materials can generate very viscous lysates and large amounts of precipitates during this step. This can result in shearing of the DNA in the next step (see "Lysate filtration with QIAshredder", page 19). In this case, optimal results are obtained if the majority of these precipitates are removed by centrifugation for 5 min at 20,000  $\times$  g (14,000 rpm). After centrifugation, apply supernatant to QIAshredder Mini spin column and continue with step 11.

11. **Pipet the lysate into the QIAshredder Mini spin column (lilac) placed in a 2 ml collection tube, and centrifuge for 2 min at 20,000  $\times$  g (14,000 rpm).**

It may be necessary to cut the end off the pipet tip to apply the lysate to the QIAshredder Mini spin column. The QIAshredder Mini spin column removes most precipitates and cell debris, but a small amount will pass through and form a pellet in the collection tube. Be careful not to disturb this pellet in step 12.

12. **Transfer the flow-through fraction from step 11 into a new tube (not supplied) without disturbing the cell-debris pellet.**

Typically 450  $\mu$ l of lysate is recovered. For some plant species less lysate is recovered. In this case, determine the volume for the next step.

13. **Add 1.5 volumes of Buffer AW1 to the cleared lysate, and mix by pipetting.**

For example, to 450  $\mu$ l lysate, add 675  $\mu$ l Buffer AW1. Reduce the amount of Buffer AW1 accordingly if the volume of lysate is smaller. A precipitate may form after the addition of Buffer AW1, but this will not affect the DNeasy procedure.

**Note:** Ensure that ethanol has been added to Buffer AW1. See "Things to do before starting", page 22.

**Note:** It is important to pipet Buffer AW1 directly onto the cleared lysate and to mix immediately.

14. **Pipet 650  $\mu$ l of the mixture from step 13, including any precipitate that may have formed, into the DNeasy Mini spin column placed in a 2 ml collection tube (supplied). Centrifuge for 1 min at  $\geq 6000 \times$  g (corresponds to  $\geq 8000$  rpm for most microcentrifuges), and discard the flow-through.\* Reuse the collection tube in step 15.**

15. **Repeat step 14 with remaining sample. Discard flow-through\* and collection tube.**

\* Flow-through fractions contain Buffer AW1, and are therefore not compatible with bleach. See page 6 for safety information.



16. Place the DNeasy Mini spin column into a new 2 ml collection tube (supplied), add 500  $\mu$ l Buffer AW2, and centrifuge for 1 min at  $\geq 6000 \times g$  ( $\geq 8000$  rpm). Discard the flow-through and reuse the collection tube in step 17.

**Note:** Ensure that ethanol is added to Buffer AW2. See "Things to do before starting", page 22.

17. Add 500  $\mu$ l Buffer AW2 to the DNeasy Mini spin column, and centrifuge for 2 min at  $20,000 \times g$  (14,000 rpm) to dry the membrane.

It is important to dry the membrane of the DNeasy Mini spin column since residual ethanol may interfere with subsequent reactions. This centrifugation step ensures that no residual ethanol will be carried over during elution. Discard flow-through and collection tube.

After washing with Buffer AW2, the DNeasy Mini spin column membrane is usually only slightly colored. In the rare case that the membrane remains significantly colored after washing with Buffer AW2, refer to "Darkly colored membrane or green/yellow eluate after washing with Buffer AW2" in the Troubleshooting Guide on page 43.

**Note:** Following the centrifugation, remove the DNeasy Mini spin column from the collection tube carefully so the column does not come into contact with the flow-through, as this will result in carryover of ethanol.

18. Transfer the DNeasy Mini spin column to a 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tube (not supplied), and pipet 100  $\mu$ l Buffer AE directly onto the DNeasy membrane. Incubate for 5 min at room temperature (15–25°C), and then centrifuge for 1 min at  $\geq 6000 \times g$  ( $\geq 8000$  rpm) to elute.

Elution with 50  $\mu$ l (instead of 100  $\mu$ l) increases the final DNA concentration in the eluate significantly, but also reduces overall DNA yield. If larger amounts of DNA (>20  $\mu$ g) are loaded, eluting with 200  $\mu$ l (instead of 100  $\mu$ l) increases yield. See "Elution", page 19.

19. Repeat step 18 once.

A new microcentrifuge tube can be used for the second elution step to prevent dilution of the first eluate. Alternatively, the microcentrifuge tube can be reused for the second elution step to combine the eluates. See "Elution", page 19.

**Note:** More than 200  $\mu$ l should not be eluted into a 1.5 ml microcentrifuge tube because the DNeasy Mini spin column will come into contact with the eluate.

# QIAcube | Protocol Sheet

## General Information (April 2010)

<b>Application</b>	DNA
<b>Kit</b>	DNeasy® Plant Mini Kit
<b>Sample material</b>	Plant cells and tissues
<b>Short protocol name</b>	Standard
<b>Version</b>	2
<b>Full protocol name</b>	Purification of total DNA from plant cells and tissues
<b>Editable parameters</b>	Elution volume 1: 50–100 µl in increments of 50 µl; default 100 µl Elution volume 2: 50–100 µl in increments of 50 µl; default 100 µl
<b>Required QIAcube® software versions</b>	Firmware version FIW-50-001-J_FW_MB.hex and PLC program version FIW-50-002-G_PLC_MB.prs or higher; available from the QIAcube Web Portal

## Shaker

<b>Material</b>	Lysate from up to 100 mg fresh or up to 20 mg dried or lyophilized plant material. For detailed information about lysate preparation, see "Comments" on next page.
<b>Vessel</b>	2 ml safe-lock microcentrifuge tube*
<b>Adapter</b>	Shaker adapter for 2 ml microcentrifuge tubes (marked with "2")

\* Sample Tubes RB, 2 ml (cat. no. 990381); see [www.qiagen.com/MyQIAcube](http://www.qiagen.com/MyQIAcube)

## Disposable Tips

Disposable Filter-Tips, 1000 µl
---------------------------------

## Reagent Bottle Rack

<b>Rack labeling strip</b>	DNeasy Plant
----------------------------	--------------

Position	Reagent
1	Buffer AP3/E
2	Buffer AW
3	Buffer AE
4	–
5	–
6	–

## Rotor Adapter



Position	Labware	Lid position
1	DNeasy Mini spin column	L1
2	QIAshredder spin column (cut off lid)	–
3	1.5 ml collection tube†	L3

† Sarstedt, Micro tube 1.5 ml Safety Cap (see [www.sarstedt.com](http://www.sarstedt.com)).



# QIAcube | Protocol Sheet

## Microcentrifuge Tube Slots

	Position		
	A	B	C
Content			
Vessel			

Number of samples	Volume of reagent required for the indicated number of samples (µl)		
	A	B	C
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
12			

## Comments

### Things to do before starting

Add 400 µl Buffer API and 4 µl RNase A stock solution to a maximum of 100 mg of ground (wet weight) or 20 mg (dried) disrupted plant material, and prepare a lysate by following steps 8–10 of "Protocol: Isolation of Total DNA from Plant Tissue (Mini Protocol)" in the *DNeasy Plant Handbook*. Centrifugation of the lysate in step 10 must be performed. After centrifugation, transfer the supernatant to a new 2 ml safe-lock microcentrifuge tube.

Be sure to cut off the lids of the QIAshredder spin columns before placing into the rotor adapters.

Trademarks: QIAGEN®, QIAcube®, DNeasy® (QIAGEN Group).  
© 2007-2010 QIAGEN, all rights reserved.



Sample & Assay Technologies

# QIAcube | Protocol Sheet

## General Information (April 2010)

<b>Application</b>	DNA
<b>Kit</b>	QIAprep <sup>®</sup> Spin Miniprep Kit
<b>Sample material</b>	Up to 5 ml LB cultures
<b>Short protocol name</b>	Without Buffer PB
<b>Version</b>	3
<b>Full protocol name</b>	Plasmid DNA purification using the QIAprep Spin Miniprep Kit (without PB wash)
<b>Editable parameters</b>	Elution volume: 30–100 µl in increments of 10 µl; default 50 µl
<b>Required QIAcube<sup>®</sup> software versions</b>	Firmware version FIW-50-001-J_FW_MB.hex and PLC program version FIW-50-002-G_PLC_MB.prs or higher; available from the QIAcube Web Portal

## Shaker

<b>Material</b>	Pelleted bacterial cells from 1–5 ml overnight cultures of E. coli in LB medium
<b>Vessel</b>	2 ml safe-lock microcentrifuge tube*
<b>Adapter</b>	Shaker adapter for 2 ml microcentrifuge tubes (marked with "2")

\* Sample Tubes RB, 2 ml (cat. no. 990381); see [www.qiagen.com/MyQIAcube](http://www.qiagen.com/MyQIAcube).

## Disposable Tips

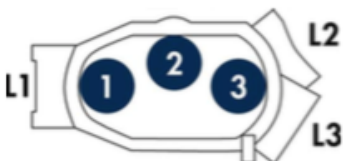
Disposable Filter-Tips, 1000 µl  
Disposable Filter-Tips, 1000 µl, wide-bore

## Reagent Bottle Rack

Rack labeling strip QIAprep

Position	Reagent
1	Buffer P1
2	Buffer P2
3	Buffer N3
4	–
5	Buffer PE
6	Buffer EB

## Rotor Adapter



Position	Labware	Lid position
1	QIAprep spin column	–
2	–	–
3	1.5 ml collection tube†	L3

† Sarstedt, Micro tube 1.5 ml Safety Cap (see [www.sarstedt.com](http://www.sarstedt.com)).



Sample & Assay Technologies

# QIAcube | Protocol Sheet

## Microcentrifuge Tube Slots

	Position		
	A	B	C
Content			
Vessel			

Number of samples	Volume of reagent required for the indicated number of samples (µl)		
	A	B	C
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
12			

## Comments

If bacteria are cultured in rich media (e.g., TB or 2x YT), use a maximum culture volume of 2.5 mL.  
 Harvest the bacterial cells by centrifugation at 6800 x g for 3 minutes.  
 It is not necessary to add LyseBlue reagent to Buffer P1.  
 Carefully fill the reagent bottle with Buffer P2 making sure that the buffer does not foam as this may lead to a liquid-detection error during the load check.

Trademarks: QIAGEN®, QIAcube®, QIAprep® (QIAGEN Group).  
 © 2007-2010 QIAGEN, all rights reserved.



Sample & Assay Technologies



# QIAcube | Protocol Sheet

## General Information (April 2010)

<b>Application</b>	RNA
<b>Kit</b>	RNeasy® Plant Mini Kit
<b>Sample material</b>	Plant cells and tissues
<b>Short protocol name</b>	QIAshredder
<b>Version</b>	2
<b>Full protocol name</b>	Purification of total RNA from plant cells and tissues (with QIAshredder homogenization)
<b>Editable parameters</b>	Elution volume: 30–100 µl in increments of 10 µl; default 50 µl
<b>Required QIAcube® software versions</b>	Firmware version FIW-50-001-J_FW_MB.hex and PLC program version FIW-50-002-G_PLC_MB.prs or higher; available from the QIAcube Web Portal

## Shaker

<b>Material</b>	Up to 100 mg plant material disrupted in 450 µl Buffer RLT or RLC
<b>Vessel</b>	2 ml safe-lock microcentrifuge tube*
<b>Adapter</b>	Shaker adapter for 2 ml microcentrifuge tubes (marked with "2")

\* Sample Tubes RB, 2 ml (cat. no. 990381); see [www.qiagen.com/MyQIAcube](http://www.qiagen.com/MyQIAcube).

## Disposable Tips

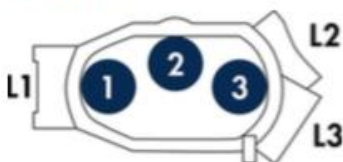
Disposable Filter-Tips, 1000 µl
---------------------------------

## Reagent Bottle Rack

<b>Rock labeling strip</b>	RNeasy Mini
----------------------------	-------------

Position	Reagent
1	–
2	–
3	100% ethanol
4	Buffer RW1
5	Buffer RPE
6	RNase-free water

## Rotor Adapter



Position	Labware	Lid position
1	RNeasy Mini spin column (pink)	L1
2	QIAshredder spin column (purple; cut off lid before placing into rotor adapter)	–
3	1.5 ml collection tube†	L3

† Sarstedt, Micro tube 1.5 ml Safety Cap (see [www.sarstedt.com](http://www.sarstedt.com)).



Sample & Assay Technologies

# QIAcube | Protocol Sheet

## Microcentrifuge Tube Slots

	Position		
	A	B	C
Content			
Vessel			

Number of samples	Volume of reagent required for the indicated number of samples (µl)		
	A	B	C
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
12			

## Comments

Be sure to cut off the lids of the QIAshredder spin columns before placing into the rotor adapters.  
 Before placing disrupted sample material onto the QIAcube shaker, check that the lysates are not viscous.  
 Viscous lysates can cause the filter-tips to clog.

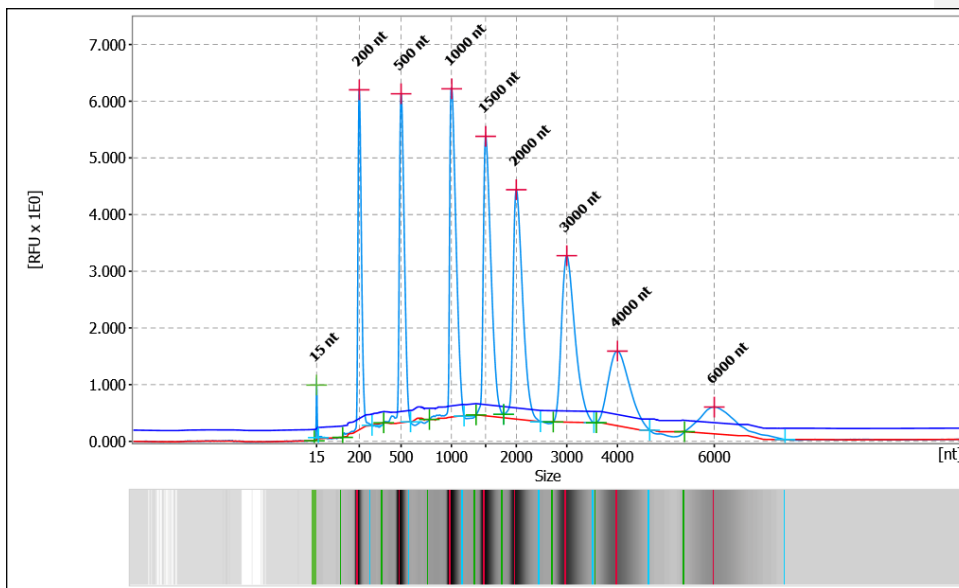
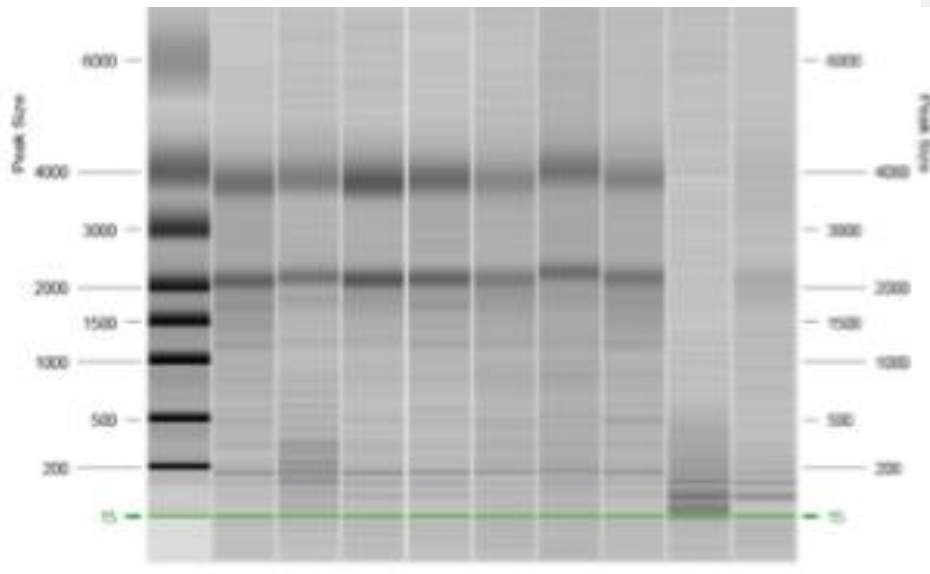
Trademarks: QIAGEN®, QIAcube®, RNeasy® (QIAGEN Group).  
 © 2007–2010 QIAGEN, all rights reserved.



Sample & Assay Technologies

APENDICE B ELECTROFORESIS VIRTUAL CON EL EQUIPO QIAxcel DE LA MARCA QUIAGEN

RNA SILVESTRE DE CALABAZA



Result Table		
#	Size [nt]	Conc. [ng/ $\mu$ l]
1	15	n/a
2	200	60.00
3	500	60.00
4	1000	60.00
5	1500	60.00
6	2000	60.00
7	3000	60.00

Result Table		
#	Size [nt]	Conc. [ng/ $\mu$ l]
8	4000	60.00
9	6000	60.00

## Bibliografia

- Chen, X.-Y., & Kim, J.-Y. (2006). Transport of macromolecules through plasmodesmata and the phloem. *Physiologia Plantarum* , 560-571.
- Chiappett, A., Bruno, L., Salimonti, A., Muto, A., Jones, J., Rogers, H. J., et al. (2010). Differential spatial expression of A- and B-type CDKs, and distribution of auxins and cytokinins in the open transverse root apical meristem of *Cucurbita maxima*. *Annals of Botany* .
- Lough, T. J., & Lucas, W. J. (2006). Integrative Plant Biology: Role of Phloem Long-Distance Macromolecular Trafficking. *Annual Review of Plant Biology* , 203-32.
- Lui, H., Wang, H., DeLong, C., Fowke, L. C., Crosby, W. L., & Fobert, P. R. (2000). The Arabidopsis Cdc2a-interacting protein ICK2 is structurally related to ICK1 and is a potent inhibitor of cyclin-dependent kinase activity in vitro. *Plant J.* , 21, 379-385.
- Berckmans, B., & De Veylder, L. (2009). Transcriptional control of the cell cycle. *Current Opinion in Plant Biology* , 599-605.
- Boruc, J., Van den Daele, H., Hollunder, J., Rombauts, S., Mylle, E., Hilson, P., et al. (2010). Functional Modules in the Arabidopsis Core Cell Cycle Binary Protein-Protein Interaction Network. *The plant cell* , 22, 1264-1280.
- Boudolf, V., Vlieghe, K., Beemster, G. T., Magyar, Z., Torres Acosta, J. A., Maes, S., et al. (2004). The Plant-Specific Cyclin-Dependent Kinase CDKB1;1 and Transcription Factor E2Fa-DPa Control the Balance of Mitotically Dividing and Endoreduplicating Cells in Arabidopsis. *The Plant Cell* , 2683-2692.
- de Almeida Engler, J., De Veylder, L., De Groot, R., Rombauts, S., Boudolf, V., De Meyer, B., et al. (2009). Systematic analysis of cell-cycle gene expression during Arabidopsis development. *The plant Journal* , 645-660.
- De veylder, L., Beeckman, T., Beemster, G. T., Krols, L., Terras, F., Landrieu, I., et al. (2001). Functional Analysis of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors of Arabidopsis. *The plant cell* , 13, 1653-1667.

Dissmeyer, N., Weimer, A. K., De Veylder, L., Novak, B., & Schnittger, A. (2010). The regulatory network of cell cycle progression is fundamentally different in plants versus yeast or metazoans. *Plant Signaling & Behavior* , 1613-1618.

Doonan, J. H., & Kitsios, G. (2009). Functional Evolution of Cyclin-Dependent Kinases. *Molecular Biotechnology* , 14-29.

Esau, K. (1969). The Phloem. *Encyclopedia of Plant Anatomy*. Berlin, Germany.

Esau, K. (1969). The Phloem. *Encyclopedia of Plant Anatomy*. Borntrager, Berlin, Germany.

Gaamouche, T., de O. Manes, C.-L., Kwiatkowska, D., Berckmans, B., Koumproglou, R., Maes, S., et al. (2010). Cyclin-dependent kinase activity maintains the shoot apical meristem cells in an undifferentiated state. *the plant journal* , 26-37.

Hajime, Y., Akihiro, T., Masamichi, I., & Nobuyuki, Y. (2008). Inhibition of long-distance movement of RNA silencing signals in *Nicotiana benthamiana* by Apple chlorotic leaf spot virus 50 kDa movement protein. *Virology* , 382, 199-206.

Kerh, J., & Buhtz, A. (2008). Long distance transport and movement of RNA through the phloem. *Journal of Experimental Botany* , 59, 85-92.

Kim, J.-Y., & Chen, X.-Y. (2006). Transport of macromolecules through plasmodesmata and the phloem. *Physiologia Plantarum* , 560-571.

Menges, M., de Jager, S. M., Gruijsem, W., & Murray, J. A. (2005). Global analysis of the core cell cycle regulators of *Arabidopsis* identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *the plant journal* , 41, 546-566.

Mironov, V., De veylder, L., Van Montagu, M., & Inzé, D. (1999 йил April). Cyclin-Dependent Kinases and Cell Division in Plants-The Nexus. *The Plant Cell* , 509-521.

Nieuwland, J., Scofield, S., & Murray, J. (2009). Control of division and differentiation of plant stem cells and their derivatives. *Seminars in Cell & Developmental Biology* , 20, 1134-1142.

- Notaguchi, M., Daimon, Y., Abe, M., & Araki, T. (2009). Adaptation of a seedling micro-grafting technique to the study of long-distance signaling in flowering of *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Res* , 201-214.
- Ruiz-Medrano, R., Xoconostle-Cázares, B., & Lucas, W. J. (1999). Phloem long-distance transport of CmNACP mRNA: implications for supracellular regulation in plants. *Development* , 126, 4405-4419.
- Umeda, M., Bhalerao, R. P., Schell, J., Uchimiya, H., & Koncz, C. (1998). A distinct cyclin-dependent kinase-activating kinase of *Arabidopsis thaliana*. *Cell Biology* , 95, 5021-5026.
- Vandepoele, K., Raes, J., De Veylder, L., Rouzé, P., Rombauts, S., & Inzé, D. (2002). Genome-Wide Analysis of Core Cell Cycle Genes in *Arabidopsis*. *The plant cell* , 14, 903-916.
- Wang, G., Kong, H., Sun, Y., Zhang, X., Zhang, W., Altman, N., et al. (2004). Genome-Wide Analysis of the Cyclin Family in *Arabidopsis* and Comparative Phylogenetic Analysis of Plant Cyclin-Like Proteins. *Plant Physiology* , 1084-1099.
- Yaegashi, H., Tamura, A., Isogai, M., & Yoshikawa, N. (2008). Inhibition of long-distance movement of RNA silencing signals in *Nicotiana benthamiana* by Apple chlorotic leaf spot virus 50 kDa movement protein. *Virology* , 199-206.
- Yoo, B.-C., Kragler, F., Varkonyi-Gasic, E., Haywood, V., Archer-Evans, S., Lee, Y. M., et al. (2004). A Systemic Small RNA Signaling System in Plants. *The Plant Cell* , 1979-2000.
- Birnboim H.C. and Doly J. (1979). A rapid alkaline procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*7:1513-1523.
- Ish-Horowicz D. and Burke J.F. (1981). Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.*9:2989-2998.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19:11-15

Logemann J, Schell J, Willimitzer L; (1987). Anal Biochem 15; 163 (1): 16-20 Improved method for the isolation of RNA from plant tissues.

Inoue H, Nojima H, Okayama H (1990). High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. Gene 96:23-28..

Old RW, Primrose SB (1989) Principles of gene manipulation. Blackwell Sci. Pub. Oxford. pp 11-13. Resumen completo del procedimiento.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp. 1.74-1.84.