

## Ambiente y reguladores de crecimiento en la expresión de Flowering Locus T en mango\*

### Environment and growth regulators in the expression of Flowering Locus T in mango

María Hilda Pérez Barraza<sup>1§</sup>, María Alejandra Gutiérrez Espinosa<sup>2</sup>, Raquel Cano Medrano<sup>2</sup>, Adriana Isabel Pérez Luna<sup>3</sup>, Tomás Osuna Enciso<sup>4</sup> e Irma Julieta González Acuña<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Carretera Internacional México-Nogales km 6, Santiago Ixcuintla, Nayarit. CP. 63300. Tel. 55 38718700, ext. 84416. <sup>2</sup>Colegio de Postgraduados-RGP-Fruticultura. Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo, Texcoco, Estado de México. CP. 56230. Tel. 595 9520200. (alexge@colpos.mx; racm@colpos.mx). <sup>3</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Costa de Hermosillo. Pascual Encinas Félix núm. 21, Col. La Manga, Hermosillo, Sonora. CP. 83220. Tel. 55 38718700, ext. 81313. (perez.adriana@inifap.gob.mx). <sup>4</sup>Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. Carretera El Dorado km 5.5, Col. Campo El Diez, Culiacán, Sinaloa. CP. 80129. (osuna@ciad.mx). <sup>§</sup>Autora para correspondencia: perez.mariahilda@inifap.gob.mx.

#### Resumen

La cuantificación y expresión de genes relacionados con floración constituye una herramienta importante para entender este proceso. Trabajos realizados en *Arabidopsis* spp. han servido como base para estudios moleculares en frutales. El objetivo fue cuantificar la expresión del gen flowering locus T (MiFT) en mango 'Ataulfo' y su relación con ambiente y reguladores de crecimiento. Se llevaron a cabo dos experimentos: 1) se aplicaron árboles con 2 500 mg L<sup>-1</sup> de paclobutrazol (PBZ) en una sola aplicación (1X) a 30 días después de la poda (ddp). Se colectaron hojas maduras de septiembre a diciembre 2013 y enero a febrero 2014 bajo condiciones de sol y sombreadas. Experimento 2: se aplicaron reguladores de crecimiento, PBZ (2 500 mg L<sup>-1</sup>, 1X), Prohexadiona de calcio (P-Ca) (500 mg L<sup>-1</sup>, 3X) y ácido giberélico (250 mg L<sup>-1</sup>, 1X). Se cuantificó la expresión MiFT, se evaluó el número y tipo de crecimiento emergido en floración, temperatura y precipitación. El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial en experimento 1 y completamente

#### Abstract

The quantification and expression of genes related to flowering is an important tool to understand this process. Studies carried out in *Arabidopsis* spp. have served as a basis for molecular studies in fruit trees. The objective was to quantify the expression of the gene flowering locus T (MiFT) in 'Ataulfo' mango and its relationship with environment and growth regulators. Two experiments were carried out: 1) trees with 2 500 mg L<sup>-1</sup> of paclobutrazol (PBZ) were applied in a single application (1X) at 30 days after pruning (ddp). The mature leaves were collected from September to December 2013 and January to February 2014 under sunny and shaded conditions. Experiment 2: growth regulators, PBZ (2 500 mg L<sup>-1</sup>, 1X), calcium prohexadione (P-Ca) (500 mg L<sup>-1</sup>, 3X) and gibberellic acid (250 mg L<sup>-1</sup>, 1X) were applied. The expression MiFT was quantified, the number and type of growth emerged in flowering, temperature and precipitation were evaluated. The experimental design was completely randomized with factorial arrangement in experiment 1 and completely randomized in experiment 2.

al azar en el experimento 2. MiFT se expresó en todos los meses muestreados, la expresión varió de 0.3 hasta 31.4%. Por otra parte, al evaluar la expresión del gen con respecto a la orientación del brote, los resultados fueron de 0.081% el lado sombreado y 12% el soleado. Brotes soleados presentaron el mayor porcentaje de floración (66%). MiFT se expresó en hojas tratadas con PBZ y P-Ca, la mayor expresión fue en diciembre, mes más frío, con 4.7 y 30.3%, respectivamente, lo que favoreció floración. Giberelinas inhibió la expresión del gen y por ende floración.

**Palabras claves:** *Mangifera indica* L., expresión de genes, floración, reguladores de crecimiento.

## Introducción

Actualmente, la identificación, cuantificación y expresión de genes relacionados con floración constituye una herramienta importante para entender el proceso desde inducción, iniciación y diferenciación floral en muchos frutales (Nishikawa *et al.*, 2007; Muñoz *et al.*, 2012). En mango, varios estudios mencionan que las hojas maduras son capaces de percibir el estímulo ambiental para floración y producir grandes cantidades de “florigero” bajo condiciones inductivas y transportarlo al meristemo apical desde una distancia de hasta 100 cm en condiciones subtropicales y de 52 en tropicales (Davenport y Ying, 2004; Davenport *et al.*, 2006; Ramírez y Davenport, 2010). La inducción floral se manifiesta por la generación de este “florigero” en la hoja, aparentemente desconocido.

En *Arabidopsis thaliana*, una especie anual, se han identificado cuatro rutas que permiten la floración; fotoperiodo, vernalización, giberelinas y autónoma, y su relación a nivel genético ha sido muy estudiado (Wilkie *et al.*, 2008). En la ruta del fotoperiodo que desencadena la floración en *Arabidopsis*, participa el reloj circadiano que conduce a que muchos metabolitos y procesos moleculares, como la expresión de genes, varíen a lo largo del día. Constans (CO), gen clave en el control de la floración de esta especie, proporciona el vínculo entre el mecanismo que detecta la luz del día y la producción de la señal de floración. CO es entonces un factor de transcripción que activa el gen flowering locus T (FT) el cual genera la señal de floración mediante su transcripto de FT mRNA que se traduce en la proteína FT (Corbesier *et al.*, 2007; Zeevaart, 2008).

MiFT was expressed in all sampled months, the expression varied from 0.3 to 31.4%. On the other hand, when evaluating the expression of the gene with respect to the orientation of the outbreak, the results were 0.081% on the shaded side and 12% on the sunny side. Sunny shoots had the highest flowering percentage (66%). MiFT was expressed in leaves treated with PBZ and P-Ca, the highest expression was in December, cooler month, with 4.7 and 30.3%, respectively, which favored flowering. Gibberellins inhibited the expression of the gene and therefore flowering.

**Keywords:** *Mangifera indica* L., flowering, gene expression, growth regulators.

## Introduction

Currently, identification, quantification and expression of genes related to flowering is an important tool for understanding the process from induction, floral initiation and differentiation in many fruit (Nishikawa *et al.*, 2007; Muñoz *et al.*, 2012). In mango, several studies mention that the mature leaves are able to perceive the environmental stimulus for flowering and produce large amounts of “florigero” under inductive conditions and transport it to the apical meristem from a distance of up to 100 cm in subtropical conditions and 52 in tropical (Davenport and Ying, 2004; Davenport *et al.*, 2006; Ramírez and Davenport, 2010). The floral induction is manifested by the generation of this “flower” on the leaf, apparently unknown.

In *Arabidopsis thaliana*, an annual species, four routes have been identified that allow flowering; photoperiod, vernalization, gibberellins and autonomous, and their relation at genetic level has been well studied (Wilkie *et al.*, 2008). In the photoperiod path that triggers flowering in *Arabidopsis*, the circadian clock is involved, which leads to many metabolites and molecular processes, such as gene expression, varying throughout the day. Constans (CO), the key gene in controlling the flowering of this species, provides the link between the mechanism that detects daylight and the production of the flowering signal. CO is then a transcription factor that activates the flowering locus T (FT) gene which generates the flowering signal through its FT mRNA transcript which translates into FT protein (Corbesier *et al.*, 2007; Zeevaart, 2008).

Esta proteína es considerada como el supuesto “florífero” mencionado hipotéticamente durante mucho tiempo como el responsable de la floración en muchas especies y se menciona que un mecanismo similar en frutales, incluyendo el mango (Wilkie *et al.*, 2008), podría estar envuelto en la inducción floral (Brunner y Nilsson, 2004).

Los estudios realizados en *Arabidopsis* han servido como base para estudios moleculares en especies frutales. En tropicales, los estudios generalmente incluyen una relación de la expresión del gene con la iniciación y desarrollo floral, ambiente y reguladores de crecimiento. En mandarina ‘Satsuma’ los niveles del gene homólogo FT incrementaron con temperaturas frías durante el tiempo de inducción floral (Nishikawa *et al.*, 2007) y en naranjo dulce hay evidencias que los niveles de homólogos leafy (LFY) y apétala (AP1) incrementan durante y después de la inducción floral con temperaturas frías (Pillitteri *et al.*, 2004).

En el híbrido transgénico de cítrico (*Citrus sinensis* L. Osbeck x *Poncirus trifoliata* L. Raf) una sobre-expresión de LFY y AP1 redujeron sustancialmente la fase juvenil, aunque la floración al parecer dependió del control ambiental (Peña *et al.*, 2001). En *Poncirus trifoliata* la expresión de FT le confiere la floración temprana (Endo *et al.*, 2005). Mientras que en mandarina ‘Moncada’ FT es inhibido por la carga de fruta (Muñoz *et al.*, 2011).

En árboles de naranjo dulce ‘Salustiana’, se observó que las giberelinas inhibieron floración reprimiendo la expresión de los genes homólogos flowering locus T (CiFT), en hojas; mientras que el paclobutrazol (PBZ) incrementó la floración estimulando su expresión. La actividad de los homólogos terminal flower 1, flowering locus C, suppressor of overexpression of constans 1, y apétala 1 no fueron afectados por los reguladores (Muñoz *et al.*, 2012).

En mango hay poca información al respecto, recientemente, un gene como el flowering locus T (FT) fue identificado y caracterizado. La secuencia de flowering locus T (MiFT) mostró una alta identidad al gene FT de otras plantas y su expresión incrementó en hojas bajo condiciones inductivas de floración (temperaturas bajas) y en árboles con baja producción de fruta. La aplicación de 250 mg L<sup>-1</sup> de ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) inhibió completamente la floración y la expresión de MiFT tanto en alta como en baja producción. En este estudio concluyen que MiFT es el factor clave en la floración del mango (Nakagawa *et al.*, 2012).

This protein is considered the “florífero” situation mentioned hypothetically long as responsible for flowering in many species and mentioned that a similar mechanism in fruits including mango (Wilkie *et al.*, 2008) could be involved in floral induction (Brunner and Nilsson, 2004).

Studies in *Arabidopsis* have served as the basis for molecular studies in fruit species. In tropical, studies generally include a relationship of gene expression with initiation and floral development, environment and growth regulators. In ‘Satsuma’ mandarin, levels of the homologous FT gene increased with cold temperatures during floral induction time (Nishikawa *et al.*, 2007) and in sweet orange there is evidence that levels of leafy (LFY) and apétala (AP1) homologues increase during and after floral induction with cold temperatures (Pillitteri *et al.*, 2004).

In the citrus transgenic hybrid (*Citrus sinensis* L. Osbeck x *Poncirus trifoliata* L. Raf) an overexpression of LFY and AP1 substantially reduced the juvenile phase, although flowering apparently depended on environmental control (Peña *et al.*, 2001). In *Poncirus trifoliata* the expression of FT gives it early flowering (Endo *et al.*, 2005). While in mandarin ‘Moncada’ FT is inhibited by fruit loading (Muñoz *et al.*, 2011).

In sweet orange trees ‘Salustiana’, it was observed that gibberellins inhibited flowering by repressing the expression of homologous genes flowering locus T (CiFT), in leaves; whereas paclobutrazol (PBZ) increased the flowering stimulating its expression. The activity of the terminal flower 1, flowering locus C, suppressor of overexpression of constans 1, and apétala 1 homologues were not affected by regulators (Muñoz *et al.*, 2012).

In mango there is little information about this, recently a gene like flowering locus T (FT) was identified and characterized. The flowering locus T (MiFT) sequence showed a high identity to the FT gene of other plants and its expression increased in leaves under inductive flowering conditions (low temperatures) and in trees with low fruit production. The application of 250 mg L<sup>-1</sup> of gibberellic acid (AG<sub>3</sub>) completely inhibited the flowering and expression of MiFT in both high and low production. In this study they conclude that MiFT is the key factor in the flowering of the mango (Nakagawa *et al.*, 2012).

De acuerdo a lo anterior, genes relacionados con el proceso de floración en plantas herbáceas como *Arabidopsis*, han servido como base para realizar estudios en frutales. En subtropicales y tropicales existen trabajos al respecto en cítricos pero en mango la información es muy escasa y nula en el caso de mango 'Ataulfo'. En esta especie es necesario realizar estudios a nivel molecular para tratar de contrarrestar los efectos del clima en la inducción, diferenciación y brotación floral. Basado en lo anterior, el objetivo de este estudio fue cuantificar la expresión del gen flowering locus T (MiFT) de floración en mango 'Ataulfo' y su relación con ambiente y reguladores de crecimiento.

## Materiales y métodos

El estudio se realizó durante el ciclo 2013-2014 con clima cálido (32-35/23-24 °C; día, noche) y presencia de lluvia durante los meses de octubre (122 mm), noviembre (161 mm) y diciembre (105 mm). Se seleccionó un huerto comercial de mango 'Ataulfo'/criollo regional de seis años de edad, en el municipio de Santiago Ixcuintla, Nayarit. La distancia de plantación fue 3 × 2.5 m entre hilera y árbol, respectivamente y manejado en tipo seto. El huerto se manejó bajo un sistema de riego por goteo, poda lateral (despunte de aproximadamente 50 cm, solo en lado oriente y poniente) y fertilización con 2 kg de Triple 17 por árbol al inicio de la temporada de lluvias (junio) y 1 kg de fertilizante orgánico (gallinaza) por árbol aplicado en septiembre.

En dicho huerto, se seleccionaron 60 árboles de vigor uniforme, en los cuales se realizaron dos experimentos. Experimento 1. Expresión de MiFT en hojas tratadas con PBZ por efecto de época de muestreo y orientación en el árbol. Se aplicó una sola dosis (1X) de 2 500 mg L<sup>-1</sup> de PBZ a 12 árboles, 30 días después de la poda (ddp). Como testigo, se colectaron brotes antes de la aplicación de PBZ (septiembre 30) y posteriormente a 60, 90, 120 y 150 días después de la aplicación (dda); cada mes, iniciando en noviembre 30 de 2013 a febrero de 2014 (inicio de floración). En cada fecha, 36 brotes fueron seleccionados de seis árboles por tratamiento asignados previamente para el muestreo y se tomaron 12 brotes en orientación norte (lado sombreado), 12 en oriente (lado soleado por la mañana) y 12 en poniente (lado soleado por la tarde). Las hojas fueron separadas, identificadas y almacenadas a -80 °C hasta su utilización para la extracción de ARN.

According to the above, genes related to the flowering process in herbaceous plants such as *Arabidopsis*, have served as a basis for studies in fruit trees. In subtropical and tropical, there are works in this respect in citrus, but in mango the information is very scarce and null in the case of 'Ataulfo' mango. In this species it is necessary to carry out studies at the molecular level to try to counteract the effects of climate on induction, differentiation and floral bud. Based on the above, the objective of this study was to quantify the expression of the flowering locus T (MiFT) in 'Ataulfo' mango and its relationship with environment and growth regulators.

## Materials and methods

The study was conducted during the period 2013-2014 with warm weather (32-35/23-24 °C; day, night) and rainfall during October (122 mm), November (161 mm) and December (105 mm). A six year old 'Ataulfo'/ creole regional mango orchard was selected in the municipality of Santiago Ixcuintla, Nayarit. The planting distance was 3 × 2.5 m between row and tree, respectively and managed in hedge type. The orchard was managed under a drip irrigation system, lateral pruning (cut of approximately 50 cm, only on east side and west) and fertilization with 2 kg of Triple 17 per tree at the beginning of the rainy season (June) and 1 kg of organic fertilizer (manure) per tree applied in September.

In this orchard, 60 trees of uniform vigor were selected, in which two experiments were performed. Experiment 1. Expression of MiFT in leaves treated with PBZ by effect of sampling time and orientation in the tree. A single dose (1X) of 2 500 mg L<sup>-1</sup> of PBZ was applied to 12 trees, 30 days after pruning (ddp). As a control, shoots were collected before the application of PBZ (September 30) and later at 60, 90, 120 and 150 days after application (dda); that is, each month, beginning on November 30, 2013 until February 2014 (beginning of flowering). At each date, 36 outbreaks were selected from only six trees per treatment previously assigned for sampling and 12 outbreaks were taken in north orientation (shaded side), 12 in the east (sunny side in the morning) and 12 in the west (sunny side by the afternoon). The leaves were separated, identified and stored at -80 °C until used for RNA extraction.

Experimento 2. Expresión de MiFT en hojas de Mango 'Ataulfo' por efecto de reguladores de crecimiento. Se evaluaron cuatro tratamientos. 1. La dosis de 500 mg L<sup>-1</sup> de prohexadiona de calcio (P-Ca), en tres aplicaciones (3X) a 30+45+60 días después de la poda (ddp). 2. Una dosis de 2500 mg L<sup>-1</sup> de PBZ en una sola aplicación (1X) 30 ddp. 3. Una dosis de 200 mg L<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub>, una aplicación (1X) a 120 ddp y 4. Testigo. En todos los casos, se asperjaron 12 árboles. Para los tratamientos con P-Ca y PBZ, se colectaron brotes emergidos a los 0 días después de la aplicación (dda) y posteriormente a 60, 90, 120 y 150 días después de la aplicación (dda); es decir, de noviembre 2013 a febrero 2014 (inicio de floración). En árboles asperjados con AG<sub>3</sub> (noviembre 30, 2013) se colectaron brotes a los 0, 30 y 90 días después de la aplicación. En el testigo, los brotes se colectaron en fecha similar a los tratamientos P-Ca y PBZ. En cada fecha, 36 brotes fueron seleccionados de solo seis árboles (alrededor y parte media) por tratamiento asignados previamente para el muestreo. Al igual que el experimento anterior, las hojas fueron separadas, identificadas y almacenadas a -80 °C hasta su utilización para la extracción de ARN.

En ambos experimentos PBZ (Austar<sup>®</sup>) fue aplicado al suelo bañando el tallo principal a una altura de 30 cm de la base del suelo. En el segundo experimento, la solución de P-Ca (Apogee<sup>®</sup>) se preparó con agua corriente y se usó 1 ml L<sup>-1</sup> de surfactante Inex<sup>®</sup>. P-Ca se aplicó al follaje a punto de goteo mediante bomba aspersora motorizada. La solución de AG<sub>3</sub> se preparó con agua corriente y se usó urea foliar 1% como penetrante y 1 ml L<sup>-1</sup> de surfactante Inex<sup>®</sup>. Los árboles testigo fueron asperjados con agua + urea + surfactante.

Las variables evaluadas en ambos experimentos fueron las siguientes:

1. Extracción, cantidad y calidad de ARN y cDNA. Para la extracción de ARN, se utilizó la metodología de Nakagawa *et al.* (2012). La extracción se hizo utilizando un Kit RNAqueous (Applied Biosystems). Para remover los fenoles, se utilizó el kit Plant RNA isolation Aid (Applied Biosystems), el cual fue agregado en el primer paso del procedimiento de extracción. Posteriormente la extracción fue tratada con TURBO DNA-free Kit (Applied Biosystems) para remover el DNA genómico y purificar y limpiar la muestra. La cuantificación y evaluación de calidad se realizó mediante espectrofotometría de UV (Thermo Scientific NanoDrop 2000).

Experiment 2. Expression of MiFT in leaves of Mango 'Ataulfo' by effect of growth regulators. Four treatments were evaluated. 1. The dose of 500 mg L<sup>-1</sup> of calcium prohexadione (P-Ca), in three applications (3X) at 30 + 45 + 60 days after pruning (ddp). 2. A dose of 2 500 mg L<sup>-1</sup> of PBZ in a single application (1X) 30 ddp. 3. A dose of 200 mg L<sup>-1</sup> of AG<sub>3</sub>, one application (1X) at 120 ddp and 4. Control. In all cases, 12 trees were sprinkled. For the treatments with P-Ca and PBZ, emerged shoots were collected at 0 days after application (dda) and later at 60, 90, 120 and 150 days after application (dda); that is, from November 2013 to February 2014 (beginning of flowering). In trees sprayed with AG<sub>3</sub> (November 30, 2013) shoots were collected at 0, 30 and 90 days after application. In the control, the shoots were collected at a similar date to the treatments P-Ca and PBZ. At each date, 36 outbreaks were selected from only six trees (around and half) per treatment previously assigned for sampling. Like the previous experiment, the leaves were separated, identified and stored at -80 °C until their use for RNA extraction.

In both experiments PBZ (Austar<sup>®</sup>) was applied to the soil by bathing the main stem at a height of 30 cm from the soil base. In the second experiment, the solution of P-Ca (Apogee<sup>®</sup>) was prepared with tap water and 1 ml L<sup>-1</sup> of Inex<sup>®</sup> surfactant was used. P-Ca was applied to the foliage to drip point by motorized spray pump. The AG<sub>3</sub> solution was prepared with tap water and 1% leaf urea was used as the penetrating agent and 1 ml L<sup>-1</sup> of Inex<sup>®</sup> surfactant was used. The control trees were sprayed with water + urea + surfactant.

The variables evaluated in both experiments were the following:

1. Extraction, quantity and quality of RNA and cDNA. For the extraction of RNA, the methodology of Nakagawa *et al.* (2012). Extraction was done using an RNAqueous Kit (Applied Biosystems). To remove the phenols, the Plant RNA isolation Aid kit (Applied Biosystems) was used, which was added in the first step of the extraction procedure. Subsequently the extraction was treated with TURBO DNA-free Kit (Applied Biosystems) to remove the genomic DNA and to purify and clean the sample. Quantification and quality evaluation was performed by UV spectrophotometry (Thermo Scientific NanoDrop 2000).



Posterior a esto se procedió a la síntesis de ADN complementario; la primera hebra del cDNA fue sintetizado por retrotranscriptasa, usando SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit (Applied Biosystems). La cuantificación y evaluación fue similar a la del ARN.

2. Expresión relativa del gen MiFT. Posterior a la extracción de ARN y síntesis de ADN complementario cDNA (por sus siglas en inglés), la cuantificación de la expresión relativa (significa que el nivel del gen de interés en la muestra tratada representa sólo un (%) del nivel de gen endógeno) fue mediante PCR Tiempo Real, reacción en cadena de la polimerasa tiempo real (qPCR, por sus siglas en inglés), siguiendo la metodología de Nakagawa *et al.* (2012).

Los primers forward y reverse, empleados para la cuantificación y expresión del gen MiFT en mango 'Ataulfo', fueron los reportados por Nakagawa *et al.* (2012) y las secuencias de los primers fueron las siguientes:

Gen	Secuencia	Primer
MiFT	CAACATTGGGGATTACAGG	Forward
	GAAGTAAACAGCAGCCACAGGA	Reverse

El PCR tiempo real, fue realizado con Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Applied Biosystems) usando StepOne (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. Cada reacción contenía 12.5 µl de Platinum® SYBR® Green, 0.5 µl de cada uno de los primers forward y reverse, 0.5 µl de ROX, 9 µl de agua deionizada (dH<sub>2</sub>O), 2 µl de cDNA de la muestra. Las condiciones del termociclador fueron 95 °C por 30 s seguido de 40 ciclos de 95 °C por 5 s y 60 °C por 30 s. Se utilizó un gene factor de amplificador de mango (MiEF) como un control interno (endógeno). PCR tiempo real fue realizado en tres repeticiones y los niveles de transcripción fueron normalizados contra MiEF. El cálculo de la expresión relativa del gen se realizó mediante el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  propuesto por Livak y Schmittgen (2001).

3. Número y tipo de crecimiento. En ambos experimentos y en los seis árboles restantes (sin muestreo de brotes) de cada tratamiento, se etiquetaron 30 brotes apicales árbol<sup>-1</sup> emergidos después de la poda de verano (agosto 5, 2013); es decir, 180 por tratamiento. En estos brotes se registró el número y tipo de crecimiento (vegetativo, reproductivo e inactivo) emergido en la yema apical de los brotes durante el periodo de floración. Con estos datos, se calculó el porcentaje de brotes florales, vegetativos e inactivos, considerando

Subsequent to this we proceeded to the synthesis of complementary DNA; the first strand of the cDNA was synthesized by retrotranscriptase, using SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit (Applied Biosystems). Quantification and evaluation were similar to RNA.

2. Relative expression of the MiFT gene. Following the extraction of RNA and complementary DNA synthesis cDNA, the quantification of relative expression (means that the level of the gene of interest in the treated sample represents only one (%) of the endogenous gene level) was by Real Time PCR, real-time polymerase chain reaction (qPCR), following the methodology of Nakagawa *et al.* (2012).

The forward and reverse primers used for the quantification and expression of the MiFT gene in 'Ataulfo' mango were those reported by Nakagawa *et al.* (2012) and the sequences of the primers were as follows:

Gen	Secuencia	Primer
MiFT	CAACATTGGGGATTACAGG	Forward
	GAAGTAAACAGCAGCCACAGGA	Reverse

The real-time PCR was performed with Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Applied Biosystems) using StepOne (Applied Biosystems) following the manufacturer's instructions. Each reaction contained 12.5 µl of Platinum® SYBR® Green, 0.5 µl of each of the forward and reverse primers, 0.5 µl of ROX, 9 µl of deionized water (dH<sub>2</sub>O), 2 µl of sample cDNA. The thermocycler conditions were 95 °C for 30 s followed by 40 cycles of 95 °C for 5 s and 60 °C for 30 s. A mango amplifier factor gene (MiEF) was used as an internal (endogenous) control. PCR real-time was performed on three replicates and transcript levels were normalized against MiEF. The relative expression of the gene was calculated using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method proposed by Livak and Schmittgen (2001).

3. Number and type of growth. In both experiments and in the six remaining trees (without outbreak sampling) of each treatment, 30 tree<sup>-1</sup> apical shoots emerged after summer pruning (August 5, 2013); that is, 180 per treatment. In these outbreaks, the number and type of growth (vegetative, reproductive and inactive) emerged in the apical bud of shoots during the flowering period. With these data, the percentage of floral, inactive and vegetative shoots was calculated, considering the number of each of them among the total number of outbreaks evaluated, e.g. number of floral outbreaks/total outbreaks marked.

el número de cada uno de ellos entre el total de brotes evaluados; por ejemplo número de brotes florales/total de brotes marcados.

4. Temperatura y precipitación. Los datos de temperatura fueron tomados del sensor colocado en el experimento anterior y los de precipitación de la estación Verdineño, ubicada a 2 km del huerto (Red de Estaciones Agroclimatológicas del estado de Nayarit).

En el experimento 1, se realizaron pruebas de normalidad Shapiro-Wilks, debido a los valores obtenidos de QR (cantidad relativa) no presentaron distribución normal. Se ajustaron con transformaciones y se analizaron bajo un diseño experimental fue completamente al azar, con arreglo de tratamientos factorial (5x3), donde los factores fueron los siguientes: Fechas (septiembre, noviembre, diciembre, enero y febrero) y orientación en el árbol (lado oriente, poniente y norte). Se evaluaron 15 tratamientos, más un testigo, con tres repeticiones y se analizó con estadísticas no paramétricas, con la prueba de Kruskal-Wallis, que permitió comparación múltiples.

En el experimento 2, el diseño experimental fue completamente al azar, evaluando cuatro tratamientos con seis repeticiones, 30 brotes por repetición como parcela útil. Se usó la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) para comparación de medias. Se utilizó el programa SAS versión 9.2.

## Resultados y discusión

### Cuantificación y calidad de RNA

En general, la cantidad promedio de RNA en hojas maduras con PBZ (2 500 mg L<sup>-1</sup>, 1X a 30 ddp) fue de 44.7 ng μL<sup>-1</sup> alcanzando una relación 260/280 de 1.96 en promedio. La cantidad promedio de cDNA fue 2103.6 ng μL<sup>-1</sup> y una relación 260/280 de 1.87 (Cuadro 1). En hojas con P-Ca (500 mg L<sup>-1</sup>, 3X a 30+45+60 ddp) la cantidad de RNA fue de 42.3 ng μL<sup>-1</sup>, con una relación de 1.95 (260/280), mientras que la de cDNA fue de 2025 ng μL<sup>-1</sup> y una relación de 1.87. Con AG<sub>3</sub>, la cantidad de RNA fue de 36.1 ng μL<sup>-1</sup> y de 2006.7 el contenido de cDNA con una relación 260/280 de 1.92 y 1.85, respectivamente. En hojas sin regulador, se encontró una cantidad de 33.6 ng μL<sup>-1</sup> de RNA y 2006.3 ng μL<sup>-1</sup> de cDNA, la relación 260/280 fue de 1.89 y 1.85, respectivamente.

4. Temperature and precipitation. The temperature data were taken from the sensor placed in the previous experiment and the precipitation of the station Verdineño, located 2 km from the orchard (Network of Agroclimatological Stations of the state of Nayarit).

In experiment 1, Shapiro-Wilks normality tests were performed, because the values obtained from QR (relative amount) had no normal distribution. They were adjusted with transformations and analyzed under a randomized experimental design with factorial treatments (5x3), where the factors were as follows: Dates (September, November, December, January and February) and orientation in the tree (east, west and north). Fifteen treatments, plus one control, with three replicates were evaluated and analyzed with non-parametric statistics, with the Kruskal-Wallis test, which allowed multiple comparison.

In Experiment 2, the experimental design was completely randomized, evaluating four treatments with six replicates, 30 shoots per replicate as a useful plot. The Tukey test ( $p \leq 0.05$ ) was used for comparison of means. The SAS version 9.2 program was used.

## Results and discussion

### Quantification and quality of RNA

In general, the average amount of RNA in mature leaves with PBZ (2 500 mg L<sup>-1</sup>, 1X at 30 dpp) was 44.7 ng μL<sup>-1</sup> reaching a 260/280 ratio of 1.96 on average. The average amount of cDNA was 2103.6 ng μL<sup>-1</sup> and a 260/280 ratio of 1.87 (Table 1). In leaves with P-Ca (500 mg L<sup>-1</sup>, 3X at 30 + 45 + 60 ddp) the amount of RNA was 42.3 ng μL<sup>-1</sup>, with a ratio of 1.95 (260/280), while that of cDNA was 2025 ng μL<sup>-1</sup> and a ratio of 1.87. With AG<sub>3</sub>, the amount of RNA was 36.1 ng μL<sup>-1</sup> and of 2006.7 the cDNA content with a 260/280 ratio of 1.92 and 1.85, respectively. In leaves without regulator, we found an amount of 33.6 ng μL<sup>-1</sup> RNA and 2006.3 ng μL<sup>-1</sup> cDNA, the 260/280 ratio was 1.89 and 1.85, respectively.

Irrespective of the experiment, the extracted amount of RNA in 'Ataulfo' mango leaves was sufficient to achieve an outstanding amount of cDNA once converted by retrotranscriptase, an enzyme that exists in nature as part of the virus replication mechanism, and uses a tRNA as oligonucleotide or primer (Falcon and Valera, 2007).

**Cuadro 1. Cantidad y calidad de RNA y cDNA en Hojas de mango ‘Ataulfo’.**  
**Table 1. Quantity and quality of RNA and cDNA in ‘Ataulfo’ mango leaves.**

Tratamiento	RNA (ng $\mu\text{l}^{-1}$ )	Relación (260/280 <sup>2</sup> )	cDNA (ng $\mu\text{l}^{-1}$ )	Relación (260/280 <sup>2</sup> )
PBZ 2 500 1X	44.7	1.96	2 103.6	1.87
P-Ca 500 3X	42.3	1.95	2 025.5	1.87
AG <sub>3</sub> 200 1X	36.1	1.92	2 006.7	1.86
Testigo	33.6	1.89	2 006.3	1.85
CV	52.9	4.37	5.56	1.81

<sup>2</sup>= Longitud de onda para absorción de los ácidos nucleicos/proteínas (Luz UV).

Independientemente del experimento, la cantidad extraída de ARN en hojas de mango ‘Ataulfo’ fue suficiente para lograr una cantidad sobresaliente de cDNA una vez convertido mediante retrotranscriptasa, enzima que existe en la naturaleza como parte del mecanismo de replicación en virus y utiliza un tARN como oligonucleotido o primer (Falcon y Valera, 2007).

El ARN extraído fue de excelente calidad, de acuerdo a la relación 260/280 obtenida en el espectrofotómetro. La relación entre las lecturas obtenidas a 260 nm y 280 nm ( $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ ) proveen un estimado de la pureza de los ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos tienen un máximo de absorción a una longitud de onda de 260 nm. A esta longitud por lo tanto, la absorción es un indicativo de la concentración, mientras que en la longitud 280 nm, la absorción muestra proteínas y compuestos fenoles. Las extracciones de ácidos nucleicos de buena calidad y pureza deben tener una relación 260/280 con valores entre 1.8-2, cantidades menores a estos significa que hay presencia de proteínas, fenoles u otros contaminantes que pudieran interferir con los resultados de los ensayos a realizar (Wilfinger *et al.*, 1997; Anónimo, 2007). De igual manera la cantidad de cDNA obtenido fue de buena calidad sin contaminación de compuestos como los mencionados anteriormente. Esto permitió realizar de manera eficiente la qPCR para cuantificar la expresión del gen MiFT, en ambos experimentos.

### Temperatura y precipitación

En 2013-2014, la temperatura mínima en los meses de octubre y noviembre se mantuvo entre 23 y 24 °C, mientras que la máxima fue entre 32 y 35 °C, en diciembre la temperatura mínima descendió hasta 17 °C y en enero y febrero se mantuvo entre 15 y 18 °C. Se tuvo presencia de lluvias durante el mes de octubre y noviembre (122 y 161 mm, respectivamente), en diciembre la precipitación fue de 105 mm y hubo escasa lluvia en enero y febrero (Figura 1).

The extracted RNA was of excellent quality, according to the ratio 260/280 obtained in the spectrophotometer. The ratio between the readings obtained at 260 nm and 280 nm ( $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ ) provides an estimate of the purity of the nucleic acids. Nucleic acids have a maximum absorption at a wavelength of 260 nm. At this length therefore, the absorption is indicative of the concentration, whereas in the 280 nm length, the absorption shows proteins and phenol compounds. Nucleic acid extractions of good quality and purity should have a 260/280 ratio with values between 1.8-2, lesser amounts mean that there are presence of proteins, phenols or other contaminants that could interfere with the results of the tests to be performed (Wilfinger *et al.*, 1997; Anónimo, 2007). Likewise the amount of cDNA obtained was of good quality without contamination of compounds as mentioned above. This allowed the qPCR to be efficiently performed to quantify the expression of the MiFT gene in both experiments.

### Temperature and precipitation

In 2013-2014, the minimum temperature in October and November remained between 23 and 24 °C, while the maximum temperature was between 32 and 35 °C, in December the minimum temperature dropped to 17 °C and in January and February remained between 15 and 18 °C. Rainfall was observed during October and November (122 and 161 mm, respectively), in december rainfall was 105 mm and there was little rainfall in January and February (Figure 1).

Experiment 1. Expression of MiFT by period effect and orientation in the tree. The analysis of variance for the QR variable, relative amount of expression of the gene of interest MiFT, showed high significance for the intercept and months (Table 2). While the multiple comparison with Kruskal-Wallis of the MiFT gene expression according to the orientation, showed a relation for the west and east side (Table 3).



Experimento 1. La expresión de MiFT por efecto de la época y orientación en el árbol. El análisis de varianza para la variable correspondiente QR, cantidad relativa de la expresión del gen de interés MiFT, mostró alta significancia para el intercepto y meses (Cuadro 2). Mientras que la comparación múltiple, con Kruskal-Wallis, de la expresión del gen MiFT de acuerdo a la orientación, mostró relación para el lado poniente y oriente (Cuadro 3).

In Figure 2, the results obtained in the expression of the gene of interest MiFT in relation to the endogenous MiEF gene are shown. Regarding the time of sampling, the relative expression of MiFT was observed in all months sampled. The expression varied from 0.30 to 3.4 with respect to MiEF. The month of greatest expression was december followed by january and february. Regarding orientation, the relative expression of MiFT was on average 0.81, 1.9 and 0.54 on the north, east and west sides, respectively (Figure 2).

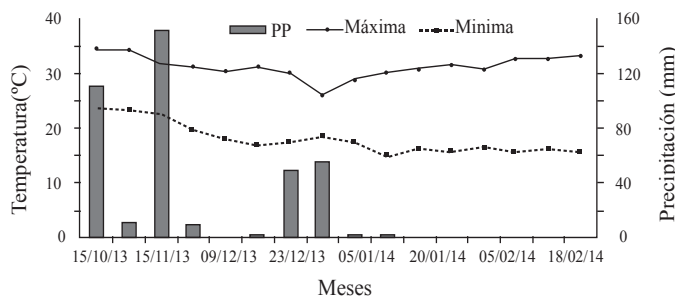
**Cuadro 2. Análisis de varianza para datos transformados (Ln X+1) de la expresión del gen.**  
**Table 2. Analysis of variance for transformed data (Ln X+1) of gene expression.**

Efecto	SC	GL	CM	F	P
Intercepto	42.86635	1	42.86635	637.4918	0
Meses	7.31809	4	1.82952	27.208	0
Orientación	9.67863	2	4.83932	71.9685	
Meses*orientación	32.51464	8	4.06433	60.4431	
Error	2.01727	30	0.06724		

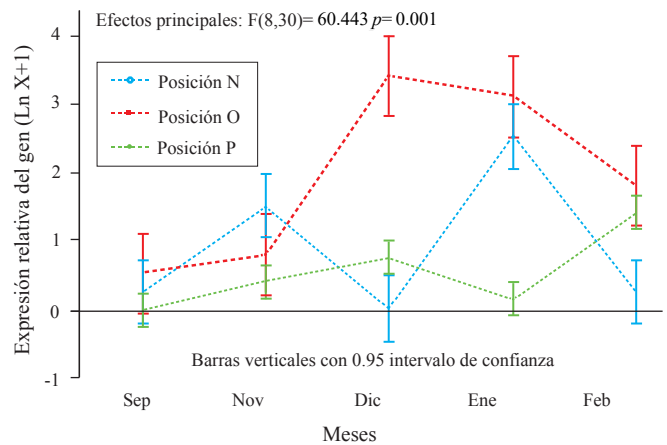
**Cuadro 3. Comparación múltiple de la expresión del gen MiFT según la orientación en el árbol. Kruskal-Wallis.**

**Table 3. Multiple comparison of the MiFT gene expression according to the orientation in the tree. Kruskal-Wallis.**

Orientación	Norte (N)	Oriente (O)	Poniente (P)
Norte (N)		0.820157	1.862729
Oriente (O)	0.820157		2.682885
Poniente (P)	1.862729	2.682885	



**Figura 1. Temperatura máxima, mínima y precipitación (PP) presentadas durante el periodo de inducción, iniciación y brotación floral en mango ‘Ataulfo’.**  
**Figure 1. Maximum temperature, minimum and precipitation (PP) presented during the period of induction, initiation and floral sprouting in ‘Ataulfo’ mango.**



**Figura 2. Expresión relativa de MiFT con relación a MiEF en hojas de mango ‘Ataulfo’ tratadas con PBZ. N, O y P, corresponden a norte, oriente y poniente del árbol.**  
**Figure 2. Relative expression of MiFT relative to MiEF in ‘Ataulfo’ mango leaves treated with PBZ. N, O and P, correspond to north, east and west of the tree.**

Considering the interaction it was found that in September the expression was MiFT was 0.25 and 0.53 in north and east side, respectively, in November the expression was 1.51, 0.8 and 0.4 in north, east and west side, in December MiFT was expressed only on the east side with 3.4 and west with 0.75, while in january the expression was 2.5 and 0.15 on

En la Figura 2, se muestran los resultados obtenidos en la expresión del gen de interés MiFT con relación al gen endógeno MiEF. Respecto a la época de muestreo, la expresión relativa de MiFT fue observada en todos los meses muestreados. La expresión varió de 0.30 hasta 3.4 respecto a MiEF. El mes de mayor expresión fue diciembre seguido de enero y febrero. Con relación a la orientación, la expresión relativa de MiFT fue en promedio de 0.81, 1.9 y 0.54 en el lado norte, oriente y poniente, respectivamente (Figura 2).

Considerando la interacción se encontró que en el mes de septiembre la expresión fue MiFT fue de 0.25 y 0.53 en lado norte y oriente, respectivamente, en noviembre la expresión fue de 1.51, 0.8 y 0.4 en lado norte, oriente y poniente, en diciembre MiFT se expresó solo en lado oriente con 3.4 y poniente con 0.75, mientras que en enero la expresión fue de 2.5 y 0.15 en lado norte y poniente y de 3.1 en lado oriente. En febrero la expresión fue en lado norte, oriente y poniente de 0.25, 1.8 y 0.5, respectivamente.

En hojas tratadas con PBZ, la expresión de MiFT (gen de interés) fue observada en todos los meses de estudio, pero solo en hojas de brotes soleados durante la mañana se expresó en mayor cantidad respecto a las hojas de brotes soleado por la tarde y hojas completamente sombreadas. En hojas de brotes sombreados (lado norte), la expresión mayor expresión fue en los meses de noviembre y enero; pero fue mínima comparada con lado oriente. Lo anterior, indica que probablemente el gen MiFT está regulado por luz al expresarse en mayor cantidad del lado solado y una mínima expresión en lado norte donde los árboles siempre están sombreados por la unión de copas entre árboles (formación tipo seto).

Puede observarse que en el mes de septiembre (antes de la aplicación de PBZ), la expresión fue nula en hojas con orientación poniente, pero hubo una mínima expresión del gen en hojas soleadas del lado oriente; en los siguientes meses MiFT presentó una mínima expresión en hojas sombreadas probablemente por efecto del regulador PBZ, lo que dio lugar a que un pequeño porcentaje de brotes sombreados florecieran.

En manzano 'Fuji' (36° latitud norte, 139° longitud oeste y 747 msnm) no encontraron diferencias en la expresión del gen flowering locus T (MdFT1) (homólogo de MiFT) en yemas apicales de brotes sombreados y soleados pero la expresión de MiTFL1 (repressor floral) fue mayor en brotes

north and west sides and 3.1 on east side. In February, the expression was on the north, east and west sides of 0.25, 1.8 and 0.5, respectively.

In leaves treated with PBZ, the expression of MiFT (gene of interest) was observed in all months of study, but only in leaves of sunny buds during the morning was expressed in greater quantity with respect to leaves of sunny shoots in the afternoon and completely shaded leaves. In leaves of shaded shoots (north side), the expression greater expression was in the months of November and January; but it was minimal compared to the east side. This indicates that the MiFT gene is probably regulated by light when expressed in greater quantity on the soil side and a minimum expression on the north side where the trees are always shaded by the union of tree tops (hedge-like formation).

It can be observed that in the month of September (before the application of PBZ), the expression was null in leaves with orientation west, but there was a minimal expression of the gene in sunny leaves of the east side; in the following months MiFT presented a minimal expression in leaves shaded probably by effect of the regulator PBZ, which resulted in that a small percentage of shaded shoots flourished.

In 'Fuji' apple tree (36° north latitude, 139° west longitude and 747 meter above sea level) found no difference in flowering locus T (MdFT1) gene expression (MiFT homolog) in apical buds of shaded and sunny buds but the expression of MiTFL1 (floral repressor) was higher in shaded shoots (Kittikorn *et al.*, 2011), results that do not coincide with our study, despite results in apple, were obtained in different species and tissue and shading was only 50% and in the present study conducted under field conditions very different from those of apple tree (21° north latitude 105° west longitude, 150 m), at least on the north side, the shade was about 90%.

The highest expression was found in December and January on a sunny side, which coincided with the presence of colder temperatures and probably with the time when induction and floral initiation occurred in mango, as reported in mandarin 'Satsuma' by Nakagawa *et al.* (2007) where the level of the orthologous gene flowering locus T (CiFT) increased with cold temperatures during floral induction time and in sweet orange tree LFY and AP1 increased during and after floral induction (Pillitteri *et al.*, 2004). On the other hand, Nakagawa *et al.* (2012) identified a gene as the flowering locus T (MiFT) on leaves of 'Irwin' mango trees that developed under inductive temperatures at flowering (15 °C).

sombreados (Kittikorn *et al.*, 2011), resultados que no coinciden con nuestro estudio, no obstante los resultados en manzano, se obtuvieron en diferente especie y tejido y el sombreado fue de solo 50%, y en el presente estudio realizado bajo condiciones de campo muy diferentes a las de manzano (21° latitud norte 105° longitud oeste, 150 msnm), al menos de lado norte, el sombreado fue cerca de 90 %.

La mayor expresión se encontró en diciembre y enero en lado soleado, lo que coincidió también con la presencia de temperaturas más frías y probablemente con el momento en que ocurrió la inducción e iniciación floral en mango, como lo reportado en mandarina ‘Satsuma’ por Nishikawa *et al.* (2007) donde el nivel del gen ortólogo flowering locus T (CiFT) incrementó con temperaturas frías durante el tiempo de inducción floral y en naranjo dulce LFY y AP1 incrementaron durante y después de la inducción floral (Pillitteri *et al.*, 2004). Por otro lado, Nakagawa *et al.* (2012) identificaron un gene como el flowering locus T (MiFT) en hojas de árboles de mango ‘Irwin’ que desarrollaban bajo temperaturas inductivas a floración (15 °C). En nuestro estudio se observó una mayor expresión del gen mencionado en hojas de ‘Ataulfo’ en los meses de diciembre y enero, meses en los cuales las temperaturas fueron más bajas que en septiembre, octubre o noviembre (Figura 1).

En hojas soleadas y con aplicación de PBZ, se encontró que MiFT se expresó en la mayoría de los meses evaluados; aunque la expresión fue altamente incrementada en el mes de diciembre, enero y febrero. Lo anterior indica que el regulador favorece la expresión del gen probablemente mediante su efecto en la inhibición de síntesis de giberelinas; aunado a esto, los meses de diciembre a febrero fueron los más frescos comparados con septiembre, octubre y noviembre. Resultados similares se reportan en hojas de naranjo dulce ‘Salustiana’ donde PBZ estimuló la floración de genes homólogos a flowering locus T, CiFT (Muñoz *et al.*, 2012).

Tipo de crecimiento emergido durante la época de floración. Durante la época de floración, del lado oriente (brotes soleados) 66% de brotes presentaron floración, 12% tuvo solo brotes vegetativos y 25% quedaron inactivos. Del lado poniente (sombreado por la mañana y soleado por la tarde), 40% de los brotes tuvieron floración, 50% solo crecimiento vegetativo y 12% quedaron inactivos. Del lado norte (lado sombreado) la mayoría de los brotes quedaron inactivos (76%), aunque 12% presentó floración (Figura 3).

In our study we observed a greater expression of the gene mentioned in leaves of ‘Ataulfo’ in the months of December and January, months in which the temperatures were lower than in September, October or November (Figure 1).

In sunny leaves and with application of PBZ, it was found that MiFT was expressed in the majority of months evaluated; although the expression was highly increased in the month of December, January and February. The above indicates that the regulator favors gene expression probably through its effect on the inhibition of gibberellin synthesis; in addition to this, the months of december to february were the freshest compared to September, October and November. Similar results are reported in fresh orange leaf ‘Salustiana’ where PBZ stimulated the flowering of homologous genes to flowering locus T, CiFT (Muñoz *et al.*, 2012).

Type of growth emerged during the flowering season. During the flowering season, on the east side (sunny shoots), 66% of shoots had flowering, 12% had only vegetative shoots and 25% were inactive. On the west side (shaded in the morning and sunny in the afternoon), 40% of the shoots had flowering, 50% only vegetative growth and 12% were inactive. On the north side (shaded side) most shoots were inactive (76%), although 12% presented flowering (Figure 3).

In the flowering period, the percentage of flower buds was higher on the sunny side when PBZ was applied, which coincides with the greater expression of MiFT. In addition, it is likely that PBZ by inhibiting the synthesis of gibberellins favored the expression of the gene responsible for floral induction as reported by Nakagawa *et al.* (2012). On the west side (sunny in the afternoon) and north (shade of approximately 90%) the percentage of buds with flowers was minimal, but flowers were present on both sides when PBZ was applied. The above indicates that the regulator induced, although in smaller quantity, the expression of the MiFT gene provoking the induction of flowering in this type of shoots and therefore the presence of flowers; however, the light is strongly regulating its expression.

On both sunny and shaded sides a large number of shoots remained inactive, which could be due to the fact that the environmental conditions during November, when induction and floral initiation in mango usually occur (Pérez *et al.*, 2009), were not adequate for flowering since there were temperatures above 20 °C and presence of rain; however, with the application of PBZ, an adequate percentage of floral

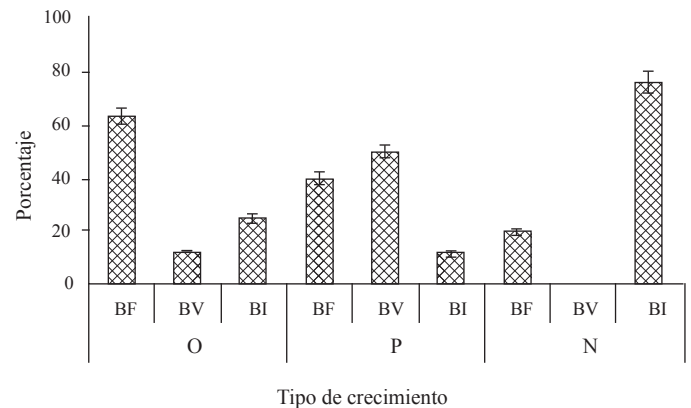
En el periodo de floración, el porcentaje de brotes con flores fue mayor en el lado soleado cuando se aplicó PBZ, lo que coincide con la mayor expresión de MiFT. Además, es probable que PBZ al inhibir la síntesis de giberelinas favorecieron la expresión del gen encargado de la inducción floral como lo reporta Nakagawa *et al.* (2012). En lado poniente (soleado por la tarde) y norte (sombreado de 90% aproximadamente) el porcentaje del brotes con flores fue mínima, pero se tuvieron flores en ambos lados cuando se aplicó PBZ. Lo anterior indica que el regulador indujo, aunque en menor cantidad, la expresión del gen MiFT provocando la inducción de floración en este tipo de brotes y por lo tanto la presencia de flores; no obstante, la luz está regulando fuertemente su expresión.

Tanto en lado soleado como sombreado un gran número de brotes permaneció inactivo, lo cual podría deberse a que las condiciones ambientales durante noviembre, mes en que ocurre normalmente la inducción e iniciación floral en mango (Pérez *et al.*, 2009), no fueron adecuadas para floración pues se registraron temperaturas arriba de 20 °C y presencia de lluvia; no obstante, con la aplicación de PBZ, se obtuvo un porcentaje adecuado de brotes florales en lado soleado, lo que coincidió también con la mayor expresión de MiFT en diciembre, tiempo donde la temperatura fue menor a 20 °C.

Experimento 2. Expresión de MiFT por efecto de reguladores de crecimiento. La expresión relativa en hojas con P-Ca fue de 0.02% en septiembre, de 1.1% en noviembre y se incrementó en diciembre a 4.7% y bajó en enero con 1.1%, en octubre y febrero la expresión fue de 0 (Figura 4). En hojas aplicadas con PBZ la expresión relativa de MiFT con relación a MiEF fue de 0.7% en septiembre, en noviembre la expresión fue de 2.8% aumentando en diciembre hasta 30.3 y 22.2% en enero, en el mes de febrero fue de 6.5%. En hojas testigo (sin regulador) la expresión fue de 0.06% en septiembre, cero en octubre, noviembre y diciembre, 0.87% en enero y cero en febrero; mientras que en hojas con AG<sub>3</sub>, la expresión fue 0 en todos los meses evaluados a excepción de febrero que tuvo 0.02% de expresión.

Resultados similares a los obtenidos en PBZ se presentaron en hojas tratadas con P-Ca, otro inhibidor de la síntesis de giberelinas, aunque la expresión fue menor comparada con PBZ. En hojas aplicadas con AG<sub>3</sub>, la expresión fue prácticamente nula, lo que indica que este regulador inhibió la expresión de MiFT. Los resultados coinciden

shoots were obtained on sunny side, which coincided also with the greater expression of MiFT in December, when the temperature was lower to 20 °C.



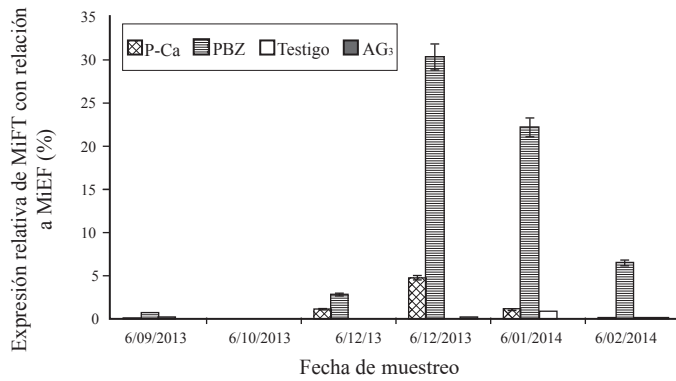
**Figura 3. Porcentaje y tipo de crecimiento emergido durante el periodo de floración en brotes de mango 'Ataulfo' tratados con PBZ y en diferente orientación en el árbol.** BF= brote floral; BV= brote vegetativo; BI= brote inactivo. Lado oriente (O), poniente (P) y norte (N) del árbol, 2014. Las barras en cada punto representan el promedio de 160 brotes por tratamiento  $\pm$  error estándar.

**Figure 3. Percentage and type of growth emerged during the flowering period in 'Ataulfo' mango shoots treated with PBZ and in different orientation in the tree.** BF= floral bud; BV= vegetative shoot; BI= inactive bud. East (O), west (P) and north (N) of the tree, 2014. The bars at each point represent the average of 160 outbreaks per treatment  $\pm$  standard error.

Experiment 2. Expression of MiFT by effect of growth regulators. The relative expression in leaves with P-Ca was 0.02% in September, 1.1% in November and increased in December to 4.7% and decreased in January with 1.1%, in October and February the expression was 0 (Figure 4). In leaves applied with PBZ the relative expression of MiFT in relation to MiEF was 0.7% in September, in November the expression was 2.8% increasing in december to 30.3 and 22.2% in January, in February it was 6.5%. In control leaves (without regulator) the expression was 0.06% in September, zero in October, November and December, 0.87% in January and zero in February; while in leaves with AG<sub>3</sub>, the expression was 0 in all months evaluated except for february which had 0.02% expression.

Results similar to those obtained in PBZ were presented in leaves treated with P-Ca, another inhibitor of gibberellin synthesis, although the expression was lower compared to

con los obtenidos en naranjo dulce ‘Salustiana’ (Muñoz *et al.*, 2012) y mango ‘Irwin’ (Nakagawa *et al.*, 2012), donde se reporta que las giberelinas reprimen la expresión de genes relacionados con floración como CiFT y MiFT, respectivamente.



**Figura 4. Expresión relativa de MiFT respecto a MiEF en hojas de mango ‘Ataulfo’ con y sin regulador de crecimiento. Las barras en cada punto representan el promedio de tres repeticiones por tratamiento  $\pm$  error estándar.**

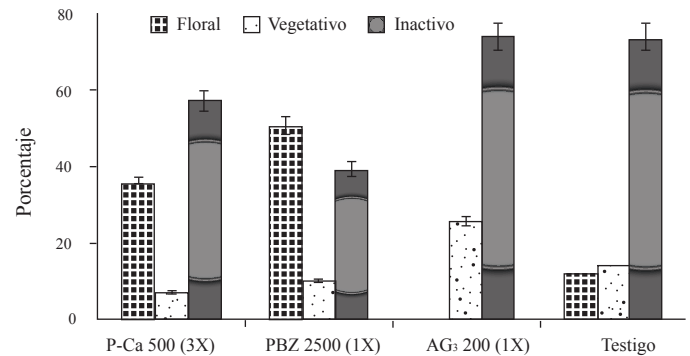
**Figure 4. Relative expression of MiFT over MiEF in ‘Ataulfo’ mango leaves with and without growth regulator. The bars at each point represent the average of three replicates per treatment  $\pm$  standard error.**

Tipo de crecimiento emergido. Respecto al tipo de crecimiento emergido en el periodo de floración, se encontró un porcentaje de brotes florales de 36, 51, 0 y 12% por efecto de P-Ca, PBZ, AG<sub>3</sub> y sin regulador (testigo), respectivamente. Los árboles tratados con AG<sub>3</sub> presentaron el mayor porcentaje de brotes vegetativos. El resto de los brotes de cada tratamiento permanecieron inactivos con 57, 39, 74 y 73% en P-Ca, PBA, AG<sub>3</sub> y testigo, respectivamente (Figura 5).

Durante el periodo de floración, el porcentaje de brotes con flores fue mayor cuando se aplicó PBZ, seguido de aquellos tratados con P-Ca, aunque el porcentaje fue menor comparado con PBZ. Lo que coincide con la expresión de MiFT en los dos reguladores. Probablemente al inhibir la síntesis de giberelinas, PBZ y P-Ca favorecieron la expresión del gen encargado de la inducción floral como lo reporta Nakagawa *et al.* (2012), estos autores demostraron también que MiFT está regulado por giberelinas al encontrar que el contenido de giberelinas activas como AG<sub>1</sub> y AG<sub>4</sub> se incrementó por la regulación corriente arriba de los genes MiGA<sub>3-ox</sub> y MiGA<sub>20-ox</sub>,

PBZ. In leaves applied with AG<sub>3</sub>, the expression was practically null, indicating that this regulator inhibited the expression of MiFT. The results agree with those obtained in sweet orange ‘Salustiana’ (Muñoz *et al.*, 2012) and ‘Irwin’ mango (Nakagawa *et al.*, 2012), where it is reported that gibberellins repress the expression of genes related to flowering as CiFT and MiFT, respectively.

Type of emerged growth. Regarding the type of growth emerged during the flowering period, a percentage of flower buds of 36, 51, 0 and 12% were found as a result of P-Ca, PBZ, AG<sub>3</sub> and without control (control), respectively. Trees treated with AG<sub>3</sub> had the highest percentage of vegetative shoots. The remainder of the outbreaks of each treatment remained inactive with 57, 39, 74 and 73% in P-Ca, PBA, AG<sub>3</sub> and control, respectively (Figure 5).



**Figura 5. Porcentaje y tipo de crecimiento emergido durante el periodo de floración en brotes de mango ‘Ataulfo’ por efecto de reguladores. 2014. Las barras en cada punto representan el promedio de 160 brotes por tratamiento  $\pm$  error estándar.**

**Figure 5. Percentage and type of growth emerged during the flowering period in bud of ‘Ataulfo’ mango by regulators effect. 2014. The bars at each point represent the average of 160 outbreaks per treatment  $\pm$  standard error.**

During the flowering period, the percentage of flower buds was higher when PBZ was applied, followed by those treated with P-Ca, although the percentage was lower compared to PBZ. Which coincides with the expression of MiFT in the two regulators. Probably by inhibiting the synthesis of gibberellins, PBZ and P-Ca favored the expression of the gene responsible for floral induction as reported by Nakagawa *et al.* (2012), these authors also demonstrated that MiFT is regulated by gibberellins by finding that the content of active gibberellins such as AG<sub>1</sub> and AG<sub>4</sub> was increased by downstream regulation of the MiGA<sub>3-ox</sub> and



inhibiendo la expresión del MiFT en las hojas y por lo tanto la floración en árboles frutales de mango 'Irwin' con alta producción.

Por otro lado, en todos los tratamientos un gran número de brotes permaneció inactivo, aunque el porcentaje fue 23 y 47% más en brotes tratados con AG<sub>3</sub> y testigo respecto a P-Ca y PBZ. Bangerth (2009) menciona que en frutales la perennidad está dada por los meristemas que permanecen vegetativos, contrario a las plantas anuales donde todos los meristemas florecen al mismo tiempo con la inevitable muerte de las plantas; no obstante, en este estudio la mayoría permanecieron inactivos, lo cual podría deberse a que las condiciones ambientales durante noviembre, mes en que ocurre normalmente la inducción e iniciación floral en mango (Pérez *et al.*, 2009), no fueron adecuadas para floración (temperaturas arriba de 20 °C y presencia de lluvia).

Sin embargo, a pesar de estas condiciones ambientales, con la aplicación de los reguladores inhibidores de giberelinas, pero sobre todo con PBZ, se logró un porcentaje adecuado de brotes florales. En brotes con AG<sub>3</sub>, no hubo floración, lo que coincidió con la falta de expresión de MiFT, lo que corrobora el efecto antagónico de este regulador en la floración de mango y otros frutales como lo menciona Nakagawa *et al.* (2012) en mango 'Irwin' y Muñoz *et al.* (2012) en naranjo dulce 'Salustiana'.

## Conclusiones

En hojas maduras de mango 'Ataulfo', el gen MiFT se expresa en mayor cantidad del lado soleado, mientras que en el lado sombreado se expresa en menor cantidad por lo que podríamos decir que este gen está regulado por luz y que el sombreado inhibe su expresión.

La mayor expresión de MiFT se logró en los meses con presencia de temperaturas frías ( $\leq 20$  °C). PBZ y P-Ca favorecieron la expresión del gen, probablemente mediante su efecto en la inhibición de síntesis de giberelinas, propiciando además una mayor floración

Un mayor porcentaje de floración se logró de lado soleado, coincidiendo con la mayor expresión del gen MiFT.

Se demostró, que la aplicación de giberelinas inhibió la expresión de MiFT y por ende la brotación floral.

MiGA<sub>20-ox</sub>, genes, inhibiting the expression of MiFT in leaves and therefore flowering on 'Irwin' mango trees with high yield.

On the other hand, in all treatments a large number of outbreaks remained inactive, although the percentage was 23 and 47% higher in outbreaks treated with AG<sub>3</sub> and control with regard to P-Ca and PBZ. Bangerth (2009) mentions that in fruit trees the perennality is given by the meristems that remain vegetative, contrary to the annual plants where all meristems flourish at the same time with the inevitable death of the plants; however, in this study the majority remained inactive, which could be due to the fact that the environmental conditions during November, when induction and floral initiation in mango (Pérez *et al.*, 2009), were normally not adequate for flowering (temperatures above 20 °C and presence of rain).

However, despite these environmental conditions, with the application of inhibitors of gibberellins, but especially with PBZ, an adequate percentage of floral shoots was achieved. In outbreaks with AG<sub>3</sub>, there was no flowering, which coincided with the lack of expression of MiFT, which corroborates the antagonistic effect of this regulator on the flowering of mango and other fruit trees as mentioned by Nakagawa *et al.* (2012) in mango 'Irwin' and Muñoz *et al.* (2012) in sweet orange 'Salustiana'.

## Conclusions

In mature leaves of 'Ataulfo' mango, the MiFT gene is expressed in greater quantity on the sunny side, whereas on the shaded side it is expressed in lesser quantity so we could say that this gene is regulated by light and that the shading inhibits its expression.

The highest expression of MiFT was achieved in the months with cold temperatures ( $\leq 20$  °C). PBZ and P-Ca favored the expression of the gene, probably through its effect on the inhibition of gibberellin synthesis, favoring a greater flowering

A higher percentage of flowering was achieved on the sunny side, coinciding with the greater expression of the MiFT gene.

## Literatura citada

- Anónimo 2007. 260/280 and 260/230 Ratios NanoDrop® ND-1000 and ND-8000 8-Sample. Spectrophotometers. NanoDrop and design are registered trademarks of NanoDrop Technical Support Bulletin T009. Technologies Wilmington, Delaware USA ©2007 NanoDrop Technologies, Inc. www.nanodrop.com.
- Bangerth, K. F. 2009. Floral induction in mature, perennial angiosperm fruit trees: Similarities and discrepancies with annual/biennial plants and the involvement of plant hormones. *Scientia Hort.* 122:153-163.
- Brunner, A. M. and Nilsson, O. 2004. Revisiting tree maturation and floral initiation in the poplar functional genomics era. *New Phytol.* 164(1):43-51.
- Corbesier, L.; Vincent, C.; Jang, S.; Fornara, F.; Fan, Q.; Searle, I.; Giakountis, A.; Farrona, S.; Gissot, L.; Turnbull, C. G. N. and Coupland, G. 2007. FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science.* 316(8):1030-1033.
- Davenport, T. L. and Ying, Z. 2004. Translocation of the mango florigenic promoter. *HortScience.* 39(4):887-898.
- Davenport, T. L.; Ying, Z. and Kulkarni, V. 2006. Evidence for a translocatable florigenic promoter in mango. *Scientia Hort.* 110(2):150-159.
- Davenport, T. L. 2007. Reproductive physiology of mango. *Braz. J. Plant Physiol.* 19(4):363-376.
- Endo, T.; Shimada, T.; Fujii, H.; Kobayashi, Y.; Araki, T. and Omura, M. 2005. Ectopic expression of an FT homolog from citrus confers an early flowering phenotype on trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.). *Transgenic Research.* 14(5): 703-712.
- Falcon, L. I. y Valera, A. 2007. Extracción de ácidos nucleicos. In: *ecología molecular*. Eguiarte, L. E.; Souza, V. y Aguirre, X. (Comp.). (SEMARNAT- INECOL-UNAM-CONABIO). 1ra, Edición, México, D. F. 499-516 pp.
- Kittikorn, M.; Okawa, K.; Ohara, H.; Kotoda, N.; Wada, M.; Yokoyama, M.; Ifuku, O.; Yoshida, S. and Kondo, S. 2011. Effects of fruit load, shading, and 9,10-ketol-octadecadienoic acid (KODA) application on MdTFL1 and MdFT1 genes in apple buds. *Plant Growth Regul.* 64(1):75-81.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCT</sup> Method. *Methods* 25(4):402-408.
- Muñoz, F. N.; Mesejo, C.; González-Mas, M. C.; Primo-Millo, E.; Agustí, M. and Iglesias, D. J. 2011. Fruit regulates seasonal expression of flowering genes in alternate-bearing Moncada' mandarin. *Ann. Bot.* 108(3):511-519.
- Muñoz, F. N.; Mesejo, C.; González-Mas, M. C.; Iglesias, D. J.; Primo-Millo, E. and Agustí, M. 2012. Gibberellic acid reduces flowering intensity in sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] by repressing CiFT Gene Expression. *J. Plant Growth Reg.* 31(4):529-536.
- Nakagawa, M.; Honsho, C.; Kanzaki, S.; Shimizu, K. and Utsunomiya, N. 2012. Isolation and expression analysis of FLOWERING LOCUS T-like and gibberellin metabolism genes in biennial-bearing mango trees. *Sci. Hort.* 139:108-117.
- Nishikawa, F.; Endo, T.; Shimada, T.; Fuji, H.; Shimizu, T.; Omura, M. and Ikoma, Y. 2007. Increased CiFT abundance in the stem correlates with floral induction by low temperature in Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). *J. Exp. Bot.* 58(14):3915-3927.
- Peña, L. L.; Martín-Trillo, M.; Juárez, J.; Pina, J. A.; Navarro, L. and Martínez-Zapater, J. M. 2001. Constitutive expression of *Arabidopsis* LEAFY or APETALA1 genes in citrus reduces their generation time. *Nature Biotechnol.* 19:263-267.
- Pérez, B. M. H.; Vázquez, V. V. and Osuna, G. J. A. 2009. Floral bud development of 'Tommy Atkis' mango under tropical condition in Nayarit, Mexico. *Acta Hort.* 820:197-204.
- Pillitteri, L. J.; Lovatt, C. J. and Walling, L. L. 2004. Isolation and characterization of a terminal flower homolog and its correlation with juvenility in citrus. *Plant Physiol.* 135(3): 1540-1551.
- Ramirez, F. and Davenport, T. L. 2010. Mango (*Mangifera indica* L.) flowering physiology. *Sci. Hort.* 126(2): 65-72.
- Wilfinger, W. W.; Mackey, K. and Chomczynski, P. 1997. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques.* 22(3):474-481.
- Wilkie, J. D.; Sedgley, M. and Olesen, T. 2008. Regulation of initiation in horticultural trees. *J. Exp. Bot.* 59(12): 3215-3228.
- Zeevaart, J. A. 2008. Leaf-produced floral signals. *Current Opinion in Plant Biology.* 11(5):541-547.

It was demonstrated that the application of gibberellins inhibited the expression of MiFT and therefore floral bud.

*End of the English version*

