

Flowering Locus T y Constan en Musa: nuevos genes que participan en la transición floral en plátano Musa AAB cv. Hartón Enano

Flowering Locus T and Constan in Musa: new genes that participate in the floral transition in plantain Musa AAB cv. Dwarf Horn

Y. Hernández¹, C. Giménez² y M. Gómez Lim³

¹Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Nacional Experimental Sur del Lago (UNESUR). Estado Zulia. Venezuela. Autor de correspondencia. ²Laboratorio de Biotecnología de plantas de la Universidad del Zulia (LUZ). ³Laboratorio de genética Molecular de plantas del CINVESTAV-IPN, Unidad Irapuato. México. Apdo. Postal 62936500.nvillira

Resumen

Con el propósito de establecer el momento fenológico de la transición floral en *Musa* (AAB) cv. Plátano Hartón Enano y caracterizar secuencias de genes que regulan este proceso, se realizó un ensayo en el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), Chama, 8°43'27" LN y 71°44'33" LO. Para ello se realizaron cortes histológicos en ápices procedentes de plantas que tuvieron una emisión foliar total de entre 15 y 36 hojas. Los ápices fueron cortados longitudinalmente a la mitad, donde una parte se observó a través del microscopio óptico y la otra mitad se utilizó para la búsqueda de genes que regulan el proceso de floración en este cultivo mediante PCR en tiempo real. El 60% de transición floral se observó en plantas que habían emitido un total de 27 hojas, pero fue a partir de la hoja 30, donde se observó entre un 80 y 100% de transición. La altura del meristema, se incrementó desde la hoja número 15 y hasta la hoja 27 mientras que la longitud de la base del meristema disminuyó. Los genes encontrados relacionados con la transición floral fueron: "*MUSAFLT*" 1, 2 y 3, homólogos del gen *FLOWERING LOCUS T (FLT)* en *Arabidopsis* y *MUSACO*, homólogo del gen *CONSTAN (CO)* también encontrado en *Arabidopsis*. El gen *MUSAFLT* obtuvo un alto nivel de expresión durante la fase de transición floral en plátano.

Palabras clave: *Musa*, genes, transición floral.

Recibido el 5-5-2008 ● Aceptado el 2-5-2010

Autor de correspondencia e-mail: yvo333@hotmail.com

Abstract

With the purpose to establish the phenological moment of the floral transition in *Musa* (AAB) cv Dwarf Horn plantain and to characterize genes sequences that regulate this process, an essay was carried out in the Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) Chama, 8°43'27" LN and 71°44'33" LW. Histological cut were made in apexes coming from shafts and whose total leaf emission was between 15 and 36 leaves. The apexes were cut lengthwise in half, where a part was observed through the optic microscope and the other half was used for searching of genes that regulate the flowering process in this crop using real time PCR. The floral transition was observed in 60% in plants that had emitted a total of 27 leaves, but it was starting from the emission of leaf 30, where it was observed between a 80 and 100% of floral transition. The height of the meristems was increased from the leaf number 15 and until the leaf 27, while the longitude of the longitude of meristems base diminished. The opposing genes related to floral transition were: «*MUSAFLT*» similar to the gene *FLOWERING LOCUS T (FLT)* and *MUSACO*, similar of the gene *CONSTANTAN (CO)*, all similar of flowering reported in *Arabidopsis*. The gene *MUSAFLT* obtained a high expression level during the phase of floral transition in plantain.

Key words: *Musa*, floral transition, gene.

Introducción

En plátano, el primer indicio de la fase floral se observa sobre el extremo meristemático; su función principal consiste en formar la inflorescencia y mucho más tarde en regular el crecimiento. Esto marca el comienzo del crecimiento del tallo verdadero, que después de permanecer al ras del suelo, va a convertirse en un tallo aéreo, en cuyo ápice se encuentra la inflorescencia, que es transportada por el centro del pseudotallo hacia la parte superior de la planta, alcanzando en algunos clones de *Musa* varios metros de altura. Investigaciones en plátano han demostrado que el momento donde ocurre el proceso de transición floral, está relacionado con la emisión de cierto número de hojas y con cambios

Introduction

In plantain, the early sign of floral phase is observed on the meristem extreme; its main function consists on forming the inflorescence and later to regulate growth. This is the beginning of growth of real stem that after remain at soil surface becomes on aerial stem, with the inflorescence is on the apex, that is moved by center of pseudo-stem toward the superior part of plant, reaching some meters of height in some *Musa* clones. Researches in plantain have shown that the moment where the process of floral transition occurs, is related to the emission of certain number of leaves and with morphological changes that they suffer during this process, beginning this when plants have produced 50% of total of leaves

morfológicos que experimentan las mismas durante dicho proceso, comenzando este cuando las plantas han emitido el 50% del total de hojas a producir durante su ciclo vegetativo (ICA, 1991 y Belalcazar, 1994).

El paso a la transición floral, no se manifiesta en plátano por algún índice visible notable en el exterior de la planta, por lo cual los estudios de inducción floral en Musáceas presentan grandes dificultades. En otro grupo de plantas, la transición floral, ocurre en un grupo de células del tallo localizados en una región denominada brote del meristemo apical (Howell, 1998 y Dumais y Kwiatkowska, 2001).

La transición floral en el ápice, está regulada por la interacción de los factores endógenos de una planta con el ambiente que la rodea, lo cual bajo condiciones favorables se crean las señales para que ocurra el proceso de floración. La transición, es regulada por una compleja red de genes que se activan o desactivan según los estados del desarrollo de la planta, permitiendo que la floración ocurra al haber suficientes recursos internos acumulados y las condiciones ambientales sean las más favorables (Simpson *et al.*, 1999). Por ejemplo, los cambios en la duración del día se perciben en las hojas como una señal del ambiente que debe ser trasladada a una considerable distancia para producir un efecto en el meristemo, al igual que las bajas temperaturas. Por tal razón, la modificación en la duración e intensidad de tales factores, han sido empleados en tratamientos para inducir la floración (Simpson *et al.*, 1999), no teniendo aun muy claro la

to be produced during its vegetative cycle (ICA, 1991 and Belalcazar, 1994).

The step toward floral transition is not manifested in plantain by some obvious index on plant exterior, thus, the studies on floral induction in Musaceae shows great problems. In other group of plants, the floral transition occurs in a group of stem cells in a region called apex meristem bud (Howell, 1998 and Dumais and Kwiatkowska, 2001).

The floral transition in apex is regulated by the interaction of endogenous factors of a plant with its environment that in presence of favorable conditions, the flowering process occurs. Transition is regulated by a complex genus network that are activated or inactivated according to plant development stages, permitting that flowering occurs when there are enough internal resources accumulated and environmental conditions be the more favorable (Simpson *et al.*, 1999). For example, changes in day duration perceive in leaves like an environmental signal have to be moved toward a considerable distance to produce an effect on meristem, just like low temperatures. The modification in duration and intensity of these factors have been used in treatments to induce flowering (Simpson *et al.*, 1999), although the relation of these factors with some metabolic way that induce flowering is not clear (Ohto *et al.*, 2001).

The moment in which, direct or indirectly, floral transition occur, is caused by a group of genes that activate destination of meristems and

relación de estos factores con alguna ruta metabólica que induzca la floración (Ohto *et al.*, 2001).

El momento en el que ocurre la transición floral, directa o indirectamente, se debe a un grupo de genes que activan el destino de los meristemos y los transforman de vegetativos a florales (Alonso-Blanco *et al.*, 1998). Investigaciones realizadas, sobre el momento de la floración en mutantes de *Arabidopsis*, bajo ciertas condiciones ambientales, han establecido múltiples rutas que controlan la transición floral en esta especie, pudiéndose extrapolarlas a otras especies de plantas. Dos de esas rutas, están mediadas claramente por las señales ambientales, siendo la primera la ruta de promoción de la floración por el "Fotoperíodo", y la segunda por "Vernalización" (Alonso-Blanco *et al.*, 1998). En contraste con las rutas anteriores, existen otras dos rutas que promueven la floración de una manera independiente de las señales ambientales; la ruta de promoción autónoma causado por las hormonas "Giberelinas" (Simpson *et al.*, 1999) y por los "Genes del grupo Flowering Locus T o FT" (Turk *et al.*, 2007). Sin embargo, poco se sabe sobre la inducción de la floración en muchas especies de plantas creciendo bajo igual duración del día y la noche, en zonas cercanas al Ecuador, donde aparentemente las plantas son capaces de acumular lentamente mínimas diferencias fotoperiódicas, promoviendo la floración bajo esas condiciones (Borchert *et al.*, 2005).

Dado que los plátanos y bananos, son de reproducción netamente asexual y de que están muy bien adap-

they change from vegetative to floral (Alonso-Blanco *et al.*, 1998). Researches carried out about the moment of flowering in *Arabidopsis* mutants under some environmental conditions, multiple ways have been established to control floral transition in this specie, could being extrapolated to other plants species. Two of these ways are clearly mediated by the environmental signals, being the first one those of flowering promotion by the "Photoperiod", and the second one, by "Vernalization" (Alonso-Blanco *et al.*, 1998). In contrast with previous ways, there are other two ways that promotes flowering like a manner independent of environmental signals; the autonomous promotion way caused by the "Gibberellins" hormones (Simpson *et al.*, 1999) and by the "Genus of Flowering Locus T or FT group" (Turk *et al.*, 2007). However, the knowledge about flowering induction in many plant species growing under the same day and night duration, in regions closed to the Ecuador, where apparently plants are capable to slowly accumulate minimum photoperiodical differences, promoting flowering under that conditions (Borchert *et al.*, 2005).

Taking into account that plantain and banana are totally of asexual reproduction and they are well adapted to the tropical conditions of Equator, there is a lot of studies related to Botany, Physiology, among others, but it is totally unknown what are the internal factors (genetics) and environmental that produces flowering in *Musa* and its similarity

tados a las condiciones tropicales del Ecuador, son muchos los estudios encontrados referentes a la botánica, fisiología, entre otros, pero se desconoce totalmente cuáles pueden ser los factores internos (genéticos) y ambientales que producen la floración en *Musa* y su similitud con otros modelos de floración en plantas mayormente estudiadas. La comprensión de los genes, como factores internos que controlan la floración en plátano, permitiría obtener en un futuro plantas con floración acelerada (Samach *et al.*, 2000), obteniéndose dos ciclos de cosecha en un tiempo menor y plantas más pequeñas en su altura producto de acortar el ciclo vegetativo, haciéndolas menos susceptibles al acame de los vientos. Por todo lo anterior, se hizo necesario establecer el tiempo y momento fenológico de la transición floral en plantas de plátano Hartón enano, y detectar genes análogos de floración para estudiar sus patrones de expresión durante la etapa de floración.

Materiales y métodos

El ensayo fue realizado en la estación Chama del Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas (INIA), en el sur del Lago de Maracaibo, Venezuela, 8°43'27" LN y 71°44'33" LO, recolectando ápices meristemáticos provenientes de plantas de plátano *Musa* AAB cv. Hartón Enano (Ocumare) (Haddad *et al.*, 1992), cuya emisión foliar total se encontrara entre las 15 y 36 hojas, con el propósito de tomar ápices durante el estado de transición floral, agrupándolos como ápices provenientes de plantas entre 15 y 21 hojas, plantas

with other flowering models in plants studied. The genus comprehension, like internal factors controlling flowering in plantain, would later permit to obtain plants with accelerated flowering (Samach *et al.*, 2000), being obtained two harvest cycles in a lesser time and lower plants in its average height as a product of reducing vegetative cycle, making them less susceptible to the winds laying. It is necessary to establish time and physiological moment of floral transition in plants of dwarf plantain and to detach flowering analogues genera to study its expression patterns during flowering stages.

Materials and methods

The essay was carried out in "Chama" station, Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas (INIA), placed in south of Maracaibo Lake, Venezuela, 8°43'27" NL and 71°44'33" WL, collecting meristem apexes from plantain plants *Musa* AAB cv. Dwarf Harton (Ocumare) (Haddad *et al.*, 1992), whose total foliar emission was found between 15 and 36 leaves, with the purpose of taking apexes during the floral transition stage, being grouped like apexes coming from plants between 15 and 21 leaves, plants between 22 and 28 leaves and plants between 29 and 35 leaves emitted. Seven plants from each foliar emission stage were taken. Once corms obtained, each one of petioles bases of leaves were took off and reserve tissue until to get the meristem apex which was longitudinally divided; one part was immersed on liquid nitrogen for

entre 22 y 28 hojas y plantas entre 29 y 35 hojas emitidas. Para cada estado de emisión foliar fueron tomadas siete plantas. Obtenidos los cormos, se les retiraba una a una las bases de los pecíolos de las hojas y el tejido de reserva hasta llegar al ápice meristemático, el cual fue seccionado longitudinalmente, guardándose inmediatamente una parte en nitrógeno líquido para los estudios genéticos y la otra mitad tratada para su observación bajo el microscopio óptico a fin de determinar el estado ontogénico del tejido.

Estudios histológicos:

Para la observación de los ápices al microscopio, los mismos fueron fijados en una solución de FAA, formaldehído (25%), etanol (70%) y ácido acético glacial por 48 horas. Luego deshidratadas con alcohol butírico terciario (TBA) al 70, 85, 95 y 100% e infiltradas con parafina. Los cortes fueron realizados con un microtomo de rotación SLEE 4050, a un grosor de 15 μm y observados con un microscopio óptico Zeiss (Axiolab), objetivo 4X y un ocular C8x/18 con divisiones o reglilla en su lente. Con la ayuda de una cámara de New Bauer, se determinó la longitud de la base del meristema (LBM) en milímetros, usando como referencia la longitud de una línea recta medida entre las dos bases de las axilas del tercer primordio foliar emitido desde el centro hacia a fuera, y la altura del meristema apical (ALMA) en milímetros desde esa línea recta de la LBM (punto considerado como valor cero de altura) hasta la última capa exterior de células de la cúpula del meristema, siendo valores de altura por debajo de LBM negativos y por encima positivos.

the genetic studies and the other half treated for its observation on the optical microscope with the purpose of determining the ontogeny stage of tissue.

Histological studies:

For the observation of apexes on microscope, these were fixed in a FAA solution, formaldehyde (25%), ethanol (70%) and acetic acid glacial by 48 hours, after they were dehydrated with tertiary butyric alcohol (TBA) at 70, 85, 95 and 100% and infiltrated with paraffin. Cuts were done with a rotation microtome SLEE 4050, at a thickness of 15 μm and observed with optical microscope Zeiss (Axiolab), objective 4X and an ocular C8x/18 with divisions on its lens. With the help of a New Bauer camera, the length of meristem base was determined (LMB) in millimeters, using like reference the length of a straight line measured between the two bases of third foliar axils primordium emitted from center to outside and meristematic apex height (MAH) in millimeters from that straight line of LMB (point considered like value zero of height) until the exterior layer of meristem dome cells, being the height values below LMB negatives and above positive.

Extraction of genomic DNA:

Genomic DNA was extracted from 100 mg of leaves according to the Bromide Hexadecyltrimethyl Ammonium (CTAB) methodology (Doyle and Doyle, 1990), with modifications added by Weising and Kahl (1997).

Design of degenerated primers:

Ten (10) genera related to

Extracción del ADN genómico:

El ADN genómico se extrajo a partir 100 mg de hojas según la metodología del Bromuro de Hexadeciltrimetil Amonio (CTAB) (Doyle y Doyle, 1990), con las modificaciones incorporadas por Weising y Kahl (1997).

Diseño de cebadores degenerados:

Se seleccionaron diez (10) genes que estuviesen fuertemente relacionados con la regulación de la transición floral, entre los que se encontraron como promotores de floración: *LEAFY (LFY)*, *FLOWERING LOCUS T (FT)*, *CONSTANS (CO)*, *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1 (SOC1)*, *GAMYB*, *GIBBERELLIC ACID 1, 5 y 4* que codifican para las enzimas *KAU*, *GA 20ox* y *GA-3ox* respectivamente. Como represores de la floración: *EMBRIONIC FLOWER (EMF)* y *DELLA*. La búsqueda de estos genes, se realizó con el software disponible en la página Web del Nacional Center of Biotechnology Information (NCBI). Los genes publicados relacionados con la transición floral, se usaron para generar grupos homólogos de secuencias usando el BLAST, contra bancos de secuencias de proteínas o nucleótidos. Luego, estos grupos de secuencias relacionados, se alinearon mediante el software ClustaW (1.83) usándose el formato de secuencias alineadas para encontrar bloques de secuencias consenso o conservadas mediante el programa Blocks Multiple Alignment Processor. Estas regiones conservadas fueron utilizadas para el diseño de los cebadores degenerados con el software CODEHOP (Rose *et al.*, 1998).

regulation of floral transition were selected; like flowering promoters were found: *LEAFY (LFY)*, *FLOWERING LOCUS T (FT)*, *CONSTANS (CO)*, *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1 (SOC1)*, *GAMYB*, *GIBBERELLIC ACID 1, 5 and 4* that codifies for the enzymes *KAU*, *GA 20ox* and *GA-3ox* respectively. Like flowering repressors were found: *EMBRIONIC FLOWER (EMF)* and *DELLA*. The looking for these genera was done using the available software on web site of National Center of Biotechnology Information (NCBI). The published genera related to floral transition, were used to generate homologous groups of sequences using BLAST, against banks of proteins or nucleotides sequences. After, these groups of sequences related, were lined up by the software ClustaW (1.83) with the format of aligned sequences to find blocks of consensus or conserved sequences through the Blocks Multiple Alignment Processor program. These regions preserved were used for the design of degenerated primers with the software CODEHOP (Rose *et al.*, 1998).

The PCR reaction was carried out on a thermal cycler BioRAD model i-Cycler, with an initial denaturalization of 2' to 94°C «Hotstart»; the rest of cycling was accomplished with a "touchdown" strategy by beginning in 60°C for after diminishing temperature to -0.5°C per cycle until reaching 55 to 53°C (10 to 12 cycles) in the rest of cycling, followed by a late final extension to 72°C during 10 minutes.

Obtaining of flowering analogues in *Musa*

Once obtained the fragment size

La reacción de PCR se realizó en un termociclador BioRAD modelo i-Cycler, con una desnaturalización inicial de 2' a 94°C "Hotstart"; el resto del ciclo se realizó con una estrategia "touchdown" comenzando en 60°C para luego descender la temperatura -0,5°C por ciclo hasta alcanzar 55 a 53°C (10 a 12 ciclos) en el resto de los ciclos, seguido por una última extensión final a 72°C durante 10 minutos.

Obtención de análogos de floración en *Musa*

Obtenido el tamaño del fragmento esperado, según el diseño de los cebadores, se procedió a su purificación a partir de geles de agarosa, clonaje y transformación en *E. coli* DH5 α -T1R químicamente competente (Invitrogene). Luego se purificaron las bandas de interés (QUIAGEN) y se ligaron con en el vector pCR[®]4-TOPO[®] (Invitrogene). Una vez realizada la ligación se procedió a la transformación en bacterias del vector (pCR[®]4-TOPO[®]) con el inserto de interés para luego amplificarlo en las colonias bacterianas mediante PCR usando cebadores universales T3 y T7 que flanquearon el sitio del clonaje del vector. Obtenida la amplificación del inserto, se procedió a un análisis con enzimas de restricción de corte frecuente como *DRAI*, *RSAI* y *HINI*, que reconocen cuatro pares de bases. Los patrones de restricción obtenidos, se agruparon con la ayuda de un dendograma que permitió seleccionar las secuencias según su patrón de restricción.

Estas secuencias fueron contrastadas con los bancos de datos de nucleótidos y proteínas para verificar si lo clonado era un análogo de floración en *Musa*. El análisis funcional de

waited, according the primers design, its purification from agarose gels, cloning and transformation in *E. coli* DH5 α -T1R chemically competent (Invitrogene). After that, the interest bands were purified (QUIAGEN) and they were join to the pCR[®]4-TOPO[®] vector (Invitrogene). When binding was done, the transformation in bacteria of vector (pCR[®]4-TOPO[®]) was accomplished with the insert of interest for after amplified it in the bacterial colonies through PCR by using universal primers T3 and T7 flanking the vector cloning place. Once obtained the amplification of insert, an analysis with enzymes of restriction of frequent cut like *DRAI*, *RSAI* and *HINI* that recognize four pairs of bases. The restriction patterns obtained were grouped with the help of a Dendrogram that permitted to select the sequences according its restriction pattern.

These sequences were contrasted with data banks of nucleotides and proteins to verify if those cloned was an analogous of flowering in *Musa*. The functional analysis of proteins for genes found was done through the Software InterProScan (Quevillon *et al.*, 2005). The positive sequences of flowering analogous in *Musa*, were registered in the GENBANK of NCBI and the specific primers were designed for the next genetic expression analysis by PCR on real time. Thus, the kinetics of expression of these floral transition genera can be studied with the flowering in plantain, correlating from the ontogeny point of view, the development of apex according to the foliar emission stage.

las proteínas para los genes encontrados fue realizado a través del Software InterProScan (Quevillon *et al.*, 2005). Las secuencias positivas de los análogos de floración en *Musa*, fueron inscritas en el GENBANK del NCBI y se procedió a diseñar los cebadores específicos para los posteriores análisis de la expresión genética por PCR en tiempo real. De esta forma, se pudo estudiar la cinética de la expresión de estos genes de transición floral con la floración en plátano, correlacionando desde el punto de vista ontogénico, el desarrollo de los ápices según el estado de emisión foliar.

Trascrición reversa

Para el aislamiento de ARNm, se tomaron los ápices a cada uno de los siete estados de emisión foliar por grupo y se mezclaron lo más homogéneamente. A cada muestra se le añadieron 10 μL de Buffer 10X Turbo DNase 2U. μL^{-1} (Qiagen) e inmediatamente se le aplicó 1 μL de la enzima TURBO DNase y se colocó a incubar por 30 min a 37°C. Luego, se le aplicó 40 μL del inactivador de DNase, se agitó por 3 min y se centrifugó por 90 seg a 10.000 xg. La extracción del ARNm se realizó con el RNeasy Mini kit (Qiagen) e inmediatamente se realizó una trascrición reversa del ARNm para obtener ADNc (Promega). Luego de verificar la eficiencia de la retrotranscripción, se cuantificó con un espectrofotómetro (Nano Drop), la concentración final de ADNc, llevándolo a una concentración final de 50 ng. μL^{-1} .

Análisis de expresión de los análogos de floración en *Musa*

Se utilizó un termociclador Rotor-Gene 3000 (CORBETT RESEARCH), con sistema múltiple de

Reverse transcription

For the mRNA isolation, the apex in each of seven foliar emission stages was taken by group and they were homogeneous mixed. 10 μL of Buffer 10X Turbo DNase 2U. μL^{-1} (Qiagen) were added to each sample and immediately 1 μL of the TURBO DNase enzyme was applied and after and it was incubated during 30 min to 37°C. Moreover, 40 μL of inactivated DNase were applied, it was agitated during 3 min and centrifuged during 90 sec to 10.000 xg. The mRNA extraction was done with the RNeasy Mini kit (Qiagen) and immediately a reverse transcription of ARNm was accomplished in order to obtain ADNc (Promega). After verifying the efficiency of retro transcription, it was quantified with a spectrophotometer (Nano Drop), the final concentration of ADNc, until reaching a final concentration of 50 ng. μL^{-1} .

Flowering analogue expression analysis in *Musa*

A thermal cycler Rotor-Gene 3000 (CORBETT RESEARCH) was used with a multiple system of four channels, detection system with filters from 510 to 610 nm connected to a computer Desktop, Pentium III, 600 Mhz, 32 MB RAM. The commercial kit of detection was the iTaq™ SYBR Green Supermix with bRox, for 500 reactions I (BIO RAD), which already had the Buffer of reaction (2X) dNTPs (0.4 mM) Taq ADN polymerase (50 units. mL^{-1}), Mg_2Cl (6 mM), internal reference ROX (1 μM) and the Fluorophore SYBR Green, (BIORAD) (Deprez *et al.*, 2002). The thermal cycler conditions for each of genus evaluated

cuatro canales, sistema de detección con filtros desde 510 a 610 nm acoplados a una computadora Desktop, Pentium III, 600 Mhz, 32 MB RAM. El kit comercial de detección fue el iTaq™ SYBR Green Supermix with bRox, para 500 reacciones I (BIO RAD), el cual ya contenía el Buffer de reacción (2X) dNTPs (0,4 mM) Taq ADN polimerasa (50 units.mL⁻¹), Mg₂Cl (6 mM), referencia interna ROX (1µM) y el fluoróforo SYBR Green, (BIORAD) (Deprez *et al.*, 2002). Las condiciones del termociclador para cada uno de los genes estudiados fue: Desnaturalización inicial: 95°C, 2 min. Ciclado PCR: 40 ciclos de 95°C por 10 seg, 55°C por 30 seg y 72°C por 30 seg. Curva de disociación o melting: desde la temperatura de alineamiento (55°C) hasta los 95°C. Se utilizó como control interno un gen de referencia la β-Actina de *Arabidopsis* (Iskandar *et al.*, 2004).

La secuencia de los primer que amplificaron a la β-Actina y a los genes fueron:

β-Actina F: CTGGAAATGGTCAAAGGCTGGT; R: TCCCTTC TGTCCCATCCCTACC

MUSAFLT2-F: GCTTCGTGTGTTCTGTCCTCTTC; 1R: TTTAAACG AATTCGCCCTTC: 101pb

MUSACO1-1F: GATCTTCGATAACGGCTCGTCTC; 1R: TGGATTGATGGTGTGGAGAA: 126 pb

Siendo F forward y R reverse.

Obtenido los valores de Ct para el gen de referencia y para cada uno de los genes de interés, se procedió a calcular sus niveles de expresión relativa en cada uno de los estados jo-

were: Initial denaturalization: 95°C, 2 min. Cycling PCR: 40 cycles of 95°C during 10 seconds, 55°C during 30 seconds and 72°C during 30 seconds. Curve of dissociation or melting: from the storage temperature (55°C) to 95°C. As an internal control, a reference genus β-Actina of *Arabidopsis* (Iskandar *et al.*, 2004) was used.

The primers sequence that amplified to the β-Actina and to the genera were:

β-Actina F: CTGGAAATGGTCAAAGGCTGGT; R: TCCCTTC TGTCCCATCCCTACC

MUSAFLT2-F: GCTTCGTGTGTTCTGTCCTCTTC; 1R: TTTAAACG AATTCGCCCTTC: 101pb

MUSACO1-1F: GATCTTCGATAACGGCTCGTCTC; 1R: TGGATTGATGGTGTGGAGAA: 126 pb

Being F forward and R reverse.

Once Ct values obtained for the reference genera and for each of interest genera, its relative expression levels were estimated each of stages young, medium and adult through the formula: $R = 2^{-(\Delta Ct)}$: being R, the relative expression of the times in which a genus is revealed with regard to the reference. Delta Ct, correspond to the value of normalization between the result of difference of white genera Ct and the genus of reference for each of tissues (Vega, 2003).

Results and discussion

The floral transition began to be observed approximately at 4.5 months (135 days after sowing), in 33% of plants with a total of 25 leaves,

ven, medio y adulto a través de la fórmula: $R = 2^{-(\text{Delta Ct})}$: siendo R, es la expresión relativa de cuantas veces más o menos se expresa un gen con respecto al de referencia. Delta Ct, corresponde al valor de la normalización entre el resultado de la diferencia de los Ct de los genes blancos y el gen de referencia para cada uno de los tejidos (Vega, 2003).

Resultados y discusión

La transición floral comenzó a observarse aproximadamente a los 4,5 meses (135 días después de la siembra), en un 33% de las plantas que habían emitido un total de 25 hojas, incrementándose a 60% en plantas que alcanzaron las 27 hojas. Aún cuando se encontró en la hoja número 28, un 100% de plantas en transición, no fue hasta la hoja número 30, donde se observó entre el 80 y 100% en transición y todas, a excepción de plantas con hoja 30, presentaron transición después de los 200 días de la siembra (6,6 meses aproximadamente). Este resultado coincidió con lo señalado por Summerville (1944), al trabajar con "Dwarf Cavendish" reportó que la inflorescencia en este clon comenzó a observarse entre los 3 a 6 meses de la siembra y esto dependió de las condiciones ambientales presentes. Las primeras plantas en transición floral, presentaron perímetros del pseudotallo de 30 cm y valores cercanos o superiores a los 40 cm de perímetro, medido a la mitad de la altura de la planta, lo cual podría considerarse como de alta probabilidad para conseguir plantas en estado de transición floral (80 a 100%). En cuan-

increasing 60% in plants reaching 27 leaves. Even when in leave 28 it was found a 100% of plants in transition, leave 30 showed between 80 and 100% in transition and all of them, with exception of plants with leave 30, showed transition after 200 days after sowing (6.6 months approximately). This result agreed with those reported by Summerville (1944), working with "Dwarf Cavendish" who said that inflorescence in this clone began to be observed between 3 to 6 months of sowing and this depended on environmental conditions. The first plants in floral transition showed perimeters of pseudo-stem of 30 cm and values closed or superior to 40 cm perimeter, measured on the half of plant height, which could be considered of a high probability to reach plants in floral transition stage (80 to 100%). In relation to the meristematic apex height (MAH) that from leave 15 and to the leave 27 (-0.25 to -0.01 mm, respectively), the apex height remained with tendency almost constant and with negative mean values with regard to the insertion plane of third armpit of foliar primordia with regard to the meristematic apical dome. From leave 28, the mean values of MAH changed into positive ones, by showing a progressive increase on apex height until becomes almost constant in a rank from 0.0 to 0.5 mm height. After 28 leaves emitted, tendency in values of LMB were stabilized and they did not decrease of 1.53 mm length, in agreement to the increase of MAH variable and in the higher percentages of plants in floral transition (figure 1).

to a la altura del ápice meristemático (ALMA), se observó que desde la hoja número 15 y hasta la hoja 27 (-0,25 a -0,01 mm, respectivamente), la altura del ápice permaneció con tendencia casi constante y con valores promedios negativos respecto al plano de inserción de la tercera axila de los primordios foliares con respecto al domo apical meristemático. A partir de la hoja 28, los valores promedios de ALMA se tornaron positivos, indicando un aumento progresivo en la altura del ápice hasta volverse también casi constante en un rango que fue de los 0,0 a 0,5 mm de altura. Después de las 28 hojas emitidas, la tendencia en los valores de LBM, se estabilizaron y no disminuyeron de 1,53 mm de longitud, coincidiendo con el aumento de la variable ALMA y en los mayores porcentajes de plantas en transición floral (figura 1).

Genes análogos de floración en *Musa*

De 79 oligos degenerados y 142 combinaciones, se lograron encontrar tres grupos genéticos en plátano Hartón Enano, los cuales fueron registrados en el GenBank del NCBI como: *MUSAFLT* y *MUSACO*, todos análogos de floración de *Arabidopsis*, como *Flowering Locus T* o *FT* (Nakatsuka *et al.*, 2009) y *Constan (CO)*, respectivamente. Los cebadores utilizados fueron: *FLOWERING LOCUST1F*: 5'-C GGACCTTCTACACCCTGGT^{natggtngayc}-3'- *3R*: 5'-CGCAGCCGGACTCC ckytgrcartt-3'

CONSTANT1F: 5'-CGCCTA CCTGTGCGCCwsntgygayrc-3'-*2R*: 5'-GATCCGCGGCCGGryytengerta-3'

Además, el análisis BLAST mostró que los productos de PCR

Analogue genera of flowering in *Musa*

From 79 degenerated oligo and 142 combinations, it was possible to find three genetic groups in Dwarf Harton plantain, which were registered in GenBank of NCBI like: *MUSAFLT* and *MUSACO*, all the flowering analogues of *Arabidopsis*, like *Flowering Locus T* or *FT* (Nakatsuka *et al.*, 2009) and *Constan (CO)*, respectively. Primers used were: *FLOWERING LOCUST1F*: 5'-C GGACCTTCTACACCCTGGT^{natggtngayc}-3'- *3R*: 5'-CGCAGCCGGACTCC ckytgrcartt-3'

CONSTANT1F: 5'-CGCCTA CCTGTGCGCCwsntgygayrc-3'-*2R*: 5'-GATCCGCGGCCGGryytengerta-3'

Also, the BLAST analysis showed that PCR products sequenced were analogues to flowering genera in other species of monocotyledonous plants like rice (*Oryza sativa*) and corn (*Zea mays*).

Sequences of analogues *MUSAFLT* and *MUSACO* flowering in plantain

MUSAFLT1: DQ153045: GGA AACGAGATCGTCTGCTACGAGAG CCCACGGCCAACAGCTGGTATCCACCG C T T C G T G T T C G T G C T G T T C CGGCAATCGGTC C G G C A G A C G A T C T A C G C G C C T G G G T G G A G G C A G A A C T T C A A C A C C A A G G A C T T C T C C G C T C T C T A C A A C C T C G G G A T C C C G T C G C T G C C A T G T T C T T C A A T T G C C A G C G G G A G T C C G G C T G C G A A G G

Amino acids: NEIVCY
ESPRPTAGIHRFVFLFR
QSVRQTIYAPGWRQNFNT
KDFSALYNLGDPAAMF

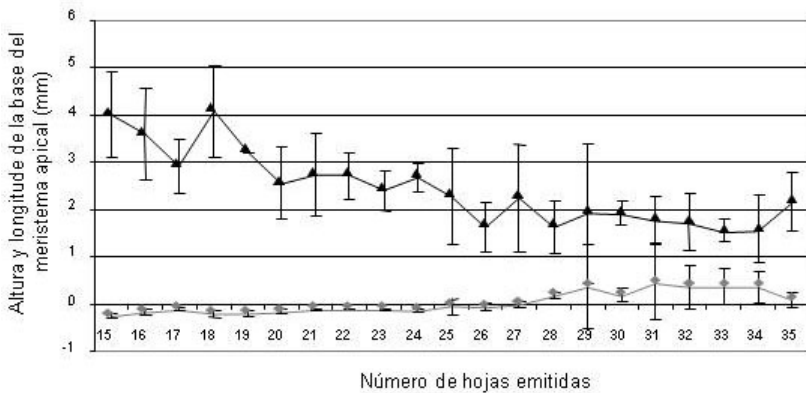


Figura 1. Altura y longitud de la base del meristema apical en plantas de plátano Hartón Enano con 15 y hasta 35 hojas emitidas.

Figure 1. Height and length of apex meristem base in plantaun plants of Dwarf Harton with 15 and 35 leaves.

secuenciados fueron análogos a genes de floración en otras especies de plantas monocotiledóneas como arroz (*Oryza sativa*) y maíz (*Zea mays*).

Secuencias de *MUSAFLT* y *MUSACO* análogos de floración en plátano

MUSAFLT1: DQ153045: GGA
AACGAGATCGTCTGCTACGAGAG
CCCACGGCCAACAGCTGGIATCCACCG
C TTCGTGTTCTGCTGCTGTT
CCGGCAATCGGTC CGGCAGA
CGATCTACGCGCCTGGG
TGGAGGCAGAACTTCAA
CACCAAGGACTTCTCCGC
TCTCTACAACCTCGGGGA
TCCCGTCTGCTGCCATGTT
CTTCAATTGCCAGC
GGGAGTCCGGCTGCGAAGG

Aminoácidos: NEIVCYE S
PRPTAGIHRFVFLFRQS
VRQTIYAPGWRQNFNTKD
FSALYNLGDPAAMFFNC
QRESGCEGNEIVCYE SPR
PTAGIHRFVFLFRQSVR
QTIYAPGWRQNFNTKDFS

FNCQRESGCEGNEIVCYE
SPRPTAGIHRFVFLFRQ
SVRQTIYAPGWRQNFNTK
DFSALYNLGDPAAMFFN
CQRRESGCE

MUSAFLT2: DQ153047: ACG
AAAGTCCAAGGCCAACTC
TGGGGATCCATCGCTTCG
TGTTCTGTCCTCTTCTCTG
AGTTGGGTCGGCAGACG
GTGTACACCCCGGGCTG
GCGGCAAACTTCAACAC
CAGGGACTTCGCCGAGC
TCTACAACCTCGGCTCGC
CTGTGGCTGCGCTACT
TCAACTGCCAACGGGAG
TCCGGCTGCGAAGGGCG
AATTCGTTTAAACCT
GCAGGAC

Aminoacids: YESPRPTL
GIHRFVFLFLQLGRQTV
YTPGWRQNFNTRDFAEL
YNLGSPPAAVYFNCQRES
GC EGRIRLNLQD

MUSAFLT3: DQ153048: CCG
CGCGCACAGGTGAGAG

ALYNLGD PVAAMFFNCQ
R ESGCE

MUSAFLT2: DQ153047: ACG
AAAGTCCAAGGCCAACTC
TGGGGATCCATCGCTTCG
TGTTCTGTCCTCTTCCTGC
AGTTGGGTCGGCAGACG
GTGTACACCCCGGGCTG
GCGGC AAAACTTCAACAC
CAGGGACTTCGCCGAGC
TCTACAACCTCGGCTCGC
CTGTGGCTGCCGTCTACT
TCAACTGCCAACGGGAG
TCCGGCTGCGAAGGGCG
AATTCGTTTAAACCT
GCAGGAC

Aminoácidos: YESPRPTL
GIHRFVFLFLQLGRQTV
YTPGWRQNFNTRDFAEL
YNLGS PVAAVYFNCQRES
GC EGRIRLNLQD

MUSAFLT3: DQ153048: CCG
CGCGCACAGGTCGAGAG
TTGGTCTGCTACGAGAGC
CCGCGGCCGACGATAGG
GATTCACCGCATGGTCTT
CGTGCTGCTCCGCCAGA
TGGGGAGGGGGACGGTG
TTCGCGCCGACAGATGCG
CCACAACCTCAGCACCCAG
AAGGTTCTGTGCTGCAGTA
CTACCCTGGCGCCTGTGCG
CGCCACCTACTTTAACTG
CAAAGGGAGTCCGGCTGCG

Aminoácidos: SARTGREL
VCYESPRPTIGIHRMV FV
LLRQMGRGTVFAPQMRH
NFSTRRFVLQYYLAPVAA
TY FNCQRESGC

CO1: DQ153049: CCCTTAAC
CGGGCGGCCTCCAGCCAT
GAGCGCGCCTGGCNNTG
CGAGGCCTGCGAGCATG
TCCCGCGCGTCTCACCC

TTGGTCTGCTACGAGAG
CCCGCGGCCGACGATAG
GGATTCACCGCATGGTCT
TCGTGCTGCTCCGCCAGA
TGGGGAGGGGGACGGTG
TTCGCGCCGACAGATGCG
CCACAACCTCAGCACCCAG
AAGGTTCTGTGCTGCAGTA
CTACCCTGGCGCCTGTGCG
CGCCACCTACTTTAACTG
CAAAGGGAGTCCGGCTGCG

Aminoácidos: SARTGREL
VCYESPRPTIGIHRMV FV
LLRQMGRGTVFAPQMRH
NFSTRRFVLQYYLAPVAA
TY FNCQRESGC

CO1: DQ153049: CCCTTAAC
CGGGCGGCCTCCAGCCAT
GAGCGCGCCTGGCNNTG
CGAGGCCTGCGAGCATG
TCCCGCGCGTCTCACCC
TGCAAGGCCGACGCGCGCC
GTCCTATGCGCCGACTGT
GACGCCGACATCCACTCC
GCCAACCCCTCGCTGCGC
CGCCACGAGCGCATCCC
CCTGCTTCCCTTCCCTCGG
CCCTGCCCCCAAGCCCCC
TGCCACCGGACGCGTAGG
CAGCGGCGACGACGACG
AGACGGACGCGGAGGCC
GCCTCATCCCTCCTCCCC
CAAGAGGGCCCGGTGCT
CCGATCGGCCGCGGAGT
TCTTCTTCTCCGACGCTG
ATGCTTACCTGGATCTCG
ACTACGGCTCGTCGATGG
ACGAGATGAAGACCGTC
GTGGGAGCAGACCAGCC
GTTCTTCTGCGACCCGG
TGGTGAATATTTTCGATCT
CAATATCGCCGGATGCAA
ACAAGAAGCCGATCATTC
CTTATGCCACAGCGTATT

TGCAAGGCCGACGCGCC
 GTCCTATGCGCCGACTGT
 GACGCCGACATCCACTCC
 GCCAACCCCTCGCTCGC
 CGCCACGAGCGCATCCC
 CCTGCTTCCCTTCCCTCGG
 CCCTGCCCCCAAGCCCC
 TGCCACCGGACGCGTAGG
 CAGCGGCGACGACGACG
 AGACGGACGCCGA GGCC
 GCCTCATCCCTCCTCCCC
 CAAGAGGGCCCCGGTGCT
 CCGATCGGCCGCGGAGT
 TCTTCTTCTCCGACGCTG
 ATGCTTACCTGGATCTCG
 ACTACGGCTCGTCGATGG
 ACGAGATGAAGACCGTC
 GTGGGAGCAGACCAGCC
 GTTCTTCCCTGGCACCCGG
 TGGTGAATATTTGATCT
 CAATATCGCCGGATGCAA
 ACAAGAAGCCGATCATTC
 CTTATGCCACAGCGTATT
 CTCCACACCCATCAATCCA
 CGTCGAGCTAAAAAAGC
 GCCACCGCAACGTGTTCT
 CACAGCTTTGCTTTCGTGG
 GACGGTGCAGGTGTCTG
 CGTCGGAGGCAGCCGTG
 GTGCCGACGCTGTTCGCA
 GCCATCGGCCGGTGGGA
 TGCCGTGTGATCCGCG
 GCAGCACGGTTGGACCG
 GGAGGCAAGGCTGATGCG
 ATACAGGGAGAAGCGGA
 AGAGCCGGAGGTTTCGAG
 AAGACGATAAAGGTACGC
 GTCGAGGAAGGCCCTACG
 CTGAGGCCCGGCCGCGG
 ATCAAGGGCGAATTCA

Aminoácidos: LNRAASSH

ERAWXCEACEHVPAVVT
 CKADA AVL CAD CDADIHS
 ANPLARRHERIPLLPFLG

CTCCACACCCATCAATCCA
 CGTCGAGCTAAAAAAGC
 GCCACCGCAACGTGTTCT
 CACAGCTTTGCTTTCGTGG
 GACGGTGCAGGTGTCTG
 CGTCGGAGGCAGCCGTG
 GTGCCGGACGTGTTCGCA
 GCCATCGGCCGGTGGGA
 TGCCGTGTGATCCGCG
 GCAGCACGGTTGGACCG
 GGAGGCAAGGCTGATGCG
 ATACAGGGAGAAGCGGA
 AGAGCCGGAGGTTTCGAG
 AAGACGATAAAGGTACGC
 GTCGAGGAAGGCCCTACG
 CTGAGGCCCGGCCGCGG
 ATCAAGGGCGAATTCA

Aminoacids: LNRAASSH

ERAWXCEACEHVPAVVT
 CKADA AVL CAD CDADIHS
 ANPLARRHERIPLLPFLG
 PAPKPPATG RV GSGDDDE
 TDAEAASSLLPQEGPVL
 SAAEFFFS DADAYLDLDY
 GSSMDEMKT VVG AD QP F
 FLAPGG EYFDLNIAGCKQ
 EADHSLCHSVFSTPSIHV
 ELKKAPPQRVLTALLRG
 TVQVSSSEAAVVPDVSQP
 SAVGMPCDPAAARLDRE
 ARLMRYREKRKSRRFEK
 TIRYASRKAYAEARPRIKGEF

Analogues expression analysis of flowering in plantain for MUSAFT and MUSACO

The *MUSAFLT* proteins showed to be homologous to those found in *Centroradialis* (CEN) Phosphatidyl-Ethanolamine-Binding (PEBP) (8.5e-37 [1-72]T), a family of highly preserved proteins and identified in numerous tissues of a high variety of organisms like bacteria, yeast, nematodes, plants, *Drosophila* and in

PAPKPPATG RV GSGDDD
 ETDAEAASSLLPQEGPVL
 RSAAEFFFSDDADAYLDDL
 YGSSMDEMKT VVG AD QP
 FFLAPGGGEYFDLNIAGCK
 QEADHSLCHSVFSTPSIH
 VELKKAPPQRVLTALLRG
 TVQVSSSEAAVVPDVSQP
 SAVGMPCDPAAARLDRE
 ARLMRYREKRKSRRF EK
 TIRYASRKAYAEARPRIKGEF

Análisis de expresión de análogos de floración en plátano para MUSAF_T y MUSACO

Las proteínas de MUSAF_T, mostraron ser homólogas a las encontradas en Centroradialis (CEN) Phosphatidyl-Ethanolamine-Binding (PEBP) (8,5e-37 [1-72]T), una familia de proteínas altamente conservadas e identificadas en numerosos tejidos de una gran variedad de organismos como bacterias, levaduras, nemátodos, plantas, *Drosophila* y en mamíferos. En plantas, la función de PEBP ha sido reportada como un activador morfológico del meristemo en crecimiento y de estructuras florales en cebada (*Hordeum vulgare*; Farre *et al.*, 2007), así como también juega un papel importante en la regulación de quinasas en *Antirrhinum centroradialis* (Banfield y Brady, 2000).

El alineamiento por ClustalW, mostró bloques altamente conservados a nivel de los aminoácidos en proteínas de MUSAF_T, y los genes FL_T de diferentes especies como *Populus nigra*, *A. thaliana*, *Avena sativa* y *O. sativa* (figura 2) y el análisis Blast2, también mostró una alta conservación de secuencias, entre un 80 y 92%, en las diferentes especies analizadas. En

mammalian. In plants, the PEBP function has been reported like a morphological inactivator of meristem in growing and of floral structures in barley (*Hordeum vulgare*; Farre *et al.*, 2007), as it plays an important role on chynases regulation in *Antirrhinum centroradialis* (Banfield and Brady, 2000).

The ClustalW aligning showed highly preserved blocks at level of amino acids in proteins of MUSAF_T, and genera FL_T of different species like *Populus nigra*, *A. thaliana*, *Avena sativa* and *O. sativa* (figure 2) and the Blast2 analysis, also showed a high sequences conservation, between 80 and 92%, on different species analyzed. In rice for instance, a monocotyledonous as plantain, an analogous genus of FT, *Hd3a* Expand+ (Takahashi *et al.*, 2009), showed almost 70% of homology with FT (Kojima *et al.*, 2002), a conservation value below those found for MUSAF_T.

The phylogenetic tree done for MUSAF_T, showed that these sequences were related to homologous genera of *O. sativa*. In *A. thaliana*, FT and LEAFY (LFY) promotes flowering and they were positively regulated by the transcription factors of CONSTANS (CO), (Turk *et al.*, 2007). FT mediated those signals inducing flowering of contrary matter with the genus TERMINAL FLOWER1 (TFL). FT also function as a transcriptional activator of genera APETALA1, WUS, FUL, SEP3 and other unknown genera, which were accumulated in the meristems and contributed to begin the floral transition (Teper and Samach, 2005).

arroz por ejemplo, una monocotiledónea al igual que plátano, un gen análogo de *FT*, *Hd3a* Expand+ (Takahashi *et al.*, 2009), mostró cerca de un 70% de homología con *FT* (Kojima *et al.*, 2002), valor de conservación en su secuencia muy por debajo por lo encontrado para *MUSAFLT*.

El árbol filogenético realizado para los *MUSAFLT*, mostró que estas secuencias estuvieron relacionadas con genes homólogos de *O. sativa*. En *A. thaliana*, *FT* junto con *LEAFY* (*LFY*), promueven la floración y fueron positivamente regulados por factores de transcripción de *CONSTANS* (*CO*), (Turk *et al.*, 2007). *FT* actuó en parte mediando las señales que indujeron la floración de manera antagónica con el gen *TERMINAL FLOWER1* (*TFL*). *FT* funcionó también, como un activador transcripcional de los genes *APETALA1*, *WUS*, *FUL*, *SEP3* y otros genes desconocidos, los cuales se

The *CO* genus was one of responsible of inducing flowering on long days in *Arabidopsis* (Fornara *et al.*, 2009). The proteins or the RNAm of *CO*, were moved from leaves and phloem toward meristematic apex in vegetative stages, being the genus also expressed in the meristem (Huang *et al.*, 2007), but this expression is need for the flowering induction. The *CO* function was mainly as of photo periodical signals and after they induced to other genera like direct responsible of floral transition, as *SOC*, *FT* (Ayre and Turgeon, 2004) and *LFY*, not being this last genus a direct target of *CO* (Nilsson *et al.*, 1998). *CO*, codify for a protein of 373 amino acids residues with two highly conserved regions. The first one, in the N terminal region shows two Zinc fingers (the Zinc fingers of *CONSTAN*), related to transcription factors of GATA type and the second region have a termi-

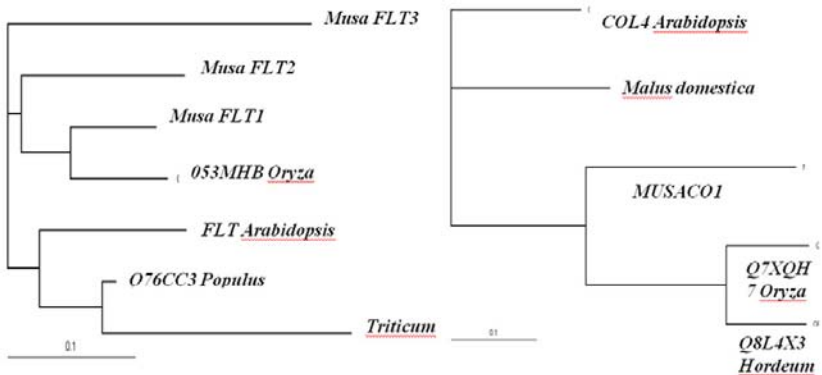


Figura 2. Relación entre proteínas *MUSAFLT* y *MUSACO* con otras proteínas relacionadas a genes de floración en plantas.

Figure 2. Relationship between *MUSAFLT* and *MUSACO* proteins with other proteins related to flowering genes in plants.

acumularon en los meristemas y contribuyeron a iniciar la transición floral (Teper y Samach, 2005).

El gen *CO*, fue uno de los genes responsable de inducir la floración en días largos en *Arabidopsis* (Fornara *et al.*, 2009). Las proteínas o el mismo ARNm de *CO*, se movilizaron desde las hojas y se transportaron por el floema a los ápices meristemáticos en estados vegetativos, pudiendo también expresarse el gen en el mismo meristema (Huang *et al.*, 2007), pero no siendo esa expresión quizás necesaria para la inducción de la floración. La función de *CO*, fue primordialmente como receptor de las señales fotoperiódicas y luego indujeron a otros genes como responsables directos de la transición floral, tal como *SOC*, *FT* (Ayre y Turgeon, 2004) y *LFY*, no siendo este último gen un blanco directo de *CO* (Nilsson *et al.*, 1998). *CO*, codifica para una proteína de 373 residuos de aminoácidos con dos regiones altamente conservadas. La primera, en la región N terminal presenta dos dedos de Zinc (los dedos de Zinc de *CONSTAN*), muy relacionados a factores de transcripción de tipo GATA y la segunda región contiene un dominio carboxílico terminal llamado CCT, llamado así por estar presente en proteínas de *CO*, *CO-Like* (*COL*) y *TIMING OF CAB EXPRESSION1* (*TOC1*) (Martynov y Khavkin, 2005).

El dominio CCT presentó un módulo de aproximadamente 43 aminoácidos, el cual estuvo relacionado con la traducción de las señales luminosas. Esta región CCT, fue suficiente para regular la función de proteínas de localización nuclear y presen-

nal carboxylic dominance called CCT, present in proteins of *CO*, *CO-Like* (*COL*) and *TIMING OF CAB EXPRESSION1* (*TOC1*) (Martynov and Khavkin, 2005).

The CCT domain showed a module of 43 amino acids approximately, which was related with the translation of light signals. This CCT region was enough to regulate the function of nuclear location proteins and they exhibit additional roles in the protein-protein interaction (Kurup and Holdsworth, 2000; Kwan *et al.*, 2005). *MUSACO 1*, showed a CCT region and a box with zinc fingers domain, these had almost 40 amino acids. One or two copies of these reasons generally have been related to a fingers ring, to form the tripartite reason. This reason was essentially found in transcription factors, ribonucleoproteins and proto-oncoproteins, with a domain function yet unclear (Borden, 1998). This Zinc fingers box *MUSACO1* was located on the amino acid 10 of 57 (E: 8.3e-17). The align *MUSACO* with proteins related to other species with ClustaW showed a highly conserved zinc finger box. Nevertheless, through the Blast2 analysis only were reported between 38 and 50% of identical amino acids that reflected the rest of amino acids sequence of *USACO1* protein was very variable with regard to the rest of *CO* proteins. The phylogenetic tree *MUSACO1* showed that this genus was related to *CO* sequences found of *O. sativa* and *H. vulgare*. These results also agreed with other research where sequences *CO* found in *Lolium perenne* "Ryegrass" (*LpCO*), also related to *O. sativa* and *H.*

taron roles adicionales en la interacción proteína-proteína (Kurup y Holdsworth, 2000; Kwan *et al.*, 2005). *MUSACO 1*, presentó una región CCT y una caja con dominios de dedos de Zinc; estos tuvieron alrededor de 40 aminoácidos. Uno o dos copias de estos motivos han sido generalmente asociados con un anillo de dedos, para formar el llamado motivo tripartito. Este motivo, se encontró esencialmente en factores de transcripción, ribonúcleo-proteínas y proto-oncoproteínas, no estando la función de este dominio claramente asignada (Borden, 1998). Esta caja de dedos de Zinc de *MUSACO1* fue localizada en el aminoácido 10 de 57 (E: 8,3e-17). El alineamiento *MUSACO* con proteínas relacionadas de otras especies de plantas con ClustaW, mostró un motivo altamente conservado denominado la caja del dedo de zinc. Sin embargo, mediante el análisis Blast2 solo se reportaron entre 38 a 50% de aminoácidos idénticos lo que reflejó que, el resto de la secuencia de aminoácidos de la proteína *MUSACO1* fue muy variable al resto de las proteínas *CO*. El árbol filogenético, *MUSACO1* mostró que este gen estuvo relacionado con secuencias de *CO* encontradas en plantas de *O. sativa* y *H. vulgare*. Estos resultados también concordaron con otra investigación donde se reportaron secuencias *CO* encontradas en *Lolium perenne* "Ryegrass" (*LpCO*), relacionadas también con los de *O. sativa* y *H. vulgare*, y con un 53 a 69% de homología en su secuencia con las de *CO* en *A. thailana* (Martín *et al.*, 2004).

Análisis de abundancia de ARN mensajero de *MUSAFLT* y

vulgare, and with 53 to 69% of similarity in its sequence with those of *CO* in *A. thailana* (Martín *et al.*, 2004).

Abundance analysis of messenger ARN of *MUSAFLT* and *MUSACO*

The apex of group 3 showed 54.93 times of high levels of RNAm for *MUSAFLT*, when comparing to apex of less development stage, increasing the expression value in *MUSAFLT* of 10 to 1000 times on apex from young stage to the adult stage or in floral transition (table 1). This increase of *MUSAFLT* value suggested strong genus participation on floral transition in this cultivar, because in *Arabidopsis FT* promoted flowering and they were positively regulated by transcription factors as *CO* genus in the same plants genus (Onouchi *et al.*, 2000). It has been proved that *FT* expression mainly happened in vascular tissue of leaves (An *et al.*, 2004) and that *FT* stimuli or the same *FT* translated to messenger was moved to the vegetative apexes to induce flowering (Kuem-Lim *et al.*, 2007). However, the *SOC1* genus very related to *FT*, was expressed both in leaves and in meristematic apexes. The size of *FT* protein (23 kD) was below size of plasmodesma expression limit, therefore, protein could be free removed from the meristematic apex; this movement changed during development of growing organs (Kwan *et al.*, 2005). Unlike those reported in *CO*, the *FT* messengers in long days conditions like those found in plants located in regions closed to the Equator, *FT* was accumulated during

MUSACO

Los ápices del grupo 3 mostraron 54,93 veces altos niveles de ARNm para *MUSAFLT*, al compararse con ápices de menor estado de desarrollo, incrementándose el valor de expresión en *MUSAFLT* de 10 a 1000 veces en ápices de estado joven al estado adulto o en transición floral (cuadro 1). Este incremento del valor de *MUSAFLT*, sugirió una fuerte participación del gen sobre la transición floral en este cultivar, ya que en *Arabidopsis FT* promovió la floración y fueron positivamente regulados por factores de transcripción como los del gen *CO* en el mismo género de plantas (Onouchi *et al.*, 2000). Se ha demostrado que la expresión de *FT*, ocurrió principalmente en el tejido vascular de las hojas (An *et al.*, 2004) y que el estímulo de *FT* o el mismo *FT* traducido a mensajero, se trasladó a los ápices vegetativos para inducir la floración (Kuem-Lim *et al.*, 2007). Sin embargo, el gen *SOC1* muy asociado con *FT*, se expresó tanto en hojas como en ápices meristemáticos. El tamaño de la proteína de *FT* (23 kD), estuvo por debajo del tamaño de

the day, being the dawn light the maximum peak and falling on twilight (Teper and Samach, 2005).

MUSACO, showed increases in its expression values in ten times when passing from group 1 to 2, or when increasing the number of emitted leaves, with a difference of more than 5.000 times superior in group 3 or in flowering stage, possibly by showing this strong participation in floral induction in *Musa* as reported in *Arabidopsis* plants. The main expression of *CO* was accomplished in leaves, could be very few the *MUSACO* treatments that as activator signal perhaps reached the plasmodesma to the meristematic area of apex where was perceived and accumulated in little quantities, but enough to activate other genes as *FT* and *SOC1*, accelerating the floral transition process (Kwan *et al.*, 2005). This could explain the great increase in the *MUSAFLT* expression when increase the number of emitted leaves in plantain plants. However, some researches have suggested that RNAm of *CO*, apparently they are able to emigrate through phloem

Cuadro 1. Expresión relativa (R) para los genes análogos de floración *MUSAFLT* y *MUSACO* en grupos de ápices de plantas de plátanos en diferentes estados de emisión foliar.

Table 1. Relative expression (R) for analogues genes of *MUSAFLT* and *MUSACO* flowering in groups of plantain plants apex in different stages of foliar emission.

Gen	Grupo 1 (15-21 hojas)	Grupo 2 (22-28 hojas)	Grupo 3 (29-35 hojas)
<i>MUSAFLT</i>	0,00995	0,027	54,948
<i>MUSACO</i>	0,0000336	0,00088	0,0232

exclusión límite de los plasmodesmos, por lo cual la proteína podría moverse libremente en el ápice meristemático, cambiando este movimiento durante el desarrollo de los órganos en crecimiento (Kwan *et al.*, 2005). Contrario a lo reportado en *CO*, los mensajeros de *FT* en condiciones de días largos como las encontradas en plantas ubicadas en zonas cercanas al Ecuador, *FT* se acumuló durante el día, siendo el pico máximo durante el crepúsculo y cayendo al anoche (Teper y Samach, 2005).

MUSACO, presentó incrementos en sus valores de expresión en diez veces al pasar del grupo 1 al 2, ó al aumentar el número de hojas emitidas, con una diferencia de más de 5.000 veces superior en el grupo 3 o en estado de floración, indicando posiblemente esto una participación fuerte en la inducción floral en *Musa* tal y como se ha señalado en plantas de *Arabidopsis*. La expresión principal de *CO* se realizó en las hojas, pudiendo ser muy pocos los transcritos de *MUSACO* que como señal activadora quizás lograron llegar a través de los plasmodesmos a la zona meristemática del ápice donde fue percibido y acumulado en pequeñas cantidades, pero suficientes para activar otros genes como por ejemplo *FT* y *SOC1*, acelerando el proceso de transición floral (Kwan *et al.*, 2005). Lo anterior podría explicar el gran incremento en la expresión de *MUSAFLT* al aumentar el número de hojas emitidas en las plantas de plátano. Sin embargo, algunas investigaciones han sugerido que los ARNm de *CO*, aparentemente no pueden emigrar a través del floema hasta los ápices

toward the meristematic apexes (Ayre and Turgeon, 2004) but they takes part on activation of *FT* genus (Fornara *et al.*, 2009).

In plantain, the corm or real stem, is the place where a great quantity of reserve starches were accumulated, in accordance with growth, reserves increased until moment of flowering, where the plant growth was stopped and only makes the growing inflorescence. In potato culture, a similar process occurred since the reserves accumulation was stopped when plants began the floral transition, being the *CO* genus one of genera responsible on diminishing of tuberization rate as a product of floral transition induction (Martínez *et al.*, 2002).

Conclusion

The floral transition in Dwarf Harton plantain mainly occurred in plants with more of 27 emitted leaves. The sequences of *MUSAFLT* and *MUSACO* found in plantain or in its cultivar apparently were similar to genera sequences of floral transition in other plants and they could have an important role in regulation of floral transition process on Dwaf Harton plantain cultivation. This statement could mean the first step to understand the molecular genetic mechanisms that induce flowering in plants of *Musa* genus.

Acknowledgements

Authors want to express their gratitude to the Oficina de Planificación del Sector Universitario (OPSU), to the Fondo Nacional de Investigacio-

meristemáticos (Ayre y Turgeon, 2004) pero si intervienen en la activación del gen *FT* (Fornara *et al.*, 2009).

En plátano, el cormo o tallo verdadero, es el sitio donde se acumularon una gran cantidad de almidones de reserva, conforme creció aumento las reservas hasta el momento de la floración, donde ya el crecimiento de la planta se detuvo y sólo hace la inflorescencia en desarrollo. En el cultivo de la papa, ocurrió un proceso similar, ya que la acumulación de reservas se detuvo cuando las plantas entraron en transición floral, siendo el gen *CO* uno de los genes responsables en la disminución de la tasa de tuberización producto de la inducción de la transición floral (Martínez *et al.*, 2002).

Conclusión

La transición floral en plátano Hartón enano, ocurrió principalmente en plantas con más de 27 hojas emitidas. Las secuencias encontradas de *MUSAFLT* y *MUSACO* hallados en plátano o en su cultivar fueron aparentemente análogos a secuencias de genes de transición floral señaladas en otras plantas y podrían tener un papel importante en la regulación del proceso de transición floral en el cultivo del plátano Hartón Enano. Lo anterior podría significar el primer paso para comprender los mecanismos genéticos moleculares que inducen la floración en plantas del género *Musa*.

nes Científicas and Tecnológicas (FONACIT), to the Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA) "Chama" station, to the Universidad Nacional Experimental Sur del Lago (UNESUR), to the Plants Molecular Genetics Laboratory of CINVESTAV, Irapuato México, and to the Vegetal Biotechnology Laboratory, Universidad del Zulia, by the financing and support offered to this research.

End of english version

Agradecimientos

A la Oficina de Planificación del Sector Universitario (OPSU), al Fondo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (FONACIT), al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA) estación Chama, a la Universidad Nacional Experimental Sur del Lago (UNESUR), al Laboratorio de Genética Molecular de Plantas del CINVESTAV, Irapuato México, y al Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Universidad del Zulia, por financiar y apoyar a la realización de este trabajo de investigación.

Literatura citada

Alonso-Blanco, C., S. El-Din, El-Assal, G. Coupland y M. Koorneef. 1998. Analysis of natural allelic variation at flowering time loci in the *Landsberg erecta* and *Cape verde* island ecotypes of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 149:749-764.

- Ayre, B. y R. Turgeon. 2004. Graft transmission of a floral stimulant derived from *CONSTANS*. *Plant Physiology* 135:2271-2278.
- Banfield, M. y R.L. Brady. 2000. The structure of *Antirrhinum centroradialis* protein (CEN) suggests a role as a kinase regulator. *J. Mol. Biol.* 297:1159-1170.
- Belalcazar, S. 1994. El cultivo del plátano en el trópico. Manual de asistencia técnica N° 50. INIBAP. Colombia. 376 pp.
- Borden, K.L. 1998. Ring fingers and B-boxes: zinc-binding protein-protein interaction domains. *Biochem. Cell Biol.* 76:351-358.
- Borchert, R., S. Renner, Z. Calle, D. Navarrete, A. Tye, L. Gautier, R. Spichiger y P. Hildebrand. 2005. Photoperiodic induction of synchronous flowering near the Equator. *Nature* 433:627-629.
- Deprez, R., A. Fijnvandraat, J. Ruijter y A. Moorman. 2002. Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions. *Analytical Biochemistry* 307:63-69.
- Doyle, J.J. y J.L. Doyle. 1990. Isolation of DNA from small amounts of plants tissues. *BRL Focus.* 12:13-15.
- Dumais, J. y D. Kwiatkowska. 2001. Analysis of surface growth in shoot apices. *The Plant Journal* 31:229-241.
- Farre, S., J. Higgins, A. Turner y D. Laurie. 2007. The flowering Locus T-like gene family in Barley (*Hordeum vulgare*). *Genetics* 176:599-609.
- Fornara, F., K. Panigrahi, L. Gissot, N. Sauerbrunn, M. Rühl, J. Jarillo y G. Coupland. 2009. *Arabidopsis* DOF Transcription Factors Act Redundantly to Reduce *CONSTANS* Expression and Are Essential for a Photoperiodic Flowering Response. *Developmental Cell*, 17(1):75-86.
- Haddad, O., R. Del Valle y R. Pargas. 1992. Algunas características del fruto del plátano Hartón enano (*Musa AAB*). *Agronomía Tropical* 42:329-351.
- Howell, S. 1998. Molecular genetics of vegetative plant development. 3rd Edition. Institute Cornell University Ithaca NY. 337 pp.
- ICA. Instituto Colombiano Agropecuario. 1991. El Cultivo del Plátano en el Trópico. Descripción de variedades cultivadas. Bogotá. Colombia. 35pp.
- Iskandar, H., R. Simpson, R. Casu, G. Bonnett, D. Maclean y J. Manners. 2004. Comparison of reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of gene expression in sugarcane. *Plant Molecular Biology* 22:325-337.
- Kojima, S., A. Takahashi, A. Kobayashi, L. Mona, T. Sasaki, T. Araki y Y. Masahiro. 2002. *Hd3a*, a Rice Ortholog of the *Arabidopsis FT* Gene, Promotes Transition to Flowering Downstream of *Hd1* under Short-Day Conditions. *Plant Cell Physiol.* 43(10):1096-1105.
- Kuem-Lim, M., H. Belenger, Y. Jin-Le, E. Verkonyi, E. Miura, K. Gendler, T. Lough y W. Lucas. 2007. Flowering Locus T protein may act as the long distance florigenic signal in the cucurbits. *Plant Cell Advance.* 10.1105/tve107051920.
- Kurup, S., H.D. Jones y M.J. Holdsworth. 2000. Interactions of the developmental regulator ABI3 with proteins identified from developing *Arabidopsis* seeds. *Plant J.* 21:143-155.
- Kwan, S., K. Chung, J. Kim, J. Hwan Lee, S. Myun, S. Jeon, S. Yeon, J. Seob y J. Hoon. 2005. *CONSTANS* Activates *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1* through *FLOWERING LOCUS T* to promote flowering in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 139:770-778.

- Martin, J., M. Storgaard, C. Andersen y K. Nielsen. 2004. Photoperiodic regulation of flowering in perennial ryegrass involving a *CONSTANS-Like* homolog. *Plant Molecular Biology* 56:159-169.
- Martínez, G., A. Virgos-Soler y S. Prat. 2002. Control of photoperiod-regulated tuberization in potato by the *Arabidopsis* flowering time gene *CONSTANS*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99:15211-15216.
- Martynov, V. y E. Khavkin. 2005. Polymorphism of the *CONSTANS* gene in *Brassica* plants. *Russian Journal of Plant Physiology* 52:242-248.
- Nakatsuka, T., A. Yoshiko, Y. Kakizaki, A. Kubota, N. Shimada y M. Nishihara. 2009. Over-expression of *Arabidopsis* *FT* gene reduces juvenile phase and induces early flowering in ornamental gentian plants. *Euphytica*. 168(1):113-119.
- Ohto, M., K. Onai, A. Furukawa, E. Aoki, T. Araki y A. Nakamura. 2001. Effect of sugar on vegetative development and floral transition in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 127:252-261.
- Onouchi, H., I. Igeño, C. Perilleu, K.Graves, y G. Coupland. 2000. Mutagenesis of plants over expressing *CONSTANS* demonstrates novel interactions among *Arabidopsis* flowering-time genes. *Plant Cell* 12:885-900.
- Ouevillon, E., V. Silventoinen, S. Pillai, N. Harte, N. Mulder, R. Apweiler y R. López. 2005. InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic Acids Research* 33:116-120.
- Rose, M., R. Emily, J.G. Schultz, G. Henikoff, S. Petrokovski, M. Claire, Mc. Callum y S. Henikoff. 1998. Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nucleic Acids Research* 26:1628-1635.
- Samach, A., H. Onouchi, S.E. Gold, G.S. Ditta, Z. Schwarz, M.F. Yanofsky y G. Coupland. 2000. Distinct roles of *CONSTANS* target genes in reproductive development of *Arabidopsis*. *Science* 288:1613-1616.
- Simpson, G., R. Gendall y C. Dean. 1999. When to switch to flowering. *Annul. Rev. Cell Dev. Biol.* 99:519-50.
- Summerville, W.A. 1944. Studies on nutrition as qualified by development in *Musa cavendishii* Lambert. *Queensl. J. agric. Sci.* 1:1-127.
- Takahashi Y; K. Teshima, S. Yokoi, H. Innan y K. Shimamoto. 2009. Variations in Hd1 proteins, *Hd3a* promoters, and *Ehd1* expression levels contribute to diversity of flowering time in cultivated rice. *PNAS* 106(11):4555-4560.
- Tao., T., H. Bohlenius, S. Ericsson, F. Parcy y O. Nilson. 2007. The mRNA of the *Arabidopsis* gene moves from leaf to shoot apex and induces flowering. *Science*. Do.10:1126/Science1117768.
- Teper, P. y A. Samach. 2005. The flowering integrator FT regulates SEPALLATA3 and FRUITFULL accumulation in Arabidopsis Leaves. *The Plant Cell* 17:2661-2675.
- Turk, F., F. Fornara y G. Coupland. 2007. Regulation and identity of florigen: flowering Locus T moves center stage. *Annual Review Plant Biology* 59:573-594.
- Vega, L. 2003. Curso práctico de PCR en Tiempo Real, Fundamentos y Aplicaciones. Manual de Asistencia Applied Biosystems. México. pp. 24.
- Weising, K. y G. Kahl. 1997. Hybridization-based microsatellite fingerprinting of plants and fungi. 54 pp. En: *DNA Markers: Protocols, Applications and Overviews* Caetano-Anollés G., y P. Gresshoff (Eds.). Wiley & Sons, New York.