

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**



**Fisiología de plántulas procedentes de embriones cigóticos y  
nucleares de *Mangifera indica* L., identificados con marcadores  
moleculares**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de  
Doctor en Ciencias Biológicas y de la Salud

**P R E S E N T A**  
Claudia Barbosa Martínez

Comité tutorial:

Dra. Leticia Ponce de León García

Dr. Francisco José Fernández Perrino

Dra. Laura Josefina Pérez Flores

México, D. F., diciembre de 2012.

El Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93.

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Iztapalapa, Xochimilco y Cuajimalpa aprobó la tesis que presentó

Claudia Barbosa Martínez

El día 10 de diciembre del año de 2012

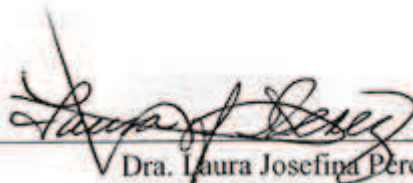
**Jurado:**

Presidenta



Dra. Leticia Ponce de León García

Secretaria



Dra. Laura Josefina Pérez Flores

Vocal



Dr. Manuel Arnoldo Castillo Rivera

Vocal



Dra. Alma Delina Lucía Orozco Segovia

Vocal



Dr. Ángel Villegas Monter

"Tu espíritu es el plumero de cualquier tela de araña. Detrás de cada línea de llegada, hay una de partida. Detrás de cada logro, hay otro desafío. Mientras estés vivo, siéntete vivo... Sigue aunque todos esperen que abandones. No dejes que se oxide el hierro que hay en ti. Cuando por los años no puedas correr, trota. Cuando no puedas trotar, camina. Cuando no puedas caminar, usa el bastón. ¡Pero nunca te detengas!"  
MADRE TERESA DE CALCUTA

Dedico esta Tesis a todas las personas que me han enseñado e impulsado a luchar arduamente por hacer realidad mis sueños.  
A aquellos que me han brindado su amor, comprensión, confianza y su apoyo incondicional sin escatimar tiempo y esfuerzo.

**A mis amados hijos, Carlos y Abril, por ser el timón que mueve mi vida.**

**A mi compañero incondicional, mi querido esposo, Octavio Toriz Pérez, por todo su amor, apoyo y confianza.**

**A mi madre adorada, hermanos y amigos, por guiarme y apoyarme constantemente.**

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado durante el desarrollo del trabajo de investigación.

A la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa por abrirme sus puertas y proporcionarme todo lo necesario para mi buen desempeño en el desarrollo de la presente tesis.

A la Empresa Frutas y Legumbres El Rodeo, S. P.R. de R.I., en especial al Lic. Juan Manuel Wong, a Marco Antonio Wong y al Ing. Miguel Ángel Wong por proporcionar el material de estudio y por su disposición y apoyo en el campo.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) por ofrecerme sus instalaciones para lograr la realización de una parte de esta investigación.

A mi directora de tesis, Dra. Leticia Ponce de León García por ser mi compañera y amiga en esta travesía, por sus enseñanzas y por brindarme todo su apoyo y confianza.

A mi comité tutorial, Dra. Laura Pérez Flores y Dr. Francisco Fernández Perrino por su gran disposición en la revisión de este trabajo, que es parte de mi formación académica y por la confianza que depositaron en mí.

A la Dra. Alma Orozco Segovia y al Dr. Ángel Villegas Monter, por formar parte del jurado, por sus valiosos comentarios y su contribución en la terminación de la tesis.

Al Dr. Manuel Robert por abrir las puertas de los laboratorios de investigación del CICY y por su invaluable apoyo en el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Felipe Sánchez Teyer por contagiarme un poco de su pasión por la investigación, por todo su apoyo durante mis estancias en el CICY.

A mis maestros de vida, Dr. José Sepúlveda Sánchez e Ing. Patricia Castillo Ocampo por su amistad eterna y por todas las enseñanzas y apoyo que he recibido de ellos.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Ecofisiología, Denisse A. Flores Esquivel, Claudia C. Ríos Pacheco, Guadalupe Carrillo Galván, Antonio Morales Rescalvo, Jesús Ramírez Galindo, M. Lorena Chávez Rivera, Andrea Z. Ortiz Arcos, Omar López, Omar Durán Guerra, Erick Vives, Carlos Sandoval Antúnez, por cada granito de arena que aportaron durante el desarrollo del trabajo de laboratorio y por su amistad.

A las personas con las que coincidí durante mis estancias en el CICY, Adriana, Matilde, Martín, Javier y Lupita, por su apoyo incondicional en la adquisición de conocimientos y capacitación.

A todas aquellas personas, que de alguna u otra forma han contribuido al buen desarrollo de este trabajo de tesis.

## RESUMEN

Las semillas de las variedades poliembriónicas de mango (*Mangifera indica* L.) pueden contener o no un embrión cigótico y el resto son derivados de la nucela. Teóricamente, los embriones nucelares son más vigorosos y genéticamente idénticos a la planta madre, lo que permite la propagación de clones que se usan como portainjertos en las plantaciones comerciales para garantizar la uniformidad en cuanto a producción y calidad de frutos y a la resistencia a enfermedades y factores ambientales como la salinidad, por ejemplo. La identificación del origen cigótico o nucelar puede facilitar la selección de portainjertos. Morfológicamente no es fácil identificar el origen de las plántulas, pero mediante análisis de isoenzimas y marcadores moleculares de ADN algunos investigadores han logrado la identificación. En este trabajo se compararon parámetros físico-químicos y morfológicos de frutos y semillas, así como de germinación de semillas, crecimiento y sobrevivencia de plántulas de variedades de mango monoembriónicas: ‘Haden’ y poliembriónicas ‘Manila’ y ‘Ataulfo’, con la finalidad de determinar si la asignación de recursos que la planta madre le proporciona a cada embrión influye en el vigor de las plántulas, o si las plántulas más vigorosas provienen de embriones nucelares o cigóticos, para lo cual se utilizaron marcadores moleculares AFLP. Las plántulas de la variedad monoembriónica resultaron más vigorosas que las poliembriónicas, el peso de las semillas fue importante en la germinación, crecimiento y sobrevivencia. Los análisis moleculares mediante AFLP no fueron claros para averiguar si sobrevive o no la plántula originada por el embrión cigótico, debido a que se evidenció amplia variabilidad genética en las dos variedades poliembriónicas con un índice de similitud de 0.50 a 0.96. La variabilidad genética encontrada en las plántulas de la misma semilla y con respecto a la planta madre puede representar ventajas adaptativas para responder a distintos factores ambientales de estrés de distintas maneras.

## ABSTRACT

Polyembryonic seeds of mango (*Mangifera indica* L.) may contain or not one zygotic embryo and the remaining embryos are derived from the nucellus. Theoretically, nucellar embryos are more vigorous and are identical genetically to the mother plant, its allowing the propagation of clones that are used as rootstocks in commercial plantations to ensure uniformity in production and fruit quality and disease resistance and environmental factors such as salinity, for example. Identification of zygotic or nucellar origin can facilitate the rootstocks selection. Morphologically, the identify the seedling origin is not easy, but by means of isoenzyme analysis and DNA molecular markers some researchers have demonstrated that nucellar seedlings can be distinguished from the zygotic seedling. This study compare physical, chemical and morphological parameters of fruit and seed, and seed germination, seedling growth and survival of mango seedlings of varieties monoembryonics ‘Haden’ and polyembryonics ‘Manila’ and ‘Ataulfo’ in order to determine whether the allocation of resources that the mother plant provides to each embryo influences in the seedling vigor, or if vigorous seedlings come from nucellar or zygotic embryos, by means AFLP analysis. Seedlings of the variety monoembryonic were more vigorous than polyembryonics ones, the seed weight was significant on germination, growth and survival. Molecular AFLP analyzes were unclear to distinguished the zygotic seedling, due to high genetic variability in both polyembryonic varieties with a similarity index of 0.50 to 0.96. The genetic variability found in seedlings of the same seed and with respect to the mother plant, can represent advantages adaptive by response to different environmental stress factors in different ways.

## ÍNDICE GENERAL

	<b>Pág.</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b> .....	<b>ix</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>xii</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>4</b>
2.1. General.....	<b>4</b>
2.2. Específicos.....	<b>4</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	<b>5</b>
<b>4. ANTECEDENTES</b> .....	<b>6</b>
4.1. Descripción del mango.....	<b>6</b>
4.2. Descripción de las variedades de estudio y portainjertos.....	<b>9</b>
4.3. Taxonomía y sistemática.....	<b>13</b>
4.4. Origen y difusión del mango.....	<b>18</b>
4.5. Producción del cultivo de mango.....	<b>21</b>
4.6. Citología del mango.....	<b>23</b>
4.7. Poliembrionía en mango.....	<b>25</b>
4.8. Programas de mejora en mango.....	<b>35</b>
4.9. Marcadores genéticos en mango.....	<b>40</b>
4.9.1. Isoenzimas.....	<b>43</b>
4.9.2. Marcadores de ADN.....	<b>45</b>



4.9.3. Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP).....	45
4.9.4. Amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD).....	47
4.9.5. Secuencia simples repetidas o Microsatélites (SSR).....	49
4.9.6. Inter secuencias simples repetidas (ISSR).....	49
4.9.7. Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP).....	50
4.9.8. Espaciadores internos transcritos (ITS).....	52
4.9.9. QTL, Mapeo de linajes.....	54
<b>5. DESCRIPCIÓN DEL SITIO DE COLECTA.....</b>	<b>56</b>
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>62</b>
6.1. Recopilación bibliográfica.....	62
6.2. Colecta de muestras.....	62
6.3. Caracterización físico-química de frutos y semillas.....	62
6.4. Fisiología de la germinación y crecimiento de plántulas de mango.....	63
6.5. Análisis y diseño estadístico.....	67
6.6. Caracterización morfo-histológica de semillas poliembriónicas y monoembriónicas	67
6.7. Extracción y cuantificación de ADN.....	68
6.7.1. Protocolo de extracción de ADN con la técnica de sílica.....	71
6.8. Concentración, pureza e integridad del ADN.....	72
6.9. Amplificación de ADN mediante marcadores moleculares AFLPs.....	73
6.9.1. Optimización de la reacción de amplificación.....	75
6.9.2. Procedimiento para la amplificación de ADN de mango mediante AFLPs.....	77
6.9.2.1. Restricción.....	78

6.9.2.2. Ligación de adaptadores.....	79
6.9.2.3. Reacción de preamplificación.....	79
6.9.2.4. Amplificación selectiva.....	81
6.10. Análisis de datos moleculares.....	85
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>87</b>
7.1. Características morfo-histológicas de frutos, semillas y embriones.....	87
7.1.1. Relación entre el PBF del fruto y el PBF de la semilla.....	100
7.2. Capacidad y Tiempo Medio de Germinación de semillas de mango.....	101
7.2.1. Distribución de PBF de semillas de las variedades ‘Haden’, ‘Manila’ y ‘Ataulfo’.	105
7.2.2. Germinación por grupos de semillas categorizadas por PBF.....	108
7.2.3. Relación entre el PBF de la semilla y el porcentaje de germinación.....	111
7.2.4. Germinación de semillas poliembriónicas.....	113
7.3. Transplante, establecimiento en maceta y sobrevivencia.....	118
7.4. Sobrevivencia y crecimiento de plántulas.....	122
7.4.1. Sobrevivencia de variedades.....	122
7.4.2. Sobrevivencia de grupos dentro de las variedades.....	123
7.4.3. Sobrevivencia de plántulas poliembriónicas de la variedad ‘Manila’.....	124
7.4.4. Características morfológicas de la raíz y el tallo de las plántulas de mango.....	127
7.4.5. Evaluación del crecimiento de plántulas.....	135
7.4.6. Tasa de crecimiento relativo (RGR).....	141
7.5. Análisis molecular de plántulas de mango mediante AFLPs.....	145
7.5.1. Extracción de ADN de hojas de mango.....	146

7.5.2. Análisis AFLPs.....	148
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>167</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>171</b>
<b>10. A N E X O S.....</b>	<b>210</b>
10.1 ANEXO A. Técnica histológica.....	211
10.2. ANEXO B. Marcadores moleculares en el estudio de mango.....	214
10.3 ANEXO C. Artículo de investigación generado del trabajo de tesis .....	228

## ÍNDICE DE CUADROS

	<b>Pág.</b>
Cuadro 1. Composición de la porción comestible (pulpa) de frutos de mango	<b>8</b>
Cuadro 2. Composición físico-química de los cotiledones de mango	<b>9</b>
Cuadro 3. Posición taxonómica del mango	<b>16</b>
Cuadro 4. Clasificación de especies de <i>Mangifera</i>	<b>17</b>
Cuadro 5. Resumen de estudios publicados con marcadores genéticos en mango	<b>43</b>
Cuadro 6. Condiciones edáficas y climáticas del sitio de colecta	<b>61</b>
Cuadro 7. Parámetros de la Tasa de Crecimiento Relativo (RGR)	<b>66</b>
Cuadro 8. Técnica histológica para la obtención de preparaciones de semillas	<b>67</b>
Cuadro 9. Extracción de ADN total en mango	<b>71</b>
Cuadro 10. Análisis de la calidad y cantidad de ADN de mango	<b>73</b>
Cuadro 11. Reacción de digestión de ADN con enzimas de restricción	<b>78</b>
Cuadro 12. Reacción de ligación de adaptadores al ADN digerido	<b>79</b>
Cuadro 13. Reacción de preamplificación del ADN por PCR	<b>80</b>
Cuadro 14. Reacción de amplificación selectiva de ADN	<b>82</b>
Cuadro 15. Intensidad relativa de los fluorocromos	<b>82</b>
Cuadro 16. Combinaciones de primers utilizados	<b>83</b>
Cuadro 17. Reacción de desnaturalización de ADN	<b>84</b>

Cuadro 18. Caracterización físico-química de frutos de mango	<b>96</b>
Cuadro 19. Caracterización morfológica de semillas de mango	<b>98</b>
Cuadro 20. Coeficiente de determinación ( $r^2$ ) entre el PBF del fruto y de la semilla	<b>101</b>
Cuadro 21. Parámetros de germinación de mango	<b>104</b>
Cuadro 22. Categorización de grupos de acuerdo al PBF de semillas	<b>106</b>
Cuadro 23. Parámetros de germinación por grupos categorizados por PBF de semillas	<b>110</b>
Cuadro 24. Coeficiente de determinación ( $r^2$ ) entre el PBF de la semilla y la capacidad de germinación	<b>112</b>
Cuadro 25. Coeficiente de determinación ( $r^2$ ) entre el PBF de semillas y la capacidad de germinación entre grupos categorizados por PBF de semillas	<b>112</b>
Cuadro 26. Aparición de plántulas múltiples en las variedades poliembriónicas	<b>116</b>
Cuadro 27. Supervivencia de plántulas de las variedades categorizadas por PBF de semilla, durante cuatro etapas de evaluación	<b>122</b>
Cuadro 28. Supervivencia de plántulas durante 98 días después del establecimiento	<b>123</b>
Cuadro 29. Supervivencia de plántulas categorizadas por grupo de acuerdo al PBF de semillas durante 98 días después del establecimiento	<b>124</b>
Cuadro 30. Plántulas establecidas por grupos de PBF de semillas poliembriónicas de la variedad ‘Manila’	<b>126</b>
Cuadro 31. Supervivencia de plántulas de la variedad ‘Manila’ provenientes de semillas con uno a cinco embriones funcionales	<b>126</b>
Cuadro 32. Tasa de Crecimiento Relativo de plántulas de la colecta del año 2004	<b>144</b>

Cuadro 33. Tasa de Crecimiento Relativo de plántulas de la colecta del año 2005	144
Cuadro 34. Preparación de 100 mL de FAA	211
Cuadro 35. Tren de deshidratación de tejidos	212
Cuadro 36. Tren de desparafinación de tejidos vegetales	212
Cuadro 37. Tinción de cortes finos de tejidos vegetales	213
Cuadro 38. Preparación de safranina “O”	213
Cuadro 39. Solución de aceite de clavo	213
Cuadro 40. Trabajos de investigación con marcadores genéticos en mango	214

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Distribución natural aproximada del mango	<b>18</b>
Figura 2. Distribución del mango en el mundo	<b>21</b>
Figura 3. Principales países productores y exportadores de mango a nivel mundial	<b>23</b>
Figura 4. Principales variedades producidas y exportadas por México	<b>23</b>
Fig. 5. Posibles vías de formación de varios embriones en una misma semilla	<b>31</b>
Figura 6. A) Localización del estado de Sinaloa, México	<b>57</b>
Figura 7. Mapas de temperatura y precipitación media anual Sinaloa	<b>58</b>
Figura 8. Temperatura y precipitación media mensual; B) media mensual en Culiacán, Sinaloa	<b>59</b>
Figura 9. Localización de la huerta La Pedregosa en El Rosario, Sinaloa	<b>60</b>
Figura 10. Esquema de los principales pasos de la técnica AFLP	<b>77</b>
Figura 11. Programa del termociclador para la reacción de preamplificación de ADN	<b>80</b>
Figura 12. Mezcla de reacción para la amplificación selectiva	<b>81</b>
Figura 13. Programa del termociclador para la amplificación selectiva de ADN	<b>84</b>
Figura 14. Mezcla de reacción para la desnaturalización y marcaje del ADN	<b>85</b>
Figura 15. Color de la cáscara de frutos de las variedades de estudio	<b>87</b>
Figura 16. Forma de los frutos de mango	<b>88</b>

Figura 17. Descripción de las semillas de mango	<b>89</b>
Figura 18. Micrografías de cortes histológicos de semillas de mango mono y poliembriónicas	<b>91</b>
Figura 19. Promedios de PBF de frutos de mango de las variedades de ‘Haden’ y ‘Manila’ en los 10 árboles	<b>96</b>
Figura 20. Promedios de PBF de semillas de las variedades de ‘Haden’ y ‘Manila’ en los 10 árboles	<b>98</b>
Figura 21. Categorización por grupos por PBF de semillas de mango de la cosecha del año 2004	<b>106</b>
Figura 22. Categorización por grupos de PBF de semillas de mango de la cosecha del año 2005	<b>107</b>
Figura 23. Histograma de frecuencias del PBF de semillas de mango	<b>108</b>
Figura 24. Semillas poliembriónicas con emergencia múltiple de plántulas	<b>116</b>
Figura 25. PBF de semillas de mango de la variedad ‘Manila’ con diferente número de plántulas originadas por semilla	<b>118</b>
Figura 26. Porcentaje de sobrevivencia de semillas de mango desde la siembra hasta el establecimiento durante el año de colecta 2004	<b>120</b>
Figura 27. Porcentaje de sobrevivencia de semillas de mango desde la siembra hasta el establecimiento durante el año de colecta 2005	<b>121</b>
Figura 28. Emergencia de radícula y epicótilo en mango	<b>127</b>
Figura 29. Desarrollo de raíz y emergencia de epicótilo en la variedades mono y	<b>130</b>



poliembriónicas

Figura 30. Emergencia y crecimiento del epicótilo de mango	<b>131</b>
Figura 31. Forma de las hojas maduras de plántulas de mango	<b>132</b>
Figura 32. Desarrollo de hojas de mango	<b>132</b>
Figura 33. Desarrollo de raíces y de la parte aérea de las plántulas de mango después de 14 semanas de crecimiento	<b>134</b>
Figura 34. Longitud total de plántulas de mango durante el año de colecta 2004	<b>138</b>
Figura 35. Número total de entrenudos en plántulas de mango durante el año de colecta 2004	<b>138</b>
Figura 36. Área foliar de plántulas de mango durante el año de colecta 2004	<b>139</b>
Figura 37. Longitud total de plántulas de mango durante el año de colecta 2005	<b>139</b>
Figura 38. Número total de entrenudos en plántulas de mango durante el año de colecta 2005	<b>140</b>
Figura 39. Área foliar de plántulas de mango durante el año de colecta 2005	<b>140</b>
Figura 40. Geles de extracción obtenidos mediante el Método de Sílica y CTAB	<b>147</b>
Figura 41. Geles de dilución del ADN genómico de mango	<b>148</b>
Figura 42. Dendrograma generado por el programa Free Tree de 23 individuos de la colecta 2007 analizados con AFLPs con seis combinaciones de primers	<b>151</b>
Figura 43. Número y porcentaje de bandas compartidas o comunes entre las variedades de mango del año 2007	<b>152</b>

Figura 44. Límites de similitud para las variedades de mango de la colecta 2007	<b>153</b>
Figura 45. Dendrograma generado por el programa Free Tree de 43 individuos de la colecta 2007 analizados con AFLPs con seis combinaciones de primers	<b>154</b>
Figura 46. Número y porcentaje de bandas compartidas o comunes entre las variedades de mango del año 2009	<b>155</b>
Figura 47. Límites de similitud genética para las variedades de la colecta 2009	<b>156</b>
Figura 48. Dendrograma generado por el programa Free Tree de 63 individuos de la colecta 2009 analizados con AFLPs. misma semilla	<b>159</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

El mango (*Mangifera indica* L) es popularmente conocido como “el rey de los frutos” (Knight, 1980). *M. indica* es una especie que se originó probablemente en la región Indo-Malaya y se cultiva desde hace más de 4000 años (Popenoe, 1920; Mata y Mosqueda, 1995).

*M. indica* es la especie cultivada de la familia de las Anacardiáceas de mayor distribución mundial (entre 33° de latitud Sur y 36° de latitud Norte) (Galán, 1999). Es el quinto frutal con mayor producción a nivel mundial, antecedido por los cultivos de manzana, banano y naranja, y es el segundo cultivo tropical de importancia económica a nivel mundial, superado sólo por el banano (Bally *et al.*, 2009).

Existen más de mil variedades de mango cultivadas, pero solo algunas se producen a escala comercial. Actualmente se producen más de 34 millones de toneladas métricas de mango al año, en más de 103 países de los trópicos y subtropicos (Vasanthaiah *et al.*, 2007; FAO, 2008). El mango es grandemente apreciado en la India y cultivado también extensamente en China, Tailandia, Indonesia, Pakistán, Bangladesh, Burma, Sri Lanka, Vietnam, Malaysia, Filipinas, las Islas Fiji, Australia Tropical, Egipto, Israel, Sudan, Somalia, Kenia, Uganda, Tanzania, Sudáfrica, Nigeria, Madagascar, Estados Unidos (Florida, Hawaii), Puerto Rico, Venezuela, México y Brasil (Vasanthaiah *et al.*, 2007; Evans, 2008; FAO, 2010).

Se reconocen dos centros de domesticación para *M. indica*, uno en la India para las variedades monoembriónicas y otro en Myanmar, Tailandia, Filipinas e Indonesia para las poliembriónicas (Bompard y Schnell, 1997).

Las semillas de las variedades poliembriónicas presentan un embrión cigótico o sexual y varios embriones no sexuales que se originan a partir del tejido de la nucela (embriones adventicios o nucelares) (Mukherjee, 1997; Espinosa-Osornio y Engleman, 1998). En algunos mangos poliembriónicos todos los embriones que sobreviven en la semilla son de origen nucelar y reproducen exactamente las características de la planta madre (Juliano, 1934; Maheshwari *et al.*, 1955; Mukherjee, 1997), pero en otros casos uno de los embriones es cigótico y los restantes nucelares (Galán, 1999).

Los embriones nucelares son genéticamente idénticos a la planta madre, lo que permite la propagación de clones, los cuales son usados en casi la totalidad de las plantaciones comerciales como patrones o portainjertos para garantizar la uniformidad de la población y por lo tanto la uniformidad en las huertas. Los patrones influyen notablemente sobre la productividad y el rendimiento, así como en el aspecto del fruto y la época de madurez. En los programas de mejora vegetal de mango y cítricos, el desarrollo de embriones nucelares produce, con una alta probabilidad, plantas exentas de virus, viroides, fitoplasmas y bacterias (Bicknell y Koltunow, 2004; Villegas y Andrade, 2008; citados por Martínez-Ochoa, 2010), pero con caracteres juveniles que retardan varios años la floración y la entrada en producción (Agustí, 2003). En las variedades poliembriónicas, los embriones cigóticos no son deseables como patrones porque se desconoce su efecto sobre la planta injertada; sin embargo, al igual que las variedades monoembriónicas, son de interés en programas de mejoramiento genético.

En México, la variedad ‘Manila’ ocupa la mayor superficie plantada y es la que más se consume en el mercado interno. Plántulas de ‘Manila’ se han utilizado tradicionalmente como

patrones para variedades de exportación tanto monoembriónicas como poliembriónicas (Crane *et al.*, 1997).

Frecuentemente, en la propagación de mango a partir de semillas poliembriónicas, los productores seleccionan las plántulas más vigorosas y asumen que éstas son de origen nucelar. Los embriones nucleares aparentemente carecen de suspensor (Mukherjee, 1997) y en estadíos tempranos, un embrión cigótico puede distinguirse por su posición micropilar y forma regular (Espinosa-Osornio y Engleman, 1998) y, en estadíos más avanzados, mediante análisis de isoenzimas (Schnell y Knight Jr., 1992) y marcadores moleculares. Sin embargo, estudios realizados con marcadores moleculares han reportado que las plántulas más vigorosas no necesariamente son las nucleares (Schnell y Knight Jr., 1992; Degani *et al.*, 1993; Rocha-Cordeiro *et al.*, 2006).

En este estudio se caracterizan y comparan parámetros físico-químicos de frutos y semillas y morfo-histológicos de semillas maduras, así como fisiológicos de la germinación de semillas y primeras etapas del crecimiento y sobrevivencia de plántulas de mango monoembriónicas de la variedad ‘Haden’ y poliembriónicas de las variedades ‘Manila’ y ‘Ataulfo’, con la finalidad de determinar si la asignación de recursos que la planta madre le proporciona a cada embrión influye en el vigor en función de los parámetros anteriores, o si las plántulas más vigorosas provienen de embriones nucleares o cigóticos. Se adecuaron metodologías para la extracción de ADN de mango y de marcadores moleculares AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms), con la finalidad de distinguir genéticamente embriones cigóticos y nucleares, y analizar la variabilidad de embriones de semillas monoembriónicas y poliembriónicas de mango para relacionarla con el vigor de las plántulas.

Los resultados de los análisis morfo-histológicos y físico-químicos, juntos con los datos generados mediante los AFLPs pretenden generar conocimientos prácticos que puedan ser útiles en el establecimiento de huertas a partir de poratinjertos poliembriónicos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. General:**

Comparar la fisiología de germinación y crecimiento de plántulas de mango de las variedades ‘Haden’, ‘Manila’ y ‘Ataulfo’ y determinar el índice de similitud de los genotipos provenientes de semillas poliembriónicas y monoembriónicas y el de las plantas madre mediante marcadores moleculares.

### **2.2. Específicos:**

1. Caracterizar físico-química y morfo-histológicamente frutos y semillas de las variedades monoembriónicas y poliembriónicas maduras de *M. indica*.
2. Comparar la capacidad y el tiempo medio de germinación (TMG) de semillas monoembriónicas y poliembriónicas de diferentes pesos base fresca (PBF), así como algunos parámetros de crecimiento y sobrevivencia de plántulas de *M. indica*, bajo las mismas condiciones de temperatura, luz y riego.

3. Implementar una metodología para la extracción de ADN genómico proveniente de hojas de plántulas germinadas a partir de semillas maduras de mango y de plantas madre.
4. Realizar la amplificación de fragmentos de ADN de *M. indica* por medio de marcadores moleculares (AFLP).

### 3. HIPÓTESIS

- Las características morfo-histológicas y físico-químicas de frutos y semillas de las variedades monoembrionicas y poliembrionicas (particularmente el PBF de semillas) se relacionan con el vigor de las plántulas en función de la germinación, crecimiento y sobrevivencia.
- Las plántulas de la variedad monoembrionica son más vigorosas que las poliembrionicas por presentar PBF de semilla mayor.
- En las semillas poliembrionicas, las plántulas de origen nucelar son más vigorosas que las cigóticas.
- Los marcadores moleculares AFLPs son útiles para la distinción de plántulas nucleares y cigóticas.
- Los marcadores moleculares AFLPs permiten distinguir variabilidad genética entre plántulas de mango provenientes de una misma semilla.

## 4. ANTECEDENTES

### 4.1. Descripción del mango

El árbol de mango es perenne y puede alcanzar en los trópicos hasta cuarenta metros de altura, pero en los subtropicos difícilmente supera los diez a quince metros (Hulme, 1971; Goguey, 1995). El mango es una planta monoica pero polígama, presenta en la misma panícula flores hermafroditas y masculinas (Goguey, 1995). Tanto el número de flores como la proporción de flores hermafroditas varían en función de la variedad, condiciones climáticas, época de floración y productividad del árbol (Singh *et al.*, 1966). La inflorescencia mide entre 5 y 40 cm de largo. El color, forma y tamaño de la inflorescencia, así como de la flor, es característico de cada variedad y depende en gran parte de factores hereditarios; puede ser amarillo liso o con manchas purpúreas, pubescente o completamente glabro (Mukherjee, 1997; Galán, 1999). Las hojas usualmente se encuentran alternadas y son simples (Vasanthaiiah *et al.*, 2007).

El fruto del mango es una drupa grande y carnosa que posee un mesocarpo comestible, de grosor variable, con un sabor de trementina a dulce, dado por la cantidad de canales resiníferos localizados en las células parenquimáticas del mesocarpo. La fruta madura del mango contiene una gran cantidad de nutrimentos que otorgan beneficios a la salud humana. Los frutos de mango son una fuente rica en vitamina C, vitamina B1 (tiamina), B2 (riboflavina), ácido fólico, carotenoides (carotenos, criptoxantinas, zeaxantinas, luteoxantinas, violaxantinas y neoxantinas) (Mercadante *et al.*, 1997; Yahia *et al.*, 2006; Ornelas-Paz *et al.*, 2007 y 2008) aminoácidos, hidratos de carbono (sacarosa, glucosa y fructosa), ácidos grasos,



minerales, ácidos orgánicos y proteínas (cuadro 1). Muchos de los valores de la composición del mango son variables, dependiendo de las variedades y del grado de madurez (USDA, 1992 en Ponce de León, 2003). El exocarpo puede ser delgado o grueso y glanduloso, mientras que el endocarpo es grueso y fibroso. Los frutos de mango varían en peso desde 200 g hasta 2 kg, y en forma desde redonda hasta ovoide, arriñonados y a veces aplanados lateralmente. En cuanto al color, éste varía entre verde, amarillo y distintas tonalidades de rosa, rojo y violeta (Mukherjee, 1997, Galán, 1999). El color del fruto además de ser un carácter varietal, depende de las condiciones ambientales.

La semilla del mango es oblonga, ovoide, alargada y se encuentra recubierta por un endocarpo fibroso, la cantidad y longitud de las fibras es un carácter varietal de importancia en los trabajos de selección. La semilla es aplanada y posee testa y tegmen delgados y está constituida en su mayor parte por los cotiledones (Mukherjee, 1997). La semilla de mango almacena principalmente carbohidratos, lípidos (grasas y aceites), taninos y proteínas (Cuadro 2). Los almidones (amilosa y amilopectina), almacenados en gránulos de almidón y la hemicelulosa son los carbohidratos más abundantes en las semillas. Las proteínas son almacenadas en las semillas en cuerpos proteínicos, que usualmente son una mezcla de diferentes proteínas.

Cuadro 1. Composición de la porción comestible (pulpa) de frutos de mango.

Nutriente	Unidad	Valor por 100 g de porción comestible	Nutriente	Unidad	Valor por 100 g de porción comestible
Agua	g	83.46	<b>Lípidos</b>		
Energía	kcal	60	Ác. g. saturados	g	0.092
Energía	kJ	250	12:0	g	0.001
Proteína	g	0.82	16:0	g	0.013
Lípidos totales (grasa)	g	0.38	14:0	g	0.072
Cenizas	g	0.36	18:0	g	0.004
Carbohidratos	g	14.98	Ác. g. monosaturados	g	0.140
Fibra	g	1.6	16:1 indiferenciado	g	0.067
Almidón	g	0.00	18:1 indiferenciado	g	0.075
			Ác. g. polinsaturados	g	0.071
			18:2 indiferenciado	g	0.19
			18:3 indiferenciado	g	0.051
			Ácidos grasos trans	g	0.00
			colesterol	mg	0.00
<b>Minerales</b>			<b>Azúcares totales 13.66</b>		
Calcio	mg	11	Sucrosa	g	6.97
Fierro	mg	0.16	Glucosa (dextrosa)	g	2.01
Magnesio	mg	10	Fructuosa	g	4.68
Fósforo	mg	14	Lactosa	g	0.00
Potasio	mg	168	Maltosa	g	0.00
Sodio	mg	1	Galactosa	g	0.00
Zinc	mg	0.09			
Cobre	mg	0.111			
Manganeso	mg	0.063			
Selenio	µg	0.6			
<b>Vitaminas</b>			<b>Aminoácidos</b>		
Vitamina C (ácido ascórbico total)	mg	36.4	Triptófano	g	0.013
Tiamina	mg	0.028	Treonina	g	0.031
Riboflavina	mg	0.038	Isoleucina	g	0.029
Niacina	mg	0.669	Leucina	g	0.050
Ácido pantoténico	mg	0.197	Lisina	g	0.066
Vitamina B6	µg	0.119	Metionina	g	0.008
Folato total	µg	43	Fenilalanina	g	0.027
Folato DFF	µg	43	Tirosina	g	0.016
Colina total	µg	7.6	Valina	g	0.042
Vitamina B12	µg	0.00	Arginina	g	0.031
Vitamina A	µg	54	Histidina	g	0.019
Retinol	µg	0	Alanina	g	0.082
Caroteno beta	µg	640	Ácido aspártico	g	0.068
Caroteno alfa	µg	9	Ácido glutámico	g	0.096
Criptoxantina beta	IU	10	Glicina	g	0.034
Vitamina A, IU	µg	1082	Prolina	g	0.029
Licopeno	µg	3	Serina	g	0.035
Luteína + zeaxantina	µg	23	hidroxiprolina	g	0.000
Vitamina E (alfa-tocoferol)	mg	0.90			
Tocoferol beta	mg	0.01			
Tocoferol gama	mg	0.01			
Tocoferol delta	µg	0.00			
Vitamina D	µg	0.00			
Vitamina K	µg	4.2			

Valores basados en el análisis de las variedades 'Tommy Atkins', 'Keitt', 'Kent' y/o 'Haden' (USDA, 2012).

Cuadro 2. Composición físico-química de los cotiledones de mango.

Componente	Extracción (%)	
	Con agua	Con NaOH
Agua	12.25	13.33
Almidón total	86.12	90.07*
Grasa cruda	3.41*	2.52
Proteína cruda	2.45*	1.80
Ceniza total	0.12*	0.09
Fibra cruda	3.84*	1.28
Azúcares totales	1.25ns	1.31
Taninos totales	2.81*	1.93
Amilosa	12.45ns	13.02
Amilopectina	87.55ns	86.98
Índice de absorción de agua (g de agua por g de muestra)	1.40	1.75*
Índice de solubilidad (g de sólidos por g de muestra)	0.010*	0.0086

Extracción con agua y con NaOH de los cotiledones de mango de la variedad 'Hilacha'. Separación de medias en cada fila según la prueba de t, \*: ( $p \leq 0.05$ ) (Medina *et al.*, 2010).

#### 4.2. Descripción de las variedades de estudio y portainjertos

La variedad 'Haden' es la más antigua de las variedades de Florida, Estados Unidos (1902); fue sembrada por John J. Haden. Es monoembriónica, temprana, sus árboles son corpulentos, vigorosos y de alto rendimiento (165 kilogramos de fruta por árbol, aproximadamente); necesita de la fecundación cruzada para formar el embrión y se propaga vegetativamente o por injerto, para conservar sus mejores características (Guzman *et al.*, 1993).

Los frutos de la variedad 'Haden' son drupas carnosas de forma oval y base redonda, regularmente de tamaño grande (entre 10.5 y 13 cm de largo), con un peso que varía de 270 a 430 gramos (con una media de 311 gramos); maduran en color amarillo y rojo carmín, con numerosas lenticelas de color blanco. La pulpa es jugosa, con fibra regular y de un buen sabor,

ligeramente ácido. Su vida de anaquel a temperatura ambiente es de seis días (Guzman *et al*, 1993).

En México, la variedad de mango ‘Haden’ ocupa, junto con la ‘Tommy Atkins’, las mayores superficies de cultivo comercial. ‘Haden’ ocupa el segundo lugar en volúmenes de exportación de mango (22%), precedida por ‘Tommy Atkins’ (43%). La variedad ‘Haden’ se cultiva en los estados de Guerrero (36%), Michoacán (24%), Nayarit (15%), Jalisco (11%), Sinaloa (7%) y Colima (7%) (Loubet, 2000). Dependiendo de la latitud, en México se cosecha desde febrero hasta principios de julio (Ireta, 1988; Guzman *et al*, 1993; Mosqueda *et. al.*, 1996).

La casi totalidad de las plantaciones comerciales de mango están establecidas sobre patrones poliembriónicos que garantizan la deseable homogeneidad de las mismas. Cada país o zona productora tiene un patrón poliembriónico típico. Así por ejemplo, en Australia se utiliza el ‘Kensington’ (Crane *et al.*, 1997), en Florida el ‘Turpentine’ (Campbell, 1992), en Israel el ‘13-1’ (Homsy, 1997), en Sudáfrica el ‘Sabre’ y el ‘4-9’ (Crane, 1998), en España ‘Gomera-1’ y ‘Gomera-3’ (Galán, 1990) y en México varias variedades criollas, el ‘Manila’ y en menor escala el ‘Piña’ (Crane *et al.*, 1997). En Latinoamérica normalmente se utilizan patrones poliembriónicos de tipo local (Galán, 1999).

Las características deseables de un patrón de mango incluyen: 1) Compatibilidad con distintas variedades; 2) Poliembrionía (para homogenizar las huertas con plantas de origen nucelar); 3) Enanizante (para la obtención de plantas de bajo porte); 4) Inductor de alto rendimiento; y 5) Inductor de fruta de alta calidad.

Las razones para la utilización de un patrón en un determinado país son casi de tipo histórico (Galán, 1999), ya que existe escasa información sobre el comportamiento de diversas variedades sobre distintos patrones. Es probable que la escasez de estudios se deba a la creencia infundada de que el patrón no ejerce influencia sobre las variedades (Smith *et al.*, 1997). Sin embargo, los primeros estudios reflejaban la supremacía de los patrones poliembriónicos frente a los monoembriónicos, con relación al vigor y productividad (George y Nair, 1969; Swamy *et al.*, 1972). En mango, se han realizado estudios de selección de patrones resistentes a la salinidad en Israel y en Canarias (Galán *et al.*, 1989). En Israel se efectuaron trabajos de selección para encontrar un patrón tolerante a suelos calcáreos y salinos (Gazit y Kadman, 1980 y 1983). También existe información sobre la mayor capacidad de absorción de calcio de determinados patrones (Tenhku Ab. Malik, 1996).

Los patrones influyen notablemente, tanto sobre la productividad y el rendimiento como sobre el aspecto del fruto y época de madurez, así como sobre el tamaño de los árboles, características de calidad de los frutos, adaptabilidad al medio y tolerancia a plagas y enfermedades (Avilán *et al.*, 1995). Trabajos efectuados en la India ponen de manifiesto la notable influencia de los patrones sobre el rendimiento del mango, como ocurre con la variedad ‘Dashehari’ que produce mayores rendimientos cuando se injerta sobre sus propias semillas (Teaotia *et al.*, 1970), también la variedad ‘Alfonso’ presenta un mayor rendimiento al injertarse en el patrón ‘Olour’ (Oppenheimer, 1956; Reddy *et al.*, 1989). Esta idea ha sido corroborada por otros estudios (Smith *et al.*, 1997).

Smith y col. (1997) encontraron amplias diferencias en el tamaño de fruto de la variedad ‘Kensington’ dependiendo del patrón, con diferencias de hasta 128 g entre los frutos producidos

sobre el patrón ‘Strawberry’ y los obtenidos sobre ‘Teluk Anson’, sin que estas diferencias sean atribuibles al número de frutos producidos por árbol. Los patrones también pueden influir sobre el rendimiento por su efecto enanizante, que puede permitir una mayor densidad de la plantación. Entre los patrones enanizantes cabe destacar a los hindúes ‘Kalapady’ y ‘Vella-i-kulumban’ (Singh y Singh, 1976).

La variedad de mango más importante para consumo doméstico en México es la ‘Manila’, utilizada también como patrón; es poliembriónica y temprana. En un estudio realizado en El Rosario, Sinaloa, México (Guzman *et al*, 1993), los autores observaron que los árboles de la variedad ‘Manila’ son vigorosos y de marcada alternancia en la producción. El tamaño de los frutos es considerado como pequeño a mediano, con aproximadamente 12 cm de largo y alrededor de 175 a 240 g de peso. Su forma es oblonga a elongada y está en el grupo de los mangos amarillos; tiene muy buen aroma y sabor excelente. El rendimiento medio por árbol es de 195 kg. Su vida de anaquel es más corta que ‘Haden’, aproximadamente 4 días (Guzman *et al*, 1993; Barbosa, 2003).

Los frutos de la variedad ‘Manila’ se producen en los estados de Veracruz (63%), Guerrero (10%), Oaxaca (10%), Sinaloa (8%), Colima (6%) y Chiapas (3%) La producción de frutos de esta variedad es temprana, se da entre abril y mayo y se destina principalmente al consumo nacional, tanto fresco como procesado (Loubet, 2000).

La variedad ‘Ataulfo’ fue originada en la región de Soconusco, México y ha sido dispersada en otras áreas de México y el mundo (Gálvez-López *et al.*, 2010). El mango ‘Ataulfo’ es uno de las variedades con mayor superficie sembrada en México (36,243 ha),

extensión comparable a la de ‘Haden’, y ha sido considerado por SAGARPA (2005) como una de las variedades más importantes por su creciente demanda en el mercado exterior (Luna *et al.*, 2006; Villegas y Mora, 2011). Los árboles de la variedad ‘Ataulfo’ son semi-vigorosos y poco alternantes. Los frutos son de excelente calidad, resistentes al manejo, con un peso entre 200 a 370 g, de color amarillo tanto en la cáscara como en la pulpa, la cual no presenta mucha fibra (Prieto *et al.*, 2006). La floración de ‘Ataulfo’ ocurre desde mediados de noviembre hasta mediados de febrero y la cosecha de frutos se realiza desde finales de enero hasta finales de mayo.

#### ***4.3. Taxonomía y sistemática***

*M. indica* es una planta dicotiledónea que pertenece a la familia *Anacardiaceae*, la cual incluye aproximadamente 600 a 700 especies herbáceas y arbustivas clasificadas en 64, 70 ó 75 géneros de acuerdo con Vasanthaiah y col. (2007), Viruel y col. (2005) y Paull y Duarte (2011), respectivamente.

La mayoría de las plantas pertenecientes a la familia de las Anacardiáceas son especies tropicales, las anacardiáceas son una familia importante desde el punto de vista económico en cuanto que comprende muchas especies cultivadas por sus frutos comestibles como algunos frutales de fruto seco: el anacardo (*Anacardium occidentale* L.) y el pistacho (*Pistacia vera* L.), así como algunas drupas como el mango (*Mangifera indica* L.). El mango es la especie más importante del género *Mangifera* (Galán, 1999). En el cuadro 3 se presenta la taxonomía de *Mangifera indica*.

Las especies del género *Mangifera* se encuentran distribuidas en una amplia zona geográfica con distintas condiciones ambientales y exhiben una considerable diversidad genética, particularmente en caracteres del fruto (Galán, 1999). Kostermans y Bompard, (1993) hacen un listado de 69 especies en el género *Mangifera* y lo subclasifican en dos subgéneros con varias secciones, basadas en la morfología floral (Cuadro 3). El primer subgénero es *Mangifera*, compuesto por cuatro secciones; sección *Marchandora* (una especie), sección *Eurantherae* (tres especies), sección *Rawa* (nueve especies) y sección *Mangifera* (34 especies). El segundo subgénero es *Limus*, que contiene 11 especies. Se listan otras 11 especies de *Mangifera*, las cuales no pudieron categorizar los autores (Mukkerjee, 1997).

La clasificación más reciente de *Mangifera* (Cuadro 4) refleja el estado actual de lo que es aún un conocimiento fragmentario del género. La clasificación filogenética basada en el uso de marcadores moleculares podría contribuir a enriquecer el conocimiento sobre las relaciones entre las especies del género *Mangifera* (Bompard y Schnell, 1997) y las formas de cultivo de *Mangifera indica* (Schnell y Knight Jr., 1993). Los primeros resultados publicados basados en técnicas modernas de análisis molecular no apoyaban completamente la clasificación tradicional basada en los caracteres morfológicos (Bompard y Schnell, 1997).

Eiadthong y col. (1999a) encontraron las relaciones filogenéticas de 13 especies de mango colectadas en Tailandia y analizadas con la técnica de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Las 13 especies fueron clasificadas en dos grupos, el primer grupo formado por *M. indica* y *M. sylvatica* y el segundo grupo formado por *M. caloneura*, *M. cochinchinensis*, *M. collina*, *M. flava*, *M. foetida*, *M. gedebe*, *M. griffithii*, *M. macrocarpa*, *M.*



*oblongifolia*, *M. odorata* y *M. pentandra*. Estas últimas 11 especies no pudieron separarse en diferentes subgéneros o secciones. Mukherjee (1953a) reportó que *M. sylvatica*, *M. pentandra* y *M. caloneura* están estrechamente relacionadas con *M. indica*, y fueron comparadas con otras especies del género debido a la similitud de sus caracteres morfológicos (como anchura del disco en la base del ovario, cinco pétalos libres y estambres insertados dentro del disco floral).

Sin embargo, de acuerdo a la clasificación de Kostermans y Bompard (1993), *M. pentandra* y *M. caloneura* están clasificadas dentro de la sección *Euantherae*, pero *M. sylvatica* está colocada en la sección *Mangifera* en la cual también se encuentra *M. indica*; los autores distinguen estas dos secciones basándose en el número de estambres fértiles (las especies que conforman la sección *Euantherae* presentan cinco estambres fértiles en una flor, mientras que las especies de la sección *Mangifera* usualmente tienen solamente un estambre fértil). Además, *M. indica* y *M. sylvatica* están distribuidas en las mismas áreas (Mukherjee, 1953a; Kostermans y Bompard, 1993). La única diferencia entre estas dos especies radica en la estructura de la panícula: la panícula de *M. indica* es pubescente, mientras que la de *M. sylvatica* es glabra.

Los hechos anteriores concuerdan con la estrecha relación entre *M. indica* y *M. sylvatica* observada en el trabajo de Eiadthong y col. (1999c), en el cual indican que *M. sylvatica* sería el antecesor directo de *M. indica* o que las dos especies comparten un ancestro común. El análisis genético de especies de *Mangifera* usando marcadores RAPD reportado por Schnell y Knight Jr. (1993) también reveló una clasificación inconsistente con la de Kostermans y Bompard (1993). En su estudio las especies pertenecen a diferentes subgéneros.

En otro estudio, Yonemori y col. (2002) analizaron las relaciones filogenéticas entre 14 especies de *Mangifera* de Tailandia comparando secuencias de ITS (Internal Transcribed Spacer). Los análisis de parsimonia y vecinos acoplados (neighbor joining, NJ) revelaron que el mango común *M. indica* está estrechamente relacionado con *M. laurina*, *M. sylvatica* y *M. oblongifolia*. Para estas cuatro especies, que pertenecen a la sección *Mangifera*, se propone un ancestro común por su evolución. *M. foetida* y *M. odorata* están también relacionados con *M. indica* en ambos tipos de árboles filogenéticos: pasimonioso y NJ; sin embargo, estas dos especies están clasificadas en un subgénero diferente (*Limus*) (Cuadro 4). *M. flava* (perteneciente a la sección *Mangifera*) forma un clado con *M. gebede*, la cual pertenece a la sección *Marchandora*. Estos resultados indican que la posición taxonómica de *M. flava* debe ser reconsiderada.

Los resultados anteriores indican que la clasificación basada en caracteres morfológicos debe ser reconsiderada con nueva información, especialmente por el origen de *M. indica*. Las suposiciones anteriores pueden llevar a una nueva concepción del estudio filogenético de las especies de *Mangifera* (Eiadthong *et al.*, 1999c, Yonemori *et al.*, 2002).

Cuadro 3. Posición taxonómica del mango

<b>Clase</b>	<b>Dicotiledóneas</b>
<b>Subclase</b>	Rosidae
<b>Orden</b>	Sapindales
<b>Suborden</b>	Anacardiineae
<b>Familia</b>	Anacardiaceae
<b>Género</b>	<i>Mangifera</i>
<b>Subgénero</b>	<i>Mangifera</i>
<b>Sección</b>	<i>Mangifera</i>
<b>Especie</b>	<i>Indica</i>

Cuadro 4. Clasificación de especies de *Mangifera* de acuerdo con Kostermans y Bompert (1993)

<b>Género <i>Mangifera</i></b>		
<b>Subgénero <i>Mangifera</i></b>		
<b>Sección <i>Marchandora</i> Pierre</b>		
	<b>Especies</b>	<i>M. gebede</i> Miq.
<b>Sección <i>Euantherae</i> Pierre</b>		
	<b>Especies</b>	<i>M. caloneura</i> Kurz
		<i>M. cochinchinensis</i> Engler
		<i>M. pentandra</i> Hooker f.
<b>Sección <i>Rawa</i> Kosterm.</b>		
	<b>Especies</b>	<i>M. andamanica</i> King
		<i>M. gracilipes</i> Hooker f.
		<i>M. griffithii</i> Hooker f.
		<i>M. merrillii</i> Mukherji
		<i>M. microphylla</i> Griff. Ex Hooker f.
		<i>M. minutifolia</i> Evard
		<i>M. nicobarica</i> Kosterm.
		<i>M. paludosa</i> Kosterm.
		<i>M. parvifolia</i> Borrel. & Koorders
<b>Sección <i>Mangifera</i></b>		
	<b>Especies</b>	<i>M. altissima</i> Blanco
		<i>M. applanata</i> Kosterm.
		<i>M. austro-indica</i> Kosterm.
		<i>M. austro-yunnanensis</i> Hu
		<i>M. casturi</i> Kosterm.
		<i>M. collina</i> Kosterm.
		<i>M. dewildei</i> Kosterm.
		<i>M. dongnaiensis</i> Pierre
		<i>M. flava</i> Evard
		<i>M. indica</i> Linn.
		<i>M. lalijiwa</i> Kosterm.
		<i>M. laurina</i> Bl.
		<i>M. linerifolia</i> (Mukherji) Kosterm.
		<i>M. longipetiolata</i> King
		<i>M. magnifica</i> Kochummen
		<i>M. minor</i> Bl.
		<i>M. monandra</i> Merr.
		<i>M. mucronulata</i> Bl.
		<i>M. oblongifolia</i> Hooker f.
		<i>M. orofila</i> Kosterm.
		<i>M. pedicellata</i> Kosterm.
		<i>M. pseudo-indica</i> Kosterm.
		<i>M. quadrifida</i> Jack
		<i>M. rigida</i> Bl.
		<i>M. rubropetala</i> Kosterm.
		<i>M. rufocostata</i> Kosterm.
		<i>M. sismilis</i> Bl.
		<i>M. sulauensis</i> Kosterm.
		<i>M. sumbawaensis</i> Kosterm.
		<i>M. sylvatica</i> Roxb.
		<i>M. swintonioides</i> Kosterm.
		<i>M. timorensis</i> Bl.
		<i>M. torquenda</i> Kosterm.
		<i>M. zeylanica</i> (Bl.) Hooker f.
<b>Subgénero <i>Limus</i> (Marchand) Kosterm.</b>		
	<b>Especies</b>	<i>M. blommesteinii</i> Kosterm.
		<i>M. caesia</i> Jack
		<i>M. decandra</i> Ding Hou
		<i>M. foetida</i> Lour.
		<i>M. remanga</i> Bl.
		<i>M. lagenifera</i> Griff.
		<i>M. leschenaultii</i> Marchand
		<i>M. macrocarpa</i> Bl.
		<i>M. odorata</i> Griff.
		<i>M. pajang</i> Kosterm.
		<i>M. superba</i> Hooker f.
<b>Especies de posición incierta</b>		
		<i>M. acutigemma</i> Kosterm.
		<i>M. bompardii</i> Kosterm.
		<i>M. bullata</i> Kosterm.
		<i>M. campospermoides</i> Kosterm.
		<i>M. hiemalis</i> Liang Jian Ying
		<i>M. maingayii</i> Hooker f.
		<i>M. persiciformis</i> Wu & Ming
		<i>M. subsessifolia</i> Kosterm.
		<i>M. taipa</i> Buch – Hamilton
		<i>M. transversales</i> Kosterm.
		<i>M. utana</i> Utana

#### 4.4. Origen y difusión del mango

Según Kostermans y Bompard (1993), el mango puede haberse originado en la zona comprendida entre Assam (India) y la antigua Birmania (hoy Myanmar), donde aún existen poblaciones silvestres, pero también puede ser nativo de las laderas bajas del Himalaya o incluso de zonas cercanas a Nepal o Butan (Fig. 1).



Figura 1. El área sombreada representa la distribución natural aproximada del mango. Fuente: USDA (2012).

Evidencias basadas en caracteres morfológicos, fitogeográficos, citológicos, anatómicos y estudios de polen indican que el género tuvo su origen en Borneo, Tailandia e Indochina (Vasanthaiiah *et al.*, 2007). Algunos botánicos estiman que el mango fue domesticado por el hombre desde hace 6000 años (Galán, 1999). El centro primario de evolución del mango es señalado en la región Indo-Birmana y Sureste de Asia, isla de Borneo y Sumatra (Sergent, 1999). Las Filipinas y las Celebes-Timor fueron el centro secundario de desarrollo. Una alta concentración de especies de *Mangifera* se reporta en la Península Malaya (Vasanthaiiah *et al.*, 2007).

La dispersión del mango por el subcontinente hindú y por el archipiélago malayo fue muy rápida; de hecho se ha sugerido que la domesticación de esta especie pudo haber ocurrido independientemente en varias áreas del Sudeste de Asia, lo que explicaría las diferencias existentes entre las variedades poliembriónicas de Myanmar, Tailandia, Indochina y Vietnam, y las variedades monoembriónicas de la India (Bompard y Schnell, 1997). En cualquier caso, según Singh (1960), esta especie se encontraba ya en todos los países tropicales de Sudeste Asiático hacia los siglos IV y V, tras haber sido distribuida por los monjes budistas.

El mango llegó al Occidente en el año 327 a.C. y al Este de África hacia el siglo X. La dispersión del mango hacia otras zonas tropicales fue muy lenta y llegó a través de los marineros españoles y portugueses, siguiendo dos rutas distintas. Así los españoles introdujeron los mangos desde Filipinas, a través del Océano Pacífico a los puertos comerciales del continente americano durante los siglos XV a XVIII (Hayes, 1957; Mata y Mosqueda, 1995). Los portugueses utilizaron la vía africana, llevando el mango al Sur de África en el siglo XVI y a Brasil en 1700 (Popenoe, 1920). Fue cultivado en Barbados en 1742 y en Jamaica en 1782, de acuerdo con Pope (1929). En el Golfo Pérsico, el mango comenzó a cultivarse en el siglo XVI. En Inglaterra comenzaron a cultivarlo bajo condiciones de invernadero en 1690 y los árboles en Kew comenzaron a fructificar durante 1818 (Vasanthaiyah *et al.*, 2007).

A México fue introducido antes de 1778 desde las Filipinas por los viajeros españoles (Popenoe, 1920). Algunos reportes indican que fue introducido por Veracruz a fines del siglo XVI y en el siglo XIX por Guerrero (Mata y Mosqueda, 1995; Guzmán, 1998). Otros reportes indican que primero fue introducido en Guerrero en el siglo XVIII, y durante el siglo XIX se

introdujeron mangos monoembriónicos de las Antillas al Golfo de México (Chávez *et al.*, 2001).

Su introducción en Australia se remonta al año 1860 (Kostermans y Bompard, 1993), llegando a Azores en 1865, a Canarias a finales del siglo XVIII y a Israel hacia comienzos del siglo XX (Fig. 2).

Fue introducido a Florida en la Costa este en la década de 1861 (Campbell, 1992) y en la costa oeste en la de 1870 (Hayes, 1957). En 1889, el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) introdujo portainjertos provenientes de la India. La obtención en 1912 de la excelente variedad ‘Haden’ a partir de ‘Mulgoba’, a la que siguieron otras variedades como ‘Tommy Atkins’, ‘Kent’, ‘Keitt’, ‘Irwin’, ‘Glen’, ‘Lippens’, ‘Van Dike’, ‘Parvin’, ‘Springfels’, ‘Zill’, etc., obtenidas por el Bureau Plant Industry del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, marca sin duda el comienzo del desarrollo moderno de este cultivo en el mundo occidental (Knigh, 1980; Campbell, 1992; Knight y Schnell, 1994; Galán, 1999). El éxito de las variedades de Florida se debe a su adaptabilidad a muchas regiones agroclimáticas del mundo, con altas características de calidad de los frutos (Bally *et al.*, 2009). Dichas variedades no sólo se han adaptado para el cultivo comercial en varios países, sino que han servido de base a los programas de mejora de Israel, Sudáfrica y Australia (Galán, 1999).

El mango, aunque bien conocido por la gente del subcontinente de India durante varios siglos fue virtualmente desconocido por los botánicos hasta 1605 cuando Carol Clusius lo mencionó por primera vez en sus escritos (Mukherjee, 1949a), refiriéndolo subsecuentemente

con los nombres de “Mangas” y “Amba”. Bontius (1658) citado en Bose (1985) le da el nombre de *Mangifera* por primera vez e hizo referencia a la planta



Figura 2. Distribución del mango en el mundo (zonas rojas). Fuente: FAO, 2010.

como “*arbor Mangifera*” (el árbol que produce mango). Posteriormente fue mencionado en la literatura como *Mangifera indica* Ray, *Mangus dornestica* Hermann o *Mangas sylvatica* Rheede. Linneo también refirió al mango como *Mangifera arbor* en 1747, El nombre de la especie como la conocemos actualmente, *Mangifera indica* L., lo presentó Linneo en 1753, en su libro “Species Plantarum” (Mukherjee 1949b).

#### ***4.5. Producción del cultivo de mango***

En el mundo se producen más de 34 millones de toneladas métricas de mango al año, en más de 103 países de los trópicos y subtrópicos (Vasanthaiah *et al.*, 2007; FAO, 2008). Nuestro país ocupa el quinto lugar como productor de mango (1,845,500 TM anuales) (FAO, 2010) y es el segundo exportador a nivel mundial, antecedido por la India (FAO, 2009) (Fig. 3). El cultivo y la producción de mango constituyen un pilar socioeconómico en las regiones

tropicales y subtropicales de México debido a la captación de divisas derivadas de la explotación de las variedades que se cultivan y exportan (Chávez *et al.*, 2001).

El mango se ha adaptado bien a las condiciones ambientales del trópico de la República Mexicana (Mata y Mosqueda, 1995). La superficie cultivada de mango en México es de 184,768.17 ha (SIAP, 2011). y, actualmente se cultiva en 23 de los 32 estados del Golfo de México y del Océano Pacífico (Mata y Mosqueda, 1995), entre los que destacan Chiapas, Oaxaca, Guerrero, Michoacán, Colima, Jalisco, Nayarit, Sinaloa y Sonora. En nuestro país la producción de mango es de siete meses del año debido a las diferencias latitudinales, los ciclos fenológicos, los patrones en las temporadas de lluvia y humedad del suelo y el uso de reguladores de crecimiento (Crane *et al.*, 2009). Las principales variedades de mango cultivadas en el país son las poliembriónicas de pulpa amarilla: ‘Manila’ y ‘Ataulfo’, con 41,049 y 36,243 Ha de superficie plantada, respectivamente. ‘Ataulfo’ es la variedad que más ha crecido en superficie en los últimos años. Entre las variedades monoembriónicas “mangos petacones” más cultivadas se encuentran ‘Haden’ (24,031 ha), ‘Tommy Atkins’ (19,521 ha) ‘Kent’ (13,323 ha) y ‘Keitt’ (6,525 ha), las cuales se producen básicamente para exportación, al igual que ciertos volúmenes de ‘Ataulfo’ y ‘Manila’ (Villegas y Mora, 2011) (Fig. 4). En Sinaloa hay una amplia estación de producción de frutos ‘Manila’, ‘Haden’ y ‘Tommy Atkins’ (julio); ‘Kent’ (julio-agosto) y ‘Keitt’ (agosto-septiembre). La variedad ‘Manila’ se produce principalmente en los estados de Veracruz y Guerrero (Crane *et al.*, 2009).



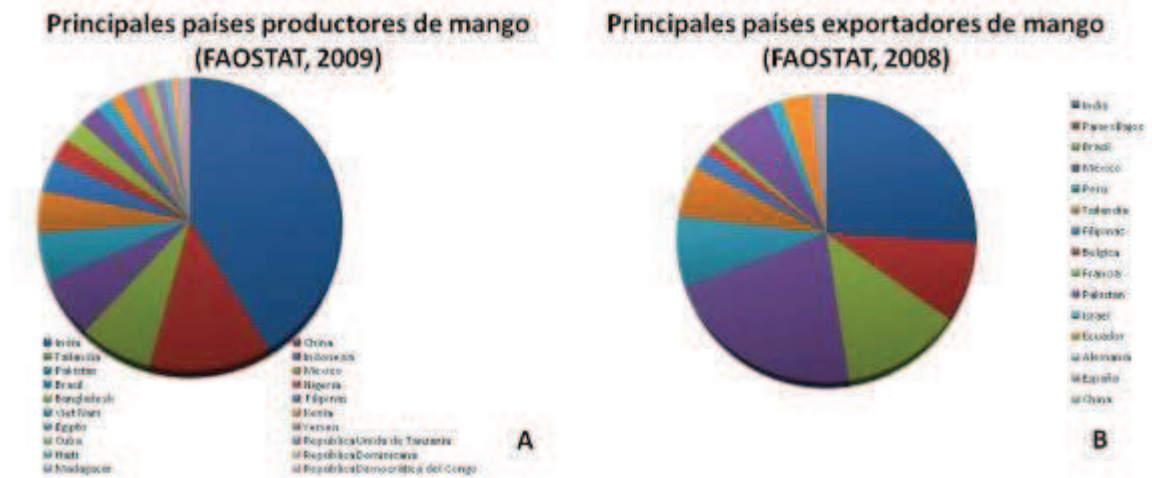


Figura 3. Principales países productores y exportadores de mango a nivel mundial. A) Productores, B) exportadores. FAO, 2012.

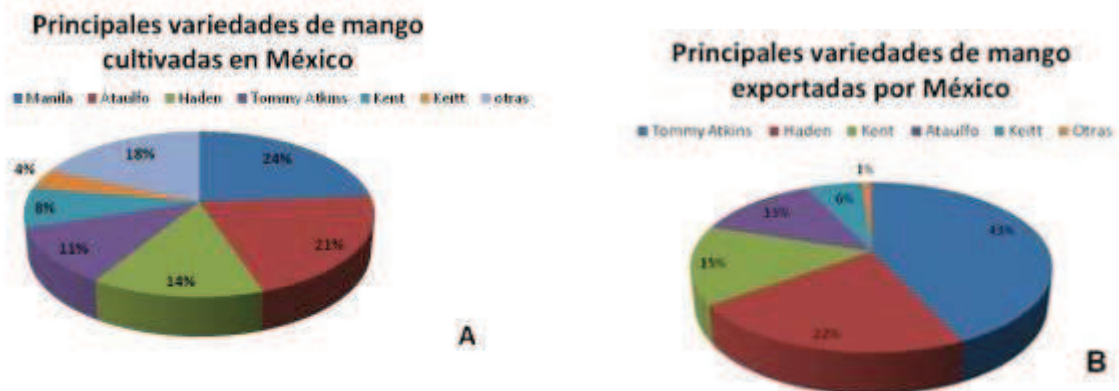


Figura 4. Principales variedades producidas y exportadas por México. A) cultivadas, B) exportadas (en A, datos tomados de SIAP, 2011 en Villegas y Mora, 2011).

#### 4.6. Citología del mango

La mayoría de las especies de *Mangifera* han sido reportadas como diploides, con número de cromosomas  $2n = 40$  y  $n = 20$  (Mukherjee, 1950; Majunder y Sharma, 1985;

Kostermans y Bompard, 1993, Iyer y Degani, 1997), aunque algunos autores sugieren que el mango evolucionó a través de anfidiploidia (Mukherjee, 1950; Mathews y Litz, 1992; Yonemori *et al.*, 2002), por lo que se considera una especie alotetraploide o anfidiplóide ( $2n = 4x = 40$ ), que evolucionó a partir de hibridación interespecífica y subsecuentemente duplicó el número de cromosomas (Mukherjee, 1953b; Degani *et al.*, 1997; Litz, 1997).

Arumuganathan y Earle (1991) estimaron el contenido de ADN de más de 100 cultivos importantes. El contenido de ADN varía desde 0.30 pg ó 145 Mpb en *Arabidopsis* spp. a más de 50 pg ó 24,255 Mpb en poro (*Allium ampeloprasum*). Sin embargo, el contenido de ADN de la mayoría de las especies diploides (tomate, arroz, *Arabidopsis* spp.) está en el rango de 0.30 a 1.0 pg. El contenido de ADN nuclear de mango es de solamente 0.91, debido a su alto nivel de polimorfismo (Litz y Gómez-Lim, 2005). El tamaño del genoma del mango es de  $4.39 \times 10^8$  pb (Arumuganathan y Earle, 1991), en 20 cromosomas, la mayoría de ellos pequeños (Vasanthaiyah *et al.*, 2007).

La gran variabilidad en el ancho y grueso de las hojas y otras características morfológicas entre variedades de *M. indica* soportan la hipótesis de poliploidía y un origen híbrido (Singh, 1960). Recientemente se identificaron dos apariciones espontáneas de plántulas tetraploides de mango. En las Islas Canarias, España, se confirmó a la variedad ‘Gomera-1’ como tetraploide utilizando análisis cromosómico así como citometría de flujo (Galán *et al.*, 1999 y 2001). En Katherine, Australia, otra variedad de mango común fue confirmada como tetraploide mediante análisis cromosómico. Actualmente, ambas variedades tetraploides son utilizadas como portainjertos en los cultivos de mango (Bally *et al.*, 2009).

*Mangifera superba*, especie con flores de gran tamaño, podría ser poliploide y se han reportado al menos tres casos de tetraploidia ('Vella-i-Collumban', de la India con  $2n = 80$ ). Estos estudios no sólo demuestran científicamente la naturaleza poliploide de las plantas de mango estudiadas, sino que aportan datos que podrían avalar la poliploidia señalada en la variedad 'Vella-i-Collumban' (Majunder y Sharma, 1985). La similitud de ploidías entre las especies de *Mangifera* indica que pudo haber sido plausible un entrecruzamiento inter-específico (Bally *et al.*, 2009).

#### **4.7. Poliembrionía en mango**

La apomixis (Apo = sin; mixis = mezcla) es la reproducción clonal que perpetúa la composición genética de un organismo o grupo de individuos (Crane, 2001). Este fenómeno es inherente a diferentes grupos representativos: plantas (gimnospermas y angiospermas), invertebrados y vertebrados. Dentro de las angiospermas se han descrito más de 400 especies apomícticas incluidas en más de 40 familias tanto de monocotiledóneas como de dicotiledóneas, con patrones de distribución que indican un origen polifilético, es decir, parecen haber surgido varias veces en forma independiente durante la evolución (Bashaw y Hanna; Koltunow *et al.*, 1995; Bicknell y Koltunow, 2004).

En las plantas con flores, la apomixis se define como la formación asexual de una semilla a partir de los tejidos maternos del óvulo. Las plantas apomícticas producen sus embriones sin que ocurra meiosis ni fecundación, por lo que sus descendientes son genéticamente idénticos a la planta madre. La apomixis fue descrita en las plantas superiores

por vez primera en 1841 por J. Smith en una especie de planta australiana *Alchornea ilicifolia* (syn. *Caelebogyne ilicifolia*) cuando un ejemplar femenino de esta especie dioica fue llevada a los jardines de Kew en Inglaterra y la planta solitaria floreció produciendo semillas en abundancia, lo cual puso en evidencia el carácter (Bicknell y Koltunow, 2004).

La póliembrionía es un tipo de apomixis facultativa en el que se desarrollan de manera simultánea varios embriones en una misma semilla que contiene un embrión sexual (Koltunow *et al.*, 1995; Quero-Carrillo *et al.*, 2010; Kundan *et al.*, 2012). El análisis de diferentes clasificaciones de poliembrionía ha demostrado que el principal criterio de clasificación incluye el origen de las células iniciales, la manera en que se forman los embriones y sus características genéticas (Fig. 1) (Batygina y Vinogradova, 2007). Con base en estos criterios, Yakovlev (1967) y Bouman y Boesewinkel (1969) (citados por Batygina y Vinogradova, 2007) consideran dos tipos principales de poliembrionía: gametofítica y esporofítica.

A través de la ruta esporofítica, también llamada embrionía adventicia o poliembrionía esporofítica, los embriones surgen directamente de una célula somática de la nucela o de los tegumentos del óvulo (Richards, 2003). Este tipo de poliembrionía se presenta ampliamente entre las angiospermas: aparece en 162 especies dentro de 35 familias de dicotiledóneas y en 33 especies de 11 familias de monocotiledóneas.

En la poliembrionía esporofítica se han reportado varias especies donde los embriones surgen a partir de células somáticas de la nucela, como es el caso de *Citrus trifoliata*, naranjo espinoso (Osawa, 1912); *Nigritella nigra*, especie de orquídea (Afzelius, 1928); *Zeuxine sulcata*, especie de orquídea (Swamy, 1946); *Eugenia jambos*, pomarroja o manzana rosa

(Roy, 1953); *Mangifera indica*, mango (Sachar y Chopra, 1957); *Syzygium caryophyllifolium*, especie de la familia Myrtoideae (Roy y Sahai, 1962); o a partir de los tegumentos internos del óvulo en *Melampodium divaricatum*, maleza tropical llamada botón de oro (Maheswari Devi y Pullaiah, 1976) y *Spiranthes cernua*, especie de orquídea (Swamy, 1948).

Los embriones nucelares pueden desarrollarse a partir de una sola célula, como ocurre en el caso de *Poa pratensis*, pasto azul de Kentucky (Batygina y Freiberg, 1979); *Sarcococca humilis*, especie de la familia Buxaceae (Naumova y Villemse, 1983); *Poncirus trifoliata*, syn. *Citrus trifoliata*, *Opuntia elata*, especie de la familia Cactaceae (Naumova, 1992) o a partir de un complejo de células embriogénicas que preliminarmente se forman de células nucelares, como en *P. pratensis* (Batygina y Freiberg, 1979). Tales embriones se desarrollan, generalmente, en la parte micropilar del óvulo, pero en ocasiones pueden también formarse en las partes laterales y en la calaza. Usualmente, los embriones compiten entre ellos hasta alcanzar el estado de madurez; en algunos casos, como ocurre con *Opuntia elata* (Archibald, 1939; Naumova, 1992) los embriones nucelares pueden reemplazar al embrión sexual y como resultado la semilla madura contiene solamente embriones adventicios. La poliembrionía nucelar aparece comúnmente en los cítricos, los cuales se han convertido en un sistema modelo para estudiar el proceso (Richards, 2003).

Por otro lado, los embriones tegumentarios usualmente se forman a partir de células de la epidermis interna del tegumento interno, como ocurre por ejemplo en *Spiranthes cernua*, especie de orquídea (Swamy, 1948). En algunos casos, estos embriones no se desarrollan solamente en la parte micropilar del óvulo, sino también en la parte media. Esto es inherente en las especies con “endotelio” (*tapetum tegumentario*), la capa más interna del tegumento

interno está formada de largas células con citoplasma denso (*Carthamus tinctorius*, cártamo—Maheshwari Devi y Pullaiah, 1977; *Melampodium divaricatum*—Maheshwari Devi y Pullaiah, 1976). Generalmente, tales embriones no alcanzan la madurez y comienzan a degenerarse en los estadios tempranos de desarrollo (Batygina y Vinogradova, 2007).

En la poliembrionía gametofítica, por otro lado, se forman siempre sacos embrionarios que difieren en algunos aspectos del gametofito femenino haploide (n) generado a partir de la megáspora funcional (Richards, 2003).

En la poliembrionía o apomixis gametofítica, los embriones adventicios se forman a partir de células gametofíticas: sinérgidas y antípodas (apogaméticas), así como de la ovocélula, cuando se desarrolla un saco embrionario adicional (Batygina y Vinogradova, 2007). Este tipo de apomixis puede ser clasificada como: *diplosporía*, cuando el saco embrionario se origina a partir de la célula madre de la megáspora misma (ya sea por mitosis o luego de una falla en la meiosis) o *aposporía*, cuando el saco embrionario se origina directamente por mitosis a partir de una célula somática, usualmente una célula de la nucela (Richards, 2003). El 75% de las plantas con apomixis gametofítica pertenecen a tres familias: Asteraceae, Rosaceae y Poaceae, las cuales en conjunto constituyen el 10% de las especies de plantas con flores (Bicknell y Kultunow, 2004).

La apogamia sinérgida ha sido descrita en 140 especies de 56 familias de plantas dicotiledóneas y 83 especies de 19 familias de monocotiledóneas, mientras que la apogamia antipodal se ha reportado en 10 especies de cinco familias de dicotiledóneas y 17 especies de 9 familias de monocotiledóneas (Solntseva, 1999). El desarrollo de los embriones sinérgidos

comienza, por lo general, después de la fecundación de la ovocélula y la división del cigoto. Cada embrión se desarrolla más lentamente que el embrión sexual y, en algunos casos, no son competitivos; como resultado mueren en los primeros estadios de desarrollo. En algunos casos, cuando muchos tubos polínicos penetran dentro del saco embrionario, una de las sinérgidas puede ser fecundada por una célula espermática adicional (por ejemplo en *Najas major*, perteneciente al género *Najas* de plantas acuáticas—Guignard, 1901; *Cuscuta reflexa*, planta parásita de la familia Convolvulaceae—Johri y Tiagi, 1952; *Tamarix ericoides*, especie de la familia Tamericeae—Johri y Kak, 1954; *Pennisetum squamulatum*—Sindhe *et al.*, 1980; Wen *et al.*, 1998; Akiyama *et al.*, 2006) y formar un embrión. En este caso, ambos embriones se caracterizan por presentar una herencia biparental y generalmente alcanzan el estado de madurez.

La formación de embriones apogaméticos fue descrita en ambos sacos embrionarios haploides (*Lilium martagon*—Cooper, 1943; *Arabis lyalli*—Lebègue, 1948; *Bergenia delavai*—Lebègue, 1949; *Argemone mexicana*—Sachar, 1955; *Fritillaria meleagroides*—Smirnov y Grakhantseva, 1982; *Ulmus americana*—Shattuck, 1905; *U. glabra*—Ekdahl, 1941) y otros diploides en apomícticos (*Rudbeckia laciniata*—Solntseva, 1973). En la mayoría de los casos, el desarrollo de los embriones sinérgidas y antipodales se lleva a cabo sin fecundación y, por tanto, apogaméticamente en sacos embrionarios haploides, por lo que esta vía de formación de embriones puede ser considerada como una posible fuente de origen de haploides (Batygina y Vinogradova, 2007).

Los casos de embriones antipodales son raros. Algunos autores cuestionan la posibilidad de su formación (Johri y Ambegaokar, 1984), mientras que otros (Johansen, 1950)

creen que es necesario diferenciar entre la simple proliferación de células antipodales y los verdaderos embriones antipodales. Estudios embriológicos de cuatro especies de *Stipa* han demostrado que las tres antípodas comienzan una división temprana y todas ellas dan origen a estructuras parecidas a embriones (Yakovlev y Solntseva, 1965).

En *M. indica* existen dos condiciones de embrionía, de acuerdo al modo de reproducción de la especie y se relacionan con el centro de diversidad: a) germoplasma subtropical con semillas monoembriónicas (tipo Índico) y b) germoplasma tropical con semillas poliembriónicas (del Sureste de Asia) (Litz, 1997). Las semillas de plantas monoembriónicas contienen un embrión cigótico y generan una planta por semilla, generalmente homocigótica. En las variedades apomícticas de *M. indica*, en las semillas se forman dos o más embriones: normalmente uno, el embrión cigótico, se desarrolla como producto de la fecundación del óvulo, pero además al tiempo que se desarrolla el embrión cigótico, se forman uno o más embriones nucelares a partir del tejido nucelar que rodea al saco embrionario (León, 2000). En algunas variedades poliembriónicas de mango suele suceder que todos los embriones de una semilla son de origen nucelar o de yemas e hipocótilos de otros embriones y reproducen exactamente las características de la planta madre (Mukherjee, 1997). Es común que al desarrollarse los embriones nucelares, eliminen al embrión sexual y todas las plántulas que se derivan de una semilla sean nucelares (León, 2000), pero en otros casos uno de los embriones es sexual y los restantes nucelares (Mukherjee, 1997; Galán, 1999).



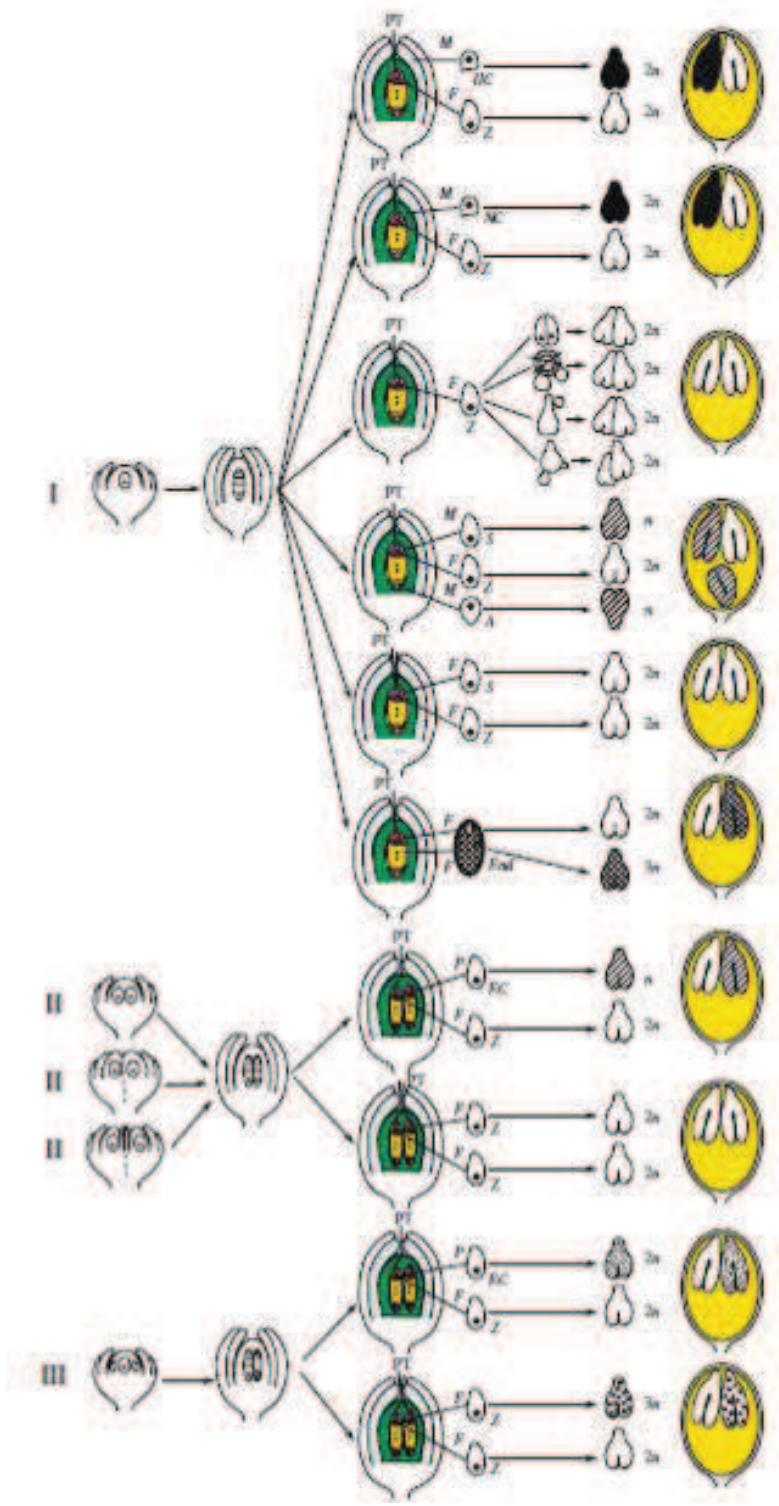


Figura 5. Posibles vías de formación de varios embriones en la misma semilla. (I) a partir de células de un saco embrionario y tejidos que lo rodean; (II) como resultado del desarrollo de dos sacos embrionarios; (III) como resultado del desarrollo de un saco embrionario apospórico adicional. *M*, mitosis; *F*, fecundación; *P*, partenogénesis; *A*, antípoda; *Z*, cigoto; *IIC*, células del tegumento interno; *NC*, células de la nucela; *PT*, tubo polínico; *S*, sinérgida; *End*, endospermo; *EC*, ovocélula. Desarrollo del embrión a partir de: ( ) cigoto,  $2n$ ; (●) células de la nucela y del tegumento interno,  $2n$ ; (◐) sinérgidas y antípodas no fecundadas,  $n$ ; (◑) células del endospermo,  $3n$ ; (◒) ovocélula de saco embrionario apospórico no fecundado,  $2n$ ; (◓) ovocélula de saco embrionario apospórico fertilizada,  $3n$ . Tomado de Batygina y Vinogradova, 2007).

En las variedades monoembriónicas, la nucela puede desintegrarse o ser absorbida por el endospermo conforme éste se desarrolla y, conforme el embrión se desarrolla absorbe al endospermo. Para cuando la semilla madura, el endospermo y casi la totalidad de la nucela han sido absorbidos. En algunos casos, cuando el embrión no se desarrolla, algunos frutos pueden madurar sin embrión en la semilla. En los óvulos poliembriónicos, la nucela puede presentarse con células en diversos estados de desintegración cuando se encuentran en contacto con las células del endospermo. Sin embargo, algunas de estas células nucelares pueden alargarse y llenarse con un citoplasma denso y posteriormente volverse redondas. Las células parenquimatosas de la nucela pueden llegar a embeberse en el endospermo, utilizándolo como un sustrato para su desarrollo. Dado que estas células son genéticamente idénticas a la planta madre, pueden producir mitóticamente estructuras con las mismas características de su progenitor y, debido a que tienen su origen en la nucela y se desarrollan en el endospermo, se les llama embriones nucelares. En algunas variedades poliembriónicas puede permanecer el embrión cigótico junto con los embriones nucelares. En algunas otras variedades solo se presentan los de tipo nucelar. En algunos casos, todas las plántulas que se originan de una misma semilla pueden ser idénticas a la planta madre. Esto podría explicar algunas de las “razas de plántulas” con las verdaderas razas producidas a partir de la fecundación de la semilla (Sturrock, 1968; Thongplave *et al.*, 1983).

La morfología y el grado de desarrollo de los embriones nucelares son similares a los del cigoto hasta que se inicia la forma globular (Koltunow *et al.*, 1996; Costa *et al.*, 2004; Sánchez *et al.*, 2006). De acuerdo con Esen y Soost (1977) y Wakana y Eumoto (1987) tanto los embriones nucelares como el cigótico presentan suspensor en las primeras etapas de

desarrollo. En estadios tempranos, el embrión cigótico se localiza en el micrópilo, lo que podría diferenciarlo de los nucelares antes de que éstos se desarrollen.

En las variedades poliembriónicas, el embrión cigótico hereda los caracteres de ambos padres. Los embriones nucelares, al formarse a partir del tejido materno sin la intervención del polen, tienen la misma constitución genética que la planta madre, a la cual se asemejan en todos sus caracteres. La presencia del grano de polen en el óvulo no es estrictamente necesaria para la formación de embriones nucelares, pero en la mayoría de los casos puede inducir su desarrollo (León, 2000).

Las células nucelares provenientes de embriones adventicios se reconocen por su citoplasma denso y por su alto contenido de almidón. Gradualmente emergen de la cavidad del saco embrionario donde se dividen y diferencian en embriones (Litz, 1997). Generalmente, cuando hay varios embriones, estos difieren en tamaño y por lo común sólo uno o unos pocos alcanzan el desarrollo completo. Los embriones nucelares aparentemente pierden el suspensor conforme se desarrollan (León, 2000).

La poliembrionía en *Mangifera* ha sido reportada también en *M. casturi*, *M. laurina* y *M. odorata* (Bompard, 1993). Algunas variedades poliembriónicas de mango reportadas pueden producir semillas solamente con embrionía nucelar adventicia, por ejemplo ‘Strawberry’ (Juliano, 1934), ‘Carabao’ y ‘Pico’ (Juliano y Cuevas, 1932) y ‘Olour’ y ‘Cambodiana’ (Maheshwari et al., 1955). En la mayoría de las variedades poliembriónicas se ha reportado la presencia de embriones cigóticos entre el 2 y 47% (Truscott *et al.*, 1993).

Los primeros estudios sugieren que la poliembrionía parece ser un rasgo poligénico (Juliano, 1934; Strurrock, 1967), segregado como un carácter recesivo en la progenie de cruces controlados. Litz (1997) reporta que la incidencia de la poliembrionía está determinada genéticamente, que la embrionía adventicia probablemente refleja el efecto de uno o más genes recesivos. Otros estudios, sin embargo, han demostrado que la poliembrionía es heredada como un carácter dominante (Aron *et al.*, 1998).

El efecto de la embrionía nucelar determina que por semilla se puedan perpetuar ciertos genotipos, sin que se pierda la posibilidad de que por vía sexual aparezcan en la misma especie segregantes o híbridos nuevos (León, 2000).

Varios estudios han demostrado que las plántulas nucleares pueden ser distinguibles de las plántulas cigóticas provenientes de semillas poliembriónicas por medio de isoenzimas y marcadores de ADN (Ver Anexo B).

La mayoría de las variedades monoembriónicas más importantes comercialmente son el resultado de selecciones de plántulas surgidas naturalmente y entrecruzamiento o polinización abierta. Las variedades originadas en Florida y la India durante el siglo pasado son de las que derivan la mayoría de las variedades comerciales actuales: ‘Haden’, ‘Tommy Atkins’, ‘Kent’ o ‘Keitt’ por ejemplo, y por lo tanto, son interesantes en mejora genética a partir de programas de selección y obtención de variedades. La selección de plántulas monoembriónicas no es sencilla ya que la diversidad entre éstas es baja, debido a la autopolinización. Las variedades poliembriónicas no son adecuadas, debido en principio a que las plántulas son genéticamente similares a la planta madre (Bally *et al.*, 2009).

Tradicionalmente, en varios países productores de mango se han utilizado los embriones poliembriónicos de origen nucelar como patrones, ya que le brindan al injerto ventajas de adaptabilidad al medio (Avilán *et al.*, 1995) y uniformidad (Litz, 1997). Existen algunas variedades poliembriónicas comercialmente importantes como ‘Carabao’, ‘Manila’, ‘Kensington’ o ‘Nan Doc Mai’ (Galán, 1999); ‘Alica’, ‘Herman’ y ‘Florigon’, originadas a partir de plántulas de ‘Saigon’ y algunas variaciones de ‘Kensington Pride’ (Knight y Schnell, 1993).

#### **4.8. Programas de mejora en mango**

Las investigaciones en mango han avanzado de manera considerable en las tres últimas décadas. En 1984 se inició un proyecto de colaboración entre: *World Conservation Union* (Unión para la Conservación del Mundo), *World Wide Found for Nature* (Fondo Mundial para la Naturaleza) y el entonces IBPGR, hoy IPGRI, *International Plant Genetic Resources Intitute* (Instituto Internacional de Recursos Genéticos Vegetales) para realizar prospecciones en el campo de *Mangifera*, con énfasis en Borneo y Península de Malasia (probablemente las dos áreas de mayor diversidad para este género). De acuerdo a Galán, 1999, en dicho proyecto se contempló: 1) Realizar un inventario de las especies de *Mangifera* en la región y su variación intraespecífica; 2) Recopilar datos ecológicos y agronómicos de cada especie; 3) Evaluar el estado de conservación de cada especie y las amenazas de erosión genética; 4) Explorar las posibilidades de conservación *in situ* y 5) Detectar posibles fallos en el actual

sistema de áreas protegidas existente en esta región, así como recomendar medidas para asegurar la supervivencia a largo plazo de este germoplasma.

En la investigación en mango se han abordado temas relacionados con la conservación de la diversidad genética, mejora genética, identificación de variedades por medio de sus genealogías y el desarrollo de técnicas de biología molecular, así como de sistemas eficientes de propagación y de manejo.

Pese a que aún no se han realizado estudios en profundidad sobre hibridación interespecífica, no cabe duda de que el género *Mangifera* presenta un enorme potencial genético para la mejora del mango. Dentro del género se encuentran especies de gran interés como fruta fresca, tales como *M. caleunera* o *M. pentandria*, e incluso otras con resistencia a enfermedades (antracnosis) como *M. laurina* o con tolerancia al frío como *M. sylvatica* (Bompard y Schnell, 1997; Galán, 1999).

Como consecuencia de su gran antigüedad como cultivo y la naturaleza de su reproducción anual, se han originado un gran número de variedades cultivadas de mango, seleccionándose diferentes tipos. Sólo en aquellos lugares en que la selección se orientó a tipos poliembriónicos (por ejemplo la variedad ‘Carabao’ en Filipinas o la ‘Kensington’ en Australia) la variabilidad quedó muy reducida. El desarrollo de las técnicas de propagación vegetativa ha constituido un requisito indispensable para el establecimiento de plantaciones uniformes de cultivares monoembriónicos, e incluso de cultivares poliembriónicos donde, en ocasiones, se desarrolló una cierta proporción de embriones sexuales. La técnica de propagación vegetativa más antigua, el injerto de aproximación, es conocida en la India desde

hace cientos de años y así, aunque existen en dicho país más de mil variedades, sólo unas veinte se cultivan a gran escala.

El desarrollo en tiempos modernos de técnicas de propagación más sencillas, como el injerto, tiene importancia crucial en la industria del mango. Pero sin duda la importancia de Florida en esta especie es capital. En el sur de la Península de Florida, el USDA (United State Department of Agriculture) introdujo en 1889 seis variedades de mango de la India, aunque sólo uno de estas variedades ('Mulgoba') sobrevivió (Campbell, 1992), dando origen a la variedad 'Haden' (base de la industria comercial del mango casi hasta nuestros días). Entre 1900 y 1937 el USDA introdujo hasta 52 variedades de mango de diferentes países de cuyos cruces se originaron las llamadas variedades de Florida ('Haden', 'Tommy Atkins', 'Kent', 'Keitt', 'Irwin', etc.) que, gracias a su excelente calidad, fácil adaptación y al desarrollo de las técnicas de propagación se han convertido en la base del cultivo moderno de esta especie (Galán, 1999).

La introducción durante el siglo XX de germoplasma de diversos lugares del mundo en Florida, ha traído como consecuencia la creación en esta región de lo que podría considerarse un centro secundario de diversidad para el mango, con la obtención de un gran número de variedades que no sólo han probado su adaptación para el cultivo comercial en numerosos países, sino que han servido de base a los programas de mejora de Israel, Sudáfrica y Australia (Galán, 1999).

Aunque se reconoce de forma general que las variedades de Florida tienen excelentes características, son sensibles en su mayoría a un grave problema disfuncional como es la

llamada “descomposición interna” (Young, 1957; Malo y Campbell, 1982; Galán y Fernández, 1984; Wainwright y Burbage, 1989). Por ello, se han realizado trabajos recientes de mejora en Israel (Lavi *et al.*, 1997, Tomer *et al.*, 1997), Sudáfrica (Cilliers *et al.*, 1997), Australia (Whiley *et al.*, 1993), India (Iyer y Dinesh, 1997), Brasil (Rosseto *et al.*, 1997), Estados Unidos (también en Florida) (Campbell, 1992) y otros países. Todos los cultivares de mango existentes tienen algún defecto y por ello continúa la búsqueda de nuevos cultivares con características deseables del árbol y del fruto (color y textura de la cáscara, sabor y textura de la pulpa para su fácil consumo) para los mercados europeos y orientales, además de que sean resistentes a la “descomposición interna” (Galán, 1999).

Tradicionalmente se ha considerado al mango como una especie difícil de manejar en un programa de mejora, por los siguientes aspectos negativos de acuerdo con Iyer y Degani, 1997: 1) Larga fase juvenil, aproximadamente de 7 años, 2) Alto nivel de heterocigosis, 3) Producción de una sola semilla por fruto, 4) Escaso cuajo y retención de fruta, 5) Poliembrionía, 6) Necesidad de grandes parcelas para la evaluación de híbridos, 7) Escaso conocimiento de la heredabilidad de las diferentes características productivas y de las correcciones genéticas entre las mismas y 8) Fuerte interacción del genotipo con el medio ambiente (Galán, 1999).

A pesar de estas aparentes dificultades, algunas de las características mencionadas pueden obviarse e incluso ser de utilidad en los programas de mejora. Así, el fuerte estímulo de las bajas temperaturas invernales hace que se acorte notablemente la fase juvenil en los subtrópicos, donde las plantas llegan incluso a florecer en vivero. Esto permite acortar la evaluación de híbridos tanto en relación a la superficie como al tiempo necesario para la



evaluación de los mismos. El alto nivel de heterocigosis va unido a una amplia variabilidad genética, lo que representa un mayor potencial de mejora. La poliembrionía puede también ser explotada pues permite, en caso de mejora de una variedad poliembriónica, garantizar que cualquier planta procedente de semilla de dicha variedad con características morfológicas distintas sea inmediatamente reconocida como un cruce del mango poliembriónico con aquella variedad usada como parental masculino (Galán, 1999).

Los métodos de mejora incluyen la selección a partir de plantas de polinización abierta y de polinización controlada. La polinización abierta ha dado origen a la mayoría de las variedades de la India y a las de Florida. El método de polinización controlada exige la polinización manual o con abejas y moscas que puedan efectuar la polinización (Galán, 1999).

La selección de las plántulas procedentes de métodos de polinización controlada se vería notablemente facilitada si se hubieran encontrado marcadores moleculares ligados a un importante carácter hortofrutícola. Aunque los programas de mejora de Israel están trabajando activamente en esta dirección (Lavi *et al.*, 1997), por el momento aún no se ha obtenido el éxito deseado (Litz, 1998).

Aunque la variabilidad dentro de árboles de la misma variedad ha sido señalada numerosas veces en la India (Oppenheimer, 1956; Mukherjee *et al.*, 1968; Singh y Chadka, 1981; Singh *et al.*, 1985), las dificultades de selección son grandes, ya que obligan a la evaluación de las posibles características diferenciadoras bajo diversas condiciones ambientales para tener la seguridad de que se trata de variaciones genéticas. Sin embargo, la selección clonal ha proporcionado algún material de interés en mango, particularmente en

Australia, donde se han identificado algunos clones dentro de la variedad ‘Kensington’ que muestran, entre otras características, una mayor resistencia a la “mancha negra bacteriana” (Whiley *et al.*, 1993).

Ha habido intentos de utilización de radiaciones ionizantes para obtener mutaciones en mango (Siddiqui *et al.*, 1966; Siddiqui, 1985; Sharma y Majunder, 1988), pero por el momento no se ha obtenido ningún resultado de interés. Se conocen dos casos de mutaciones naturales: ‘Davis Haden’, que se originó de la variedad ‘Haden’ (Young y Ledin, 1954) y ‘Rosica’, procedente de una mutación de yema de la variedad peruana ‘Rosado de la Ica’ (Medina, 1977). Por otro lado, se ha conseguido la transformación del mango por medio de *Agrobacterium tumefaciens* (Mathews *et al.*, 1992 y 1993), habiéndose incluso conseguido la inserción en la variedad ‘Hindi’ de un gen que retarda el proceso de maduración a través del bloqueo de la producción de etileno (Cruz Hernández y Litz, 1997).

Finalmente, está aún por explorar el potencial genético para la mejora del mango a partir de las especies filogenéticamente emparentadas con el mismo, para obtener una posible resistencia a plagas, enfermedades y adaptaciones especiales a condiciones ambientales desfavorables (Galán, 1999).

#### **4.9. Marcadores genéticos en mango**

Entre los marcadores genéticos se pueden mencionar a los morfológicos, los bioquímicos (isoenzimas) y los moleculares (ADN y ARN). Estos marcadores generalmente

su utilizan para la discriminación y clasificación de genotipos, debido a que detectan diferencias entre los organismos de una especie o poblaciones (Valadez y Kahl, 2000).

En varios países se han realizado estudios en mango con marcadores genéticos: morfológicos, físico-químicos, bioquímicos y moleculares. La caracterización e identificación tradicional de variedades se ha basado en el empleo básicamente de caracteres morfológicos y físicoquímicos, aunque el uso de estos marcadores en plantas tiene muchas limitantes, debido a que su expresión puede estar sujeta a factores ambientales o fenológicos y, frecuentemente, deben evaluarse a nivel de toda la planta y en estado adulto. Gracias al avance en la biología molecular, en muchos casos se han superado las limitaciones de los métodos tradicionales. Los marcadores moleculares son fenotípicamente neutros y pueden ser evaluados desde los primeros estadios de desarrollo de las plántulas, son aplicables a cualquier tipo de material vegetal independientes de la época del año en que se realice el análisis. Entre los marcadores moleculares utilizados se incluyen proteínas (isoenzimas) y marcadores de ADN o ARN.

Existen cientos a miles de variedades de mango en el mundo, de las cuales entre 25 y 40 son comercialmente importantes (Chadha y Pal, 1986). Algunas variedades comerciales han sido identificadas por características como la base de las hojas, de la panícula, de los frutos y de la semilla; sin embargo, estas características pueden variar de acuerdo a las condiciones ambientales. La identificación de algunas variedades de mango aún se cuestiona, debido a que algunas variedades similares crecen en diferentes regiones y a menudo se les dan diferentes nombres (Lakshminarayana, 1980). La clasificación de mango está fragmentada y las investigaciones con marcadores genéticos continúan aportando información para el

agrupamiento de las variedades. Por ello, la identificación de las variedades mediante marcadores genéticos es muy útil (Vasanthaia *et al.*, 2007).

Los marcadores morfológicos en mango han sido extensamente utilizados para la clasificación taxonómica desde 1953 (Mukherjee, 1953a), utilizándose una gran cantidad de caracteres. Kostermans y Bompard (1993) han contribuido también a la clasificación. Sin embargo, el uso de marcadores moleculares ha revelado que la clasificación actual es inconsistente (Schnell y Knight jr., 1993; Eiadthong *et al.*, 1999c; Yonemori *et al.*, 2002). Los estudios para la identificación y la evaluación de la diversidad morfológica de variedades de mango son escasos, recientemente se han evaluado características morfológicas, morfoanatómicas y físico-químicas de frutos, semillas y hojas (Cuadro 5, Anexo B).

La investigación con marcadores moleculares en mango inició a partir de 1981 con estudios realizados con sistemas isoenzimáticos y continúa hasta la actualidad incluyendo marcadores RAPD, SSR, ISSR y AFLP. Gracias a estas aportaciones, se ha logrado avanzar en varias líneas de investigación en mango, como la caracterización e identificación de variedades e híbridos en la búsqueda continua de nuevas variedades que puedan presentar características deseables de calidad y un potencial comercial; en la resolución de taxonomías o filogenias para determinar la variabilidad o similitud en las relaciones genéticas entre especies del género *Mangifera* relacionadas muy estrechamente o entre variedades de mango (dado que existen variedades que se desarrollan en diferentes áreas y reciben nombres diferentes); se han podido agrupar variedades de acuerdo a su origen geográfico; se ha logrado la construcción de mapas genéticos en mango con selección asistida por marcadores; se han realizado también estudios de evolución, debido a la capacidad de los marcadores moleculares de detectar

polimorfismos en el ADN codificante y el ADN mitocondrial (generando huellas genéticas y demostrando diversidad entre variedades; por último, los marcadores genéticos han sido útiles también en la identificación de plántulas cigóticas y nucelares en mango (Ver Anexo B). Existen varios estudios en mango que combinan el uso de varios marcadores morfológicos y físico-químicos con moleculares o de marcadores moleculares con moleculares.

Se encontraron disponibles un total de 116 publicaciones en mango con marcadores genéticos, que se resumen en el Cuadro 5 (Anexo B).

Cuadro 5. Resumen de estudios publicados con marcadores genéticos en mango.

	Marcador									
	Morfo-anatómicos	Físico-químicos	Isoenzimas	RFLP	RAPD	SSR	ISSR	AFLP	ITS	Mapeo de linajes y QTL
<b>Periodo de estudio</b>	1953-2012	2006-2012	1981-2012	1999-2003	1993-2012	1995-2012	2002-2012	1999-2012	2002-2011	2000-2004
<b>No de citas*</b>	4	6	21	2	31	17	15	15	2	3
<b>Porcentaje (%)</b>	3.4	5.17	18.1	1.72	26.72	14.65	12.93	12.93	1.72	2.58

\*se refiere al número de citas del Anexo B y a los estudios taxonómicos en la construcción de la clasificación de mango.

#### 4.9.1. Isoenzimas

En la década de los 60's del siglo pasado, el uso de la técnica de isoenzimas proporcionó una rica fuente de marcadores genéticos. Las isoenzimas – una enzima que presenta varias formas moleculares en un mismo organismo –, son marcadores codominantes y, por lo tanto, proporcionan mucha información acerca de los patrones de transmisión genética. El análisis de la diversidad genética en muchas especies está basado en la medición de variaciones de diferentes proteínas. Este análisis se basa en las diferencias en la carga eléctrica, el peso

molecular o la conformación espacial de una enzima. Como consecuencia de estas diferencias, las proteínas presentan movilidad diferente dentro de una matriz porosa cuando es aplicado un campo eléctrico, generalmente en un gel de almidón o acrilamida (electroforesis) y las diferentes formas de la enzima pueden ser visualizadas como bandas en el gel, donde cada banda representa la expresión de diferentes alelos de un gen. La desventaja de la electroforesis de proteínas es el hecho de que sólo detecta una porción, quizás menos de la tercera parte de la variación genética existente (Gray, 1997). En años recientes, el polimorfismo de enzimas ha sido utilizado exitosamente para identificar variedades en diversas especies frutales. Sin embargo, las isoenzimas también pueden ser afectadas por el estado de desarrollo y los tejidos que se utilizan para la extracción (Feret y Bergmann, 1976). En mango se han realizado varios estudios utilizando sistemas enzimáticos (Cuadro 5, Anexo B).

El uso de sistemas enzimáticos polimórficos para identificar plántulas cigóticas se basa en el hecho de que las plántulas nucelares deberían tener el mismo alelo enzimático que el del parental materno. Una variación en un locus codificante para una enzima indica que las plantas son originadas por reproducción sexual. Las plántulas cigóticas surgidas a partir de autopolinización se distinguen de las nucelares por ser homocigóticas a uno o más *loci* a los cuales el progenitor hembra es heterocigótico (Degani *et al.*, 1990 y 1992; Schnell y Knight Jr., 1992; Aron *et al.*, 1997). Un fenotipo heterocigótico puede resultar de tres circunstancias genéticas: a) diferentes alelos están presentes en cada locus (aa – AA), b) ambos *loci* son heterocigóticos (Aa – Aa), segregándose independientemente en una etapa dihíbrida y c) sólo un locus es heterocigótico (Aron *et al.*, 1997).

#### ***4.9.2. Marcadores de ADN***

A partir de la década de los 80's del siglo pasado se comenzaron a usar nuevas técnicas de marcadores moleculares. Los marcadores de ADN son secuencias genómicas localizadas en un mismo locus pero que difieren en su secuencia de bases nitrogenadas. Estas variaciones son consecuencia de varios eventos de mutaciones que se manifiestan en los genomas que se comparan. Actualmente, es posible la estimación de la variabilidad con técnicas que presentan ventajas sobre la técnica de análisis de isoenzimas, debido a que pueden detectar polimorfismos en el ADN codificante y el ADN mitocondrial, dependiendo de la prueba. El contenido de ADN de las plantas superiores es altamente variable (Litz y Gómez-Lim, 2005).

Debido a su alto nivel de polimorfismo, los marcadores de ADN han sido utilizados más extensamente que los de proteínas (Litz y Gómez-Lim, 2005).

#### ***4.9.3. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) o Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción***

La primera técnica basada en la hibridación es el RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism/ polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción), técnica que se utiliza para detectar mutaciones en los genomas. Esta tecnología expresa diferencias en sitios específicos del ADN que son reconocidos por enzimas de restricción particulares (endonucleasas). Cada una de las numerosas endonucleasas, cuyo origen es bacteriano, reconocen y cortan solamente una secuencia específica de bases nitrogenadas en el ADN,

siempre y cuando éstas no estén protegidas (metiladas). Si la adenina o citosina en esta secuencia estuvieran metiladas, entonces el corte no podría realizarse por la enzima involucrada. Cualquier otro ADN que no estuviera metilado podría ser reconocido y cortado en fragmentos de longitud definida, y cualquier mutación dentro de estos sitios podría cambiar el patrón de los fragmentos obtenidos y permitir que se detecte en un ensayo de RFLP (Valadez y Kahl, 2000).

Para la detección de los RFLPs, en primer lugar es necesario aislar el ADN del organismo de interés, purificarlo y cortarlo con una o más endonucleasas de restricción. Los fragmentos resultantes se separan en un gel de agarosa por electroforesis y se transfieren a una membrana de nailon o nitrocelulosa para el análisis de hibridación por Southern blot (Karp y Keith, 1997). La subsecuente hibridación con alguna sonda marcada y la detección con autorradiografía, luminografía o quimioluminiscencia (dependiendo del tipo de marcaje) hará visible un fragmento o fragmentos específicos de ADN, que puede ser comparado con el fragmento resultante de otros genomas tratados de la misma forma (Valadez y Kahl, 2000).

Sin embargo, este método es más complejo y requiere una gran cantidad de ADN (Kimberling *et al.*, 1996; Gomes *et al.*, 1998). Los RFLP o VNTRs – Variable Number Tandem Repeats (número variable de repeticiones en tándem) o una combinación de ambas técnicas han sido recientemente utilizadas en la identificación de variedades, aunque han presentado algunas desventajas, como un número limitado de loci de isoenzimas, un tiempo de análisis prolongado, altos costos y el uso de [<sup>32</sup>P] para etiquetar las sondas. Generalmente, los RFLPs sirven como marcadores moleculares utilizados en la construcción de mapas genéticos con selección asistida por marcadores, para la clonación de genes basados en mapas, para la



identificación de variedades o para resolver taxonomías o filogenias (Vasanthaia *et al.*, 2007). En mango sólo el 1.72% de los trabajos se ha basado en el uso de RFLPs (Cuadro 5, Anexo B).

#### ***4.9.4. Marcadores RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA) o Amplificación aleatoria del ADN polimórfico***

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR – Polymerase Chain Reaction) ha sido utilizada en varios cultivos (Vasanthaia *et al.*, 2007). La PCR está basada en la síntesis de millones de copias de un fragmento de ADN comprendido entre secuencias complementarias a dos oligonucleótidos llamados iniciadores (o cebadores o imprimadores). Este proceso es realizado por una enzima ADN polimerasa termoestable (temp. óptima 94 °C, resiste 96 °C durante 40 a 50 min) (Aravanopoulos, 2003; Picca *et al.*, 2004).

La tecnología de la PCR ha llevado al desarrollo de varias técnicas basadas en la amplificación selectiva de ADN. Una de estas técnicas son los marcadores RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA o ADN polimórfico amplificado aleatoriamente), desarrollada independientemente por dos laboratorios (Welsh y McClelland, 1990 y Williams *et al.*, 1990), los cuales detectan secuencias polimórficas de nucleótidos de ADN, utilizando primers o cebadores de una secuencia arbitraria de nucleótidos. El protocolo es relativamente sencillo y usa fluorescencia en lugar de radioactividad (Vasanthaia *et al.*, 2007).

Mediante la PCR, el ADN es amplificado utilizando cebadores de una longitud de diez pares de bases con una secuencia aleatoria (decámero). El pequeño tamaño del cebador y una temperatura de hibridación baja permiten un amplio espectro de reconocimiento en el ADN

molde (sin necesidad de un conocimiento previo de la secuencia de nucleótidos), de forma que se genere un patrón de bandas múltiple más que un producto único (el resultado de una reacción de PCR clásica). Posteriormente, los fragmentos de ADN son separados según su movilidad electroforética y visualizados en un gel de agarosa o poliacrilamida (Williams *et al.*, 1990). Las diferencias en el patrón de bandas detectadas evidencia diferencias en la secuencia de bases para un determinado genotipo, por lo que diferentes individuos deberían presentar patrones de bandas diferentes (Picca *et al.*, 2004).

Esta técnica tiene un valor potencial para la caracterización de germoplasma y la identificación de variedades. Además, ha contribuido, junto a otros marcadores, al desarrollo de mapas de ligamiento molecular para su uso en análisis de *loci* de caracteres cuantitativos (QTLs) en algunos géneros (*Musa*, *Citrus* y papaya) (Deqiu *et al.*, 1997).

Existen varios estudios sobre el uso de marcadores moleculares RAPDs con propuestas taxonómicas en mango para determinar relaciones genéticas entre especies del género *Mangifera* o entre variedades de mango. En la especie *M. indica* los RAPDs son los marcadores más utilizados (26.72%) (Cuadro 5, Anexo B). Este método se ha aplicado exitosamente también en otros diversos vegetales (Striem *et al.*, 1996; Iannelli *et al.*, 1998; Huff *et al.*, 1998; Espinoza *et al.*, 2002; Ghasemi, 2005; Nageswara *et al.*, 2005) y animales: artiodáctilos (Kostia *et al.*, 1996); roedores (Gordon *et al.*, 1998); anfibios (Kimberling *et al.*, 1996) y peces (Gomes *et al.*, 1998). La técnica de RAPD presenta ventajas sobre la electroforesis de isoenzimas, ya que genera un número mayor de datos interesantes para los análisis genéticos.

#### ***4.9.5. Marcadores SSRs (Short Sequence Repeats) o Secuencia simples repetidas o Microsatélites***

Los microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR, Short Sequence Repeats) son utilizados como una herramienta versátil en programas de mejora de plantas, así como en estudios de evolución, debido a su capacidad para demostrar diversidad entre variedades (Adato *et al.*, 1995; Mhameed *et al.*, 1996; Levi y Rowland, 1997).

La técnica de SSRs, también conocida como microsateles, minisatélites o VNTR (Repeticiones en Tandem de Número Variable), es un eficiente uso de un tipo de marcador molecular basado en secuencias cortas repetidas de ADN (2-6 nucleotidos). Estas secuencias repetidas son altamente polimórficas aún entre variedades estrechamente relacionadas, debido a mutaciones que causan variaciones en el número de unidades repetidas. Los SSR son altamente discriminantes y son generalmente utilizados para distinguir variedades, e incluso individuos, y revelan parentesco e identidad (Brown *et al.*, 1996). Estos marcadores SSR han aportado extensamente en el mapeo de genomas en mango (Vasanthaia *et al.*, 2007) (Cuadro 5, Anexo B).

#### ***4.9.6. Marcadores ISSR (Inter secuencias simples repetidas)***

Los inter-SSR son una variante de la técnica RAPD, aunque probablemente son más rigurosos que ésta debido a la alta temperatura de hibridación (Robinson y Harris, 2000). La amplificación ISSR es una técnica que puede diferenciar rápidamente individuos relacionados estrechamente. Involucran la amplificación por la PCR del ADN usando un único cebador compuesto de una secuencia de microsatélite, anclado al extremo 3' ó 5' por 2-4 nucleótidos

arbitrarios y a menudo degenerados. Acoplada con la separación de los productos de amplificación en geles de poliacrilamida, la amplificación ISSR puede revelar muchos más fragmentos por cebador que los RAPDs (Deqiu *et al.*, 1997).

Los marcadores ISSR tiene varias ventajas: generan grandes cantidades de bandas, por lo cual pueden distinguir ejemplares muy estrechamente relacionados más confiablemente que otras técnicas, y son menos caros que RFLP ó RAPD (Deqiu *et al.*, 1997). En el 12.93% de los estudios en mango han empleado este tipo de marcadores (Cuadro 5, Anexo B).

#### ***4.9.7. Marcadores AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms) o Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados***

La técnica de AFLP fue desarrollada por Vos y colaboradores (1995), es una técnica que combina PCR y análisis de fragmentos de restricción para detectar polimorfismos debidos a cambios en, o cerca de, sitios de reconocimiento para enzimas de restricción (Picca *et al.*, 2004). La técnica detecta múltiples *loci* polimórficos a través del genoma, debido a que involucra dos enzimas de restricción, se realizan ligamientos de adaptadores en ambos extremos y ocurre amplificación de segmentos de ADN con iniciadores específicos, diseñados tomando en cuenta las secuencias de los sitios de restricción de las enzimas y de los adaptadores empleados (Vos *et al.*, 1995, Sánchez-Teyer *et al.*, 2003, Sánchez-Chiang y Jiménez, 2009). Una vez que los fragmentos se amplifican pueden ser visualizados en un gel de poliacridamida (Vos *et al.*, 1995).

Los AFLP Son útiles para generar huellas genéticas o para mapeo. Las ventajas que ofrece este método son confiabilidad y consistencia, debido a las condiciones de alta astringencia bajo las cuales se llevan a cabo las reacciones de PCR y la capacidad de detectar rápidamente muchos *loci* polimórficos (Simpson, 1997) y por lo tanto, variabilidad genética debido a que exploran simultáneamente la presencia o ausencia de los sitios de restricción, como en los RFLPs, y la existencia o ausencia de amplificación, como en los RAPDs. Este marcador dominante es una herramienta mucho más poderosa que los RAPDs porque permite amplificar secuencias más largas de oligonucleótidos, lo que incrementa significativamente la especificidad y reproducibilidad. Tampoco en este caso se requiere información previa de la secuencia de ADN (Picca *et al.*, 2004; Azofeifa-Delgado, 2006).

El 12.93% de los estudios ha abordado distintas temáticas mediante marcadores moleculares AFLPs (Cuadro 5), las cuales incluyen estudios de caracterización, identificación y diversidad genética de variedades, cruces e híbridos; relaciones filogenéticas de variedades de importancia comercial y de uso como portainjertos, así como identificación de variedades de acuerdo a su origen geográfico (Ver Anexo B). Existen pocos estudios con marcadores moleculares enfocados a la detección de plántulas de origen cigótico y nucelar: en la revisión realizada, de los 116 trabajos sólo se encontraron 13 con esta característica, siete de los cuales se desarrollaron mediante sistemas isoenzimáticos (Gazit y Knight, 1989; Schnell y Knight Jr., 1991 y 1992; Degani, *et al.*, 1993; Truscott, *et al.*, 1993; Schnell, *et al.*, 1994; Karibasappa, 1995), tres con marcadores moleculares RAPDs (Rocha-Cordeiro *et al.*, 2006; Manchekar, 2008; Martínez-Ochoa, 2010); un estudio con marcadores SSRs (Eiadthong *et al.*, 1999b); uno con ISSRs (González *et al.*, 2002) y uno con AFLPs y QTLs (Kashkush *et al.*, 2001). En

algunos de los casos no fue posible la identificación de variedades de tipo poliembriónico de las monoembriónicas (Eiadthong *et al.*, 1999b). En el presente estudio, uno de los objetivos es determinar el origen cigótico o nucelar de plántulas de mango de las variedades poliembriónicas ‘Manila’ y ‘Ataulfo mediante marcadores moleculares AFLPs.

#### **4.9.8. ITS (*International Transcribed Spacer, espaciadores internos transcritos*)**

Para el estudio genético comparativo de los organismos, en especial si se desea conocer un fragmento en específico y su secuencia, uno de los estudios que se pueden realizar es el empleo de regiones ITS (*International Transcribed Spacer, espaciadores internos transcritos*), como marcadores que varían entre cada especie. Los ITS se enfocan en los ribosomas, en donde el ARN es traducido a proteínas. Los ribosomas están compuestos de ARNr y proteínas ribosómicas. Cada ribosoma está formado por dos subunidades (mayor y menor). Su estructura, tanto en procariontes como en eucariontes, es similar y su tamaño se mide por unidades S (Svedberg), que corresponde a la velocidad de sedimentación de las partículas. Difieren en la composición de las bases de ARNr. Los procariontes poseen ribosomas 70S, constituidos de una subunidad pequeña 30S y otra 50S. La subunidad 50S está formada de 34 proteínas y dos tipos de moléculas de rARNARNr: 5S y 23S. La subunidad 30S consiste de 21 proteínas y ARN ribosómico 16S (Paniagua y Martín de Serrano, 2003; Sánchez, 2003). Los eucariotas tienen ribosomas 80S, con una subunidad 40S y otra 60S. La subunidad menor está formada por 33 proteínas y un ARNr 18S. La subunidad 60S consiste de 49 proteínas y tres tipos de moléculas de ARNr: 5S, 5.8 y 28S (Paniagua *et al.*, 2003; Sánchez, 2003).

En la mayoría de los organismos, las secuencias de ADN que codifican el ARNr son conocidas como ADNr. Además el ADNr está organizado como una unidad que se repite en tándem (una tras otra) en el genoma. Cada unidad repetida consiste de tres genes de ARNr: el gen que codifica para el ARNr 18S, el gen para el ARNr 5.8 y el gen para el ARNr 28S . Además, en cada unidad los genes están separados por dos secuencias espaciadoras internas nucleotídicas de 250 a 300 nucleótidos, denominadas ITS1 e ITS2. El ITS1 se ubica entre el gen que codifica el ARNr 18S y el gen que codifica al ARNr 5.8S, mientras que el ITS2 se encuentra entre los genes de los ARNr 5.8S y 28S. Estas secuencias ITS, aunque son transcritas, no son codificantes. Cada unidad de ADNr se encuentra separada por un espaciador intergénico IGS (Inter Genic Spacer) (Soltis y Soltis, 1999) o espaciador no transcrito (NTS), con dos regiones no codificadoras, los espaciadores externos transcritos ETS1 y ETS2. Mientras la secuencia de los genes ribosomales es muy conservada entre las especies, las secuencias para las regiones espaciadoras no codificantes, ITS e IGS, pueden variar sustancialmente aún entre las especies cercanamente relacionadas, debido a la ausencia de presión selectiva sobre las mismas. Por ello, pueden ser útiles para la comparación de especímenes dentro de un género o dentro de una especie (Stouthamer, 2007). Generalmente las diferencias en estas secuencias son escasas, aunque esta condición imposibilita la secuenciación directa de las regiones ITS. Otra característica interesante es que las copias de las regiones ITS frecuentemente difieren en el número de repeticiones de microsatélites (SSR) encontrados en sus secuencias. Esto hace que las secuencias difieran en tamaño (de menos de 300 a más de 1000 nucleótidos) entre diferentes especies, lo que también puede ser usado como un marcador molecular de región nuclear (Stouthamer, 2007). Para ello se requeriría la amplificación de estas regiones con primers específicos para regiones conservadas de los

genes ADNr flanqueantes y la determinación del tamaño del producto amplificado en un gel. Como marcadores moleculares podrían también ser usados para evidenciar mutaciones puntuales. Técnicas como RFLP-ITS o PCR-RFLP, permiten asimismo caracterizar por RFLP la región ITS de un organismo (Scholötterer, 2001).

#### **4.9.9. QTL, Mapeo de linajes**

Un importante avance en las últimas décadas en la genética cuantitativa fue la posibilidad de identificar regiones de un genoma responsables de la variación de caracteres mediante el uso de los marcadores moleculares. Los linajes genéticos y mapeos de loci de expresión de caracteres cuantitativos - QTL (Quantitative Trait Loci) han involucrado grandes volúmenes de datos y permiten localizar genes que controlan caracteres de interés agronómico, como resistencia a enfermedades, que pueden ser utilizados en mejora genética por selección asistida de marcadores y en clonación, con base en el mapeo fino de un gen. El término QTL se refiere a los poligenes subyacentes a un rasgo cuantitativo. En genética, la distancia entre genes dentro de un genoma es valorada sobre las bases de la frecuencia de recombinación de genes estimada del resultado de los genotipos de la progenie o de una cruce (Kearsey y Pooni, 1996). El mapeo de caracteres cuantitativos es complicado, debido a que el genotipo nunca se infiere de forma inequívoca del fenotipo (Vasanthaia *et al.*, 2007).

Estos estudios incluyen detalles de linajes, genotipos y datos de rasgos, los cuales deben ser combinados en diferentes formas según los matices de cada programa de análisis. Tales experimentos frecuentemente requieren de la colaboración de varios grupos que comparten



datos. Existen varios buenos software de análisis estadístico de datos genómicos, como MapMaker, para construcción de mapas de linajes, o MapMaker/QTL, para mapeo de intervalos para experimentos de cruces y otros (Vasanthaia *et al.*, 2007).

Debido a que los QTL pueden aparecer en la totalidad del genoma, se requiere un gran número de marcadores para poder localizarlos. La base de la detección de todos los QTL es el análisis estadístico. Sin embargo, un QTL detectado por cualquier técnica no es un gen verdadero, solamente indica la región del genoma que contiene más genes parecidos para un carácter bajo estudio, como por ejemplo latencia (Vasanthaia *et al.*, 2007).

Con el desarrollo de éstas y otras técnicas de biología molecular se ha avanzado notablemente en la investigación de mango, utilizando proteínas y marcadores moleculares de ADN en la determinación de la diversidad y las relaciones filogenéticas de algunas variedades de mango y comparándolas con los métodos basados en taxonomía clásica, análisis de relaciones genéticas de especies de mango, identificación de variedades monoembriónicos y poliembriónicos, estimación de la diversidad genética de mangos de tipo comercial, determinación del origen geográfico de diversas variedades, reconocimiento del origen híbrido de algunas variedades, la realización de mapas genéticos (QTLs), la selección de variedades resistentes a algún patógeno, caracterización de plántulas con polinización cruzada, identificación de genes de interés comercial, diferenciación de embriones nucleares y cigóticos en variedades poliembriónicas y creación de variantes en variedades obtenidos mediante cultivo *in vitro*.

## 5. DESCRIPCIÓN DEL SITIO DE COLECTA

Las muestras se colectaron en la huerta La Pedregosa, localizada en el municipio de El Rosario, Sinaloa, México. El estado de Sinaloa comprende 18 municipios y cuenta con una superficie de 58.328 km<sup>2</sup>. Sinaloa se ubica al noroeste de México, entre los 22°30'40'' y los 27°02'42'' de latitud norte y los 105°23'20'' y 109°28'48'' de longitud oeste. Al norte colinda con los estados de Sonora y Chihuahua, al sur con Nayarit, al este con Durango y al Oeste con las aguas del Golfo de California y el Océano Pacífico (Fig. 6A).

La variabilidad climática del estado de Sinaloa está determinada por su ubicación entre las zonas subtropical e intertropical, su cercanía con el Océano Pacífico y una altitud que va desde la planicie costera hasta las estribaciones de la Sierra Madre Occidental, donde se reportan alturas de 2,510 msnm. Estos factores propician variaciones de diversos tipos climatológicos que van desde el clima seco y semiseco en la llanura costera hasta el templado y semicálido subhúmedo en la sierra, distribuidos en una franja orientada en dirección noreste-sureste. (Sistema de Köppen, modificado por García, 1973). El clima cálido subhúmedo, con lluvias en verano, ocupa el 36% de la entidad (Fig. 6B) (Flores-Campaña *et al.*, 2012).

La temperatura media en la mayor parte del territorio de Sinaloa es de 24 °C. En la región existen zonas con temperaturas medias de 26 °C, localizadas al sur en los municipios de Escuinapa y parte de El Rosario, y al norte, dentro del municipio de El Fuerte. En las proporciones de la Sierra Madre Occidental, hacia los límites con Chihuahua y Durango se observan las menores temperaturas medias, las cuales están asociadas con los sitios de mayor altitud, con temperaturas que van de 14 a 22 °C (Fig. 7A) (Flores-Campaña *et al.*, 2012).

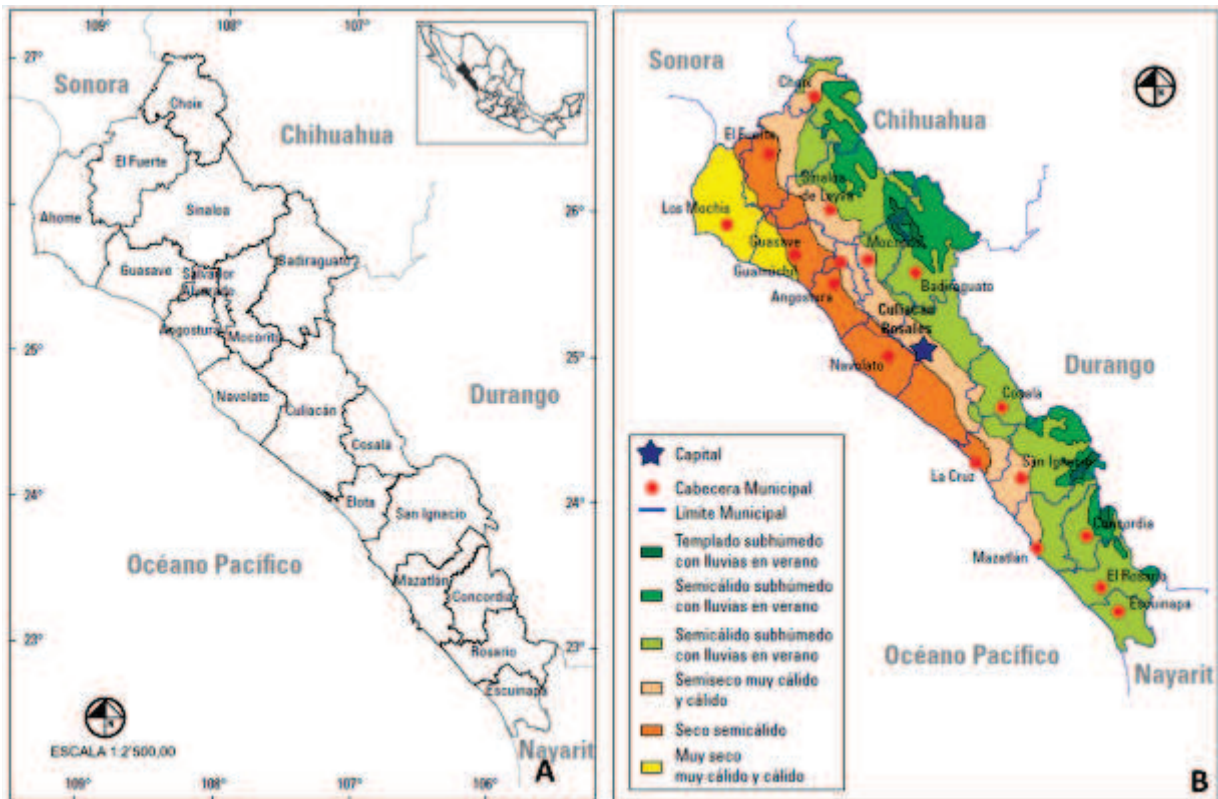


Figura 6. A) Localización del estado de Sinaloa, México. Fuente: Gobierno del estado de México; B) Tipos de clima. Fuente: INEGI (2011a), modificado de Flores-Campaña *et al.*, 2012.

La precipitación ocurre de manera irregular en el territorio. Los valores pluviométricos aumentan de norte a sur y conforme se asciende de la costa a la sierra. En las porciones del noreste y centro, las lluvias van de 200 a 700 mm, mientras que en la porción sureste sobrepasan los 1000 a 1500 mm (Fig. 7B) (Flores-Campaña *et al.*, 2012).

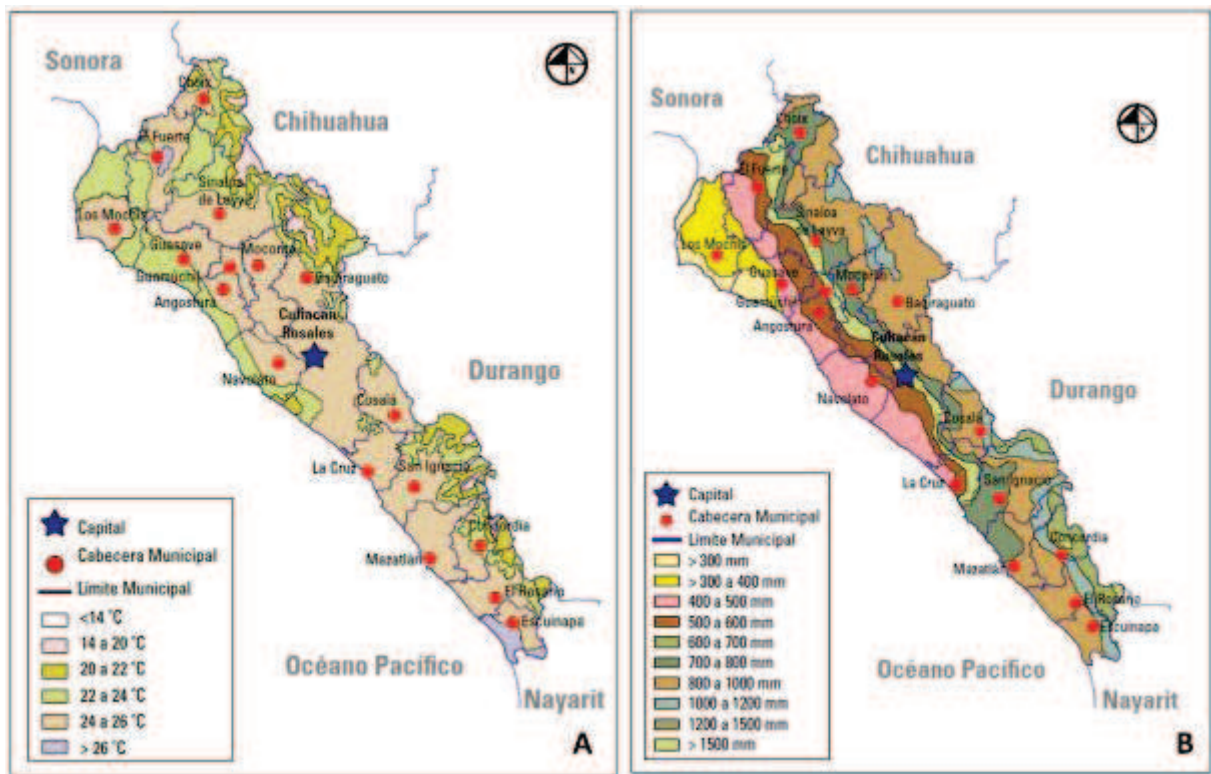


Figura 7. Mapas de Sinaloa. A) Temperatura media anual; B). Precipitación promedio anual. Fuente: INEGI, 2011b y c, modificado de Flores-Campaña *et al.*, 2012.

La variación de temperatura estacional, en el caso del valle de Culiacán (Estación Meteorológica de la Escuela de Biología, Universidad Autónoma de Sinaloa) oscila de  $20.6^{\circ}\text{C}$  en enero a  $30.5^{\circ}\text{C}$  en julio, con un promedio anual de  $25.9^{\circ}\text{C}$  durante el periodo de 1995-2010 (Fig. 8A) (Flores-Campaña *et al.*, 2012).

La irregular distribución de las lluvias también se observa a lo largo del año. La precipitación media mensual en el valle de Culiacán durante 1995-2010 osciló de 1.1 mm en marzo a los 219.9 mm en agosto. Los meses de baja precipitación fueron marzo, abril y mayo; mientras que en julio, agosto y septiembre se registro el 81.7% de la precipitación total anual

(Fig. 8B). La precipitación pluvial más alta durante este periodo fue de 1,054.4 mm en el año 2004 (Flores-Campaña *et al.*, 2012).

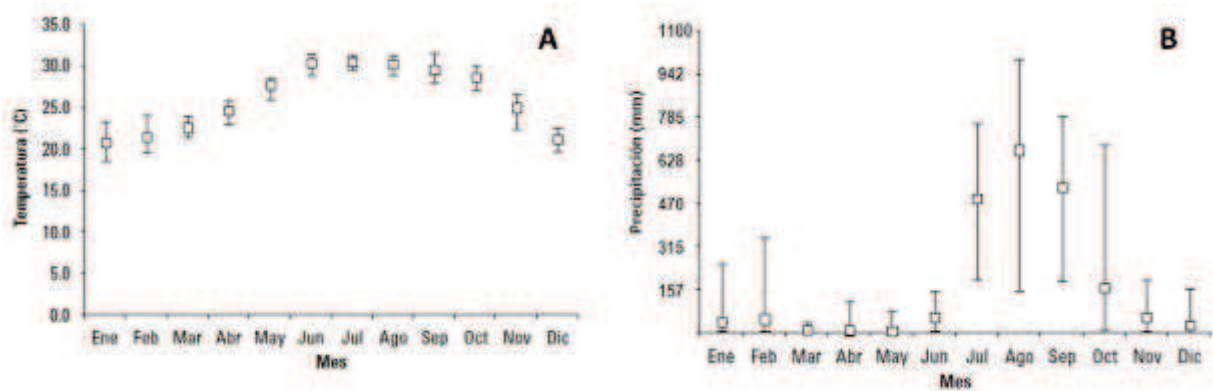


Figura 8. A) Temperatura media mensual; B) Precipitación media mensual. Promedios ( $\square$ ), con valores mínimos y máximos (-), durante 1995-2010 en Culiacán, Sinaloa. Datos: Estación Meteorológica de la Escuela de Biología, Universidad Autónoma de Sinaloa. Modificado de Flores-Campaña *et al.*, 2012.

El municipio de El Rosario se localiza al sur del estado de Sinaloa, entre los  $105^{\circ} 11' 16''$  y  $106^{\circ} 03' 02''$  longitud oeste y entre los  $22^{\circ} 47' 35''$  y  $25^{\circ} 30' 00''$  latitud norte. Colinda al norte con los municipios de Mazatlán, Concordia y el estado de Durango, al este con los estados de Durango y Nayarit, al sur con el municipio de Escuinapa y el Oeste con el Océano Pacífico (Fig. 6a y 9a). El Rosario tiene una extensión de  $2,723.28 \text{ km}^2$ , que representa el 4.7% de la superficie total del estado de Sinaloa (Fig. 9b).

La huerta La Pedregosa se encuentra ubicada en el entronque de las carreteras El Rosario (km 13) y Agua Verde, a 2.5 km del poblado El Matadero entre los  $105^{\circ} 93' 65''$  longitud oeste y  $22^{\circ} 95' 53''$  latitud norte.

La Pedregosa tiene una dimensión de 70 hectáreas, con 360 árboles por hectárea, los árboles tienen entre 25 y 30 años de edad y una altura de 8 a 10 m (Fig. 9c y 9d). En la huerta se cultiva mango de las variedades ‘Manila’, ‘Átaulfo’, ‘Haden’, ‘Kent’, ‘Keitt’, ‘Kit’ y ‘Tommy Atkins’. La producción de fruta por hectárea al año es de 30 a 40 toneladas. La huerta recibe un manejo convencional, es decir, poda y aplicación de fertilizantes y fungicidas periódicamente, y el sistema de riego es por goteo.

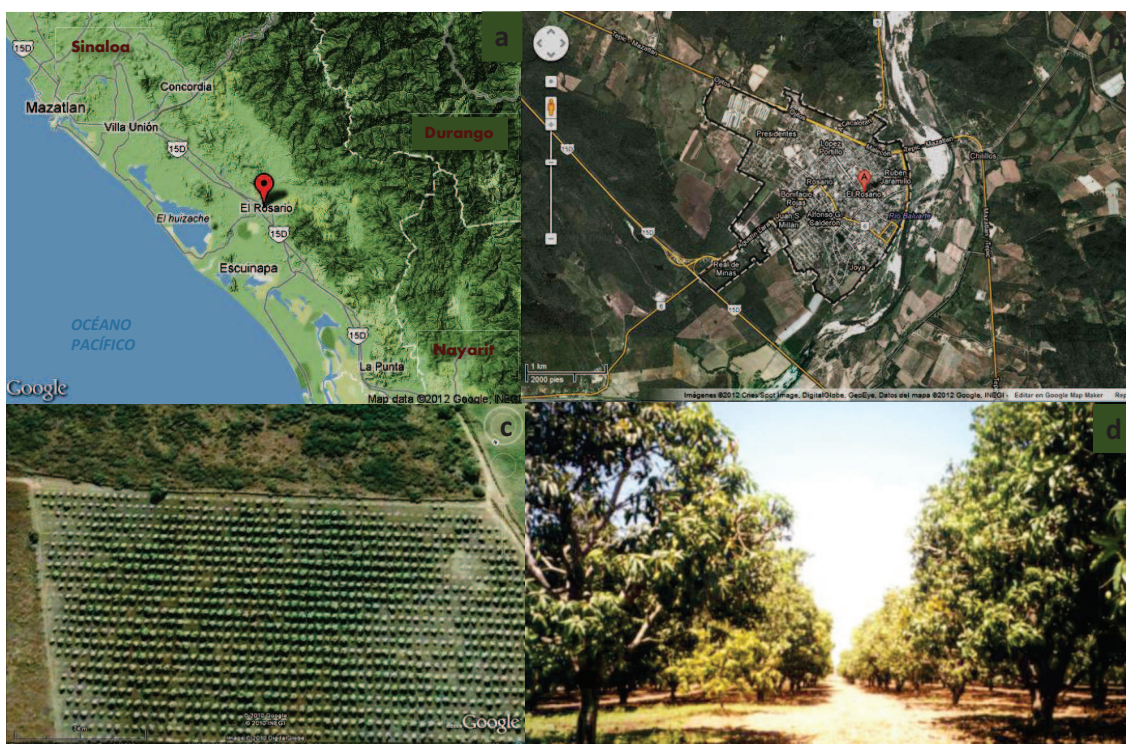


Figura 9. a) Municipio El Rosario, Sinaloa, México; b) fotografía aérea del Municipio de El Rosario (Map data Google 2012, INEGI); c) huerta La Pedregosa; d) árboles de mango en la huerta La Pedregosa.

Las condiciones ambientales en la huerta La Pedregosa se presentan en el cuadro 6.

Cuadro 6. Condiciones edáficas y climáticas en la huerta La Predregosa y en El Rosario, Sinaloa, Méx.

<b>Suelo</b>			<b>El Rosario</b>
	<b>pH</b>	5.6 – 8.0	
	<b>Salinidad</b> (conductividad eléctrica=[B, Cl, bicarbonatos, Na+, Ca2+, Mg2+])	0.2 - 1.7 miliohm/cm	
	<b>Profundidad</b>	30 - 100 m	
	<b>Textura</b>	Franco arenosa, franco arcillosa y limosa; composición: arcilla: 53.76%, limo: 14.16%, arena: 32.08%.	
<b>Condiciones ambientales</b>	<b>Temperatura</b>	Mínima extrema: 5.5 °C Máxima extrema: 41 °C Mínima - Máxima: 20.75 – 30 °C	Media anual: 20-26 °C
	<b>Precipitación pluvial total anual</b>	954 mm	Media anual: 800-1500 mm
	<b>Evaporación total anual</b>	1787 mm	
<b>Cosecha</b>		Mayo a julio, dependiendo de la variedad*	
Datos proporcionados por los productores de mango: Frutas y Legumbres El Rodeo S.P.R. de R.I. *Guzman <i>et al.</i> , 1993.			Fuente: INEGI, 2011a y b. Datos de 1995 a 2010.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***6.1. Recopilación bibliográfica***

La recopilación bibliográfica se realizó de manera continua durante el desarrollo tanto del trabajo experimental como de la elaboración del documento de tesis.

### ***6.2. Colecta de muestras***

En los meses de junio o julio de 2004 a 2009 se realizaron colectas de hojas y frutos de mango en estado sazón de las variedades ‘Haden’, ‘Manila’ y ‘Ataulfo’ de 10 árboles seleccionados en la huerta La Pedregosa (El Rosario, Sin., México). Se colectaron 11 frutos por árbol, en total 110 frutos de cada variedad cada año. La variedad ‘Ataulfo’ se colectó a partir del año 2005.

### ***6.3. Caracterización físico-química de frutos y semillas***

En los frutos de mango se determinaron los siguientes parámetros para evaluar la calidad y estado de madurez:

a) Textura o firmeza -medida de la resistencia que ofrece el fruto a una fuerza de penetración, expresada en libras-, se midió con un penetrómetro (Mc Cormick, Cia. EFFEGY, USA), en los ‘hombros’ de los frutos de mango, eliminando previamente la cáscara de ambos ‘hombros’.



b) Grados Brix (°Brix) -representan un alto porcentaje de azúcares solubles o en el jugo de la fruta-, se cuantificaron con un refractómetro de campo (Milton Roy Company, Japón), utilizando unas gotas del jugo de la fruta.

c) Color externo, se determinó en porcentaje en relación a la superficie total del fruto.

d) Peso base fresca (PBF) y tamaño (largo/ancho) de frutos, semillas y endocarpos, se determinaron con una balanza granataria (Sartorius BP2100, Max. 2100 g, d= 0.1g, USA) y un vernier.

Una vez que se extrajeron las semillas de los frutos, se cuantificó el número y PBF de embriones en el caso de las variedades poliembriónicas ‘Manila’ y ‘Átaulfo’.

#### ***6.4. Fisiología de la germinación y crecimiento de plántulas de mango***

Las semillas se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 1%, se colocaron en lotes de 16 semillas sobre agrolita estéril con agua a saturación en charolas de plástico de 35 x 30 x 13 cm y se colocaron dentro de una incubadora PRECISION® a temperatura de 25 °C ± 2, fotoperíodo 12/12h luz/oscuridad para su germinación.

Diariamente se observaron cada una de las semillas, retirándolas de la agrolita, considerando una semilla germinada cuando al menos una radícula se hubo elongado. Se tomaron datos para evaluar la capacidad germinación, que se determinó como la proporción de una muestra de semillas germinadas en un determinado período de tiempo, en el caso de

mango, durante 16 días. La capacidad de germinación suele expresarse en porcentaje (%). Se describieron morfológicamente las características de la raíz y parte aérea de las plántulas y se tomaron datos de sobrevivencia.

Otro parámetro evaluado fue el Tiempo Medio de Germinación (TMG) (Ellis y Roberts, 1981; Parisot, 1988, citado por Avilán *et al.*, 1995; Flores *et al.*, 2011), calculado como se muestra en la siguiente fórmula:

$$\text{TMG} = \sum (\text{Dn}) / \sum \text{n}$$

Donde:

n es el número de semillas que germinan en el día D y D es el número de días a partir de la fecha de siembra.

Un parámetro más que se utilizó en este estudio y el cual evalúa el número de semillas germinadas por día y la velocidad de germinación en conjunto es el índice de germinación utilizado por Steinbach *et al.* (1995) y modificado en el caso de mango (en el Laboratorio de Ecofisiología) debido al tiempo de germinación observado:

$$\text{Índice de germinación (IG)} = (16 \times \text{N1}) + (15 \times \text{N2}) + \dots + (1 \times \text{N16})$$

Donde:

N1, N2, ..., N16 son el número de semillas germinadas en el primero, segundo y subsecuentes días hasta el día 16.

16, 15, ..., y 1 son los pesos que se le asignan al número de semillas germinadas durante el primero, segundo y subsecuentes días.

Cuando el epicótilo de las plántulas alcanzó entre 3 y 8 cm se realizó el transplante a macetas, tomando datos de PBF, longitud de la raíz y el epicótilo, así como el número de hojas

de la plántula. Para elaborar las macetas se utilizaron bolsas de plástico para invernadero de 35 x 20 cm, con aproximadamente 2.5 kg de suelo con hojarasca y agrolita en proporción de 5:1 y agua a saturación. Las macetas se colocaron en el laboratorio de Ecofisiología a temperatura ambiente ( $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

Semanalmente se tomaron datos del crecimiento de las plántulas: longitud del epicótilo, longitud de los entrenudos, número de hojas por entrenudo y área foliar.

El área foliar se calculó con la fórmula:

$$A = L \times B \times 0.725$$

Donde:

A = área foliar

L = longitud de la hoja, medida sobre la nervadura central

B = ancho de la hoja, medida sobre la parte media de la hoja

La constante 0.725 se tomó de un estudio realizado en hojas de mango (Taylor, 1970).

Para tener un mejor análisis del crecimiento aéreo de las plántulas, durante 14 semanas se evaluó el crecimiento, utilizando la Tasa de Crecimiento Relativo también conocida por las siglas **RGR** (Relative Growth Rate), que se define como el incremento de biomasa por unidad de biomasa y tiempo (Hunt, 1982; 1990).

La RGR es el método más empleado para evaluar el crecimiento, el enfoque clásico para evaluar la tasa de crecimiento relativo es:  $RGR = \ln P_2 - \ln P_1 / (t_2 - t_1)$ ; siendo  $P_2$  y  $P_1$  el peso de la plántula en los tiempos 2 y 1 ( $t_2$  y  $t_1$ , respectivamente) (Hunt, 1982).

La RGR puede ser factorizada en tres componentes, entonces la fórmula se convierte en el parámetro usado por Tholen y col. (2004) y utilizado en este estudio. Este parámetro evalúa el incremento irreversible de biomasa por unidad de tiempo (días) (Poorter y Garnier, 1996; Hoffmann y Poorter, 2002). La RGR se calculó evaluando promedios de área foliar, peso fresco, peso seco de las hojas y de las plántulas completas en dos tiempos distintos (Cuadro 7), por lo que se requirió de un número relativamente elevado de réplicas.

Se tomaron datos de abscisión de hojas, pérdida de cotiledones y sobrevivencia de plántulas.

Cuadro 7. Parámetros para evaluar la Tasa de Crecimiento Relativo de plántulas de mango (Tholen *et al.*, 2004).

<b>RGR= SLA × LMF × URL</b>	“Relative Growth Rate”, Tasa Relativa de Crecimiento, incremento irreversible de biomasa. Se expresa en mg (planta) g <sup>-1</sup> (planta) d <sup>-1</sup> (tiempo).
<b>SLA= área foliar / masa seca de las hojas</b>	“Specific Leaf Área”, es la relación de área foliar y peso seco de las hojas. Explica la radiación capturada por unidad de hoja. Se expresa en m <sup>2</sup> (hoja) kg <sup>-1</sup> (hoja).
<b>LMF= masa fresca de las hojas / masa fresca de la planta</b>	“Leaf Mass Fraction”, es la relación de biomasa de hojas y la biomasa total de la planta. Expresa la alocaación de biomasa hacia las hojas. Se expresa en g (hoja) g <sup>-1</sup> (planta).
<b>URL = <math>\frac{\ln(\text{área foliar en t2}) - \ln(\text{área foliar en t1})}{\text{Área foliar en t2} - \text{área foliar en t1}}</math></b>	<b><math>\frac{\text{peso seco de la pl en t2} - \text{peso seco de la pl en t1}}{\text{tiempo 2} - \text{tiempo 1}}</math></b>
	“Unit Rate Leaf”. Es el incremento de biomasa por unidad de área foliar por día, llamado también tasa de unidad de hoja. Se expresa en g (planta) m <sup>2</sup> (hoja) d <sup>-1</sup> (tiempo).

### **6.5. Análisis y diseño estadístico**

Los datos de las colectas 2003 a 2009 se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) y prueba de comparación de media de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) utilizando los paquetes estadísticos SPSS ver. 15 y Statistica 7. Las pruebas de correlación entre variables se realizaron utilizando correlaciones de Pearson.

### **6.6. Caracterización morfo-histológica de semillas poliembriónicas y monoembriónicas**

Eventualmente se realizaron cortes de algunas semillas monoembriónicas y poliembriónicas de mango y se procesaron con técnicas histológicas convencionales, como se muestra en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Técnica histológica utilizada para la obtención de cortes de semillas maduras de mango (ver Anexo A) (modificada de Gray, 1964).

- 
- Obtener fracciones de tejido de 0.5 a 1.5 cm<sup>2</sup>.
  - Fijar el material en FAA (Formaldehído-ácido acético-alcohol etílico).
  - Deshidratar los tejidos con soluciones de alcohol terbutílico, alcohol etílico y agua destilada en concentraciones crecientes de alcohol terbutílico.
  - Infiltrar en una estufa a 60 °C los fragmentos de tejido con parafina refinada para histología.
  - Incluir el material en moldes de aluminio con parafina fundida.
  - Polimerizar o solidificar los bloques de parafina a temperatura ambiente.
  - Desmoldar, montar sobre un porta bloques de latón y tallar una pirámide en la base del bloque.
  - Cortar los bloques de parafina en un micrótopo rotatorio (Spencer, American Optical Company. Mod. 820) y obtener laminillas con cortes seriados de 10 a 12 µm de espesor.
  - Desparafinar los cortes con xileno y alcohol etílico en soluciones decrecientes y enjuagar con agua destilada.
  - Teñir con la técnica de contraste para tejidos vegetales Safranina “O” y verde rápido, simultáneamente deshidratar los cortes con alcohol etílico en concentraciones crecientes.
  - Montar las laminillas con resina sintética y dejar secar.
  - Observar las preparaciones histológicas en un microscopio compuesto (Carl Zeiss Axiolab).
-

### **6.7. Extracción y cuantificación de ADN**

Después de tres meses de la fecha de transplante, se tomaron hojas jóvenes y sin nervaduras de plántulas germinadas de embriones de semillas monoembriónicas y poliembriónicas, así como de las plantas parentales. Los trozos de hojas se congelaron con nitrógeno líquido y se maceraron para extraer el ADN. En algunos casos, las muestras de hojas completas o meceradas se almacenaron en ultracongelador a -70 °C.

El método de extracción de ADN consiste de los siguientes principios básicos: 1) ruptura o lisis de las células y estructuras que los contienen; 2) eliminación de contaminantes y de restos de los componentes celulares; 3) precipitación o separación de los ácidos nucleicos de otras macromoléculas; 4) lavado y 5) resuspensión de los ácidos nucleicos.

**1) Lisis celular.** La ruptura de la célula se consigue mediante métodos físicos o químicos. Los métodos físicos involucran el uso de calor, maceración u homogenización con perlas de vidrio. En cuanto a los métodos químicos, se utilizan frecuentemente sales como: NaCl y NaOH; detergentes: dodecil sulfato de sodio (SDS) y lauril sarcosina (sarcosil), y solventes orgánicos: fenol – cloroformo (Farrell, 1988; Rojas y Zavaleta, 2004).

Los solventes orgánicos como el fenol o el cloroformo dañan la membrana celular y la de los organelos, eliminan proteínas y lípidos, además, inactivan nucleasas tales como la ADNasa y la ARNasa y otras macromoléculas aisladas en el proceso de extracción. La integridad de los ácidos nucleicos se consigue, además por la inactivación de las

nucleasas, al mantener la muestra (células o tejidos) sobre hielo o congelándola antes de comenzar el proceso de extracción.

**2) Eliminación de contaminantes.** Una vez que se han lisado las células para la extracción del ADN y éste se ha hecho disponible, es necesario separarlo del resto celular, ya que la calidad y cantidad de este material puede ser modificada por actividad enzimática de nucleasas como ADNasa y ARNasa y de otras macromoléculas que son aisladas simultáneamente durante el proceso de purificación. El problema de las nucleasas se reduce mediante la eliminación de cationes divalentes como el magnesio, que es necesario para la actividad de las mismas. Agentes como el EDTA (ácido etilendiamino-tetracético) y la fenentrolina quelan cationes divalentes como  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , previniendo la actividad de las nucleasas (Farrell, 1988; Valadez y Kahl, 2000; Rojas y Zavaleta, 2004).

La mayoría de las proteínas resultan desnaturalizadas por la acción del fenol (fase orgánica). Tras la centrifugación se forman dos fases: una superior, acuosa, que contiene el ADN y una inferior orgánica. Los restos de proteínas desnaturalizados quedan en la interfase. En la extracción de ADN es importante considerar el pH en este paso, ya que a valores de pH menores a 5 ó 6, el ADN puede ser retenido en la fase orgánica y en la interfase, dejando ARN en la fase acuosa, así que para la extracción se requiere un pH cercano a 8: con este pH tanto el ADN como el ARN son retenidos en la fase acuosa (Maniatis *et al.*, 1982; Farrell, 1988; Rojas y Zavaleta, 2004).

Un reactivo utilizado en varios procedimientos para la extracción de ADN es el bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), el cual se pega fuertemente al ADN, desplaza proteínas y previene la degradación. El CTAB se elimina mediante extracciones con cloroformo y el ADN permanece en la fase acuosa (Valadez y Kahl, 2000; Rojas y Zavaleta, 2004).

- 3) Precipitación o concentración.** Se logra precipitar los ácidos nucleicos con el uso de diferentes alcoholes o la combinación de sales de cationes monovalentes en concentraciones moderadas y etanol a baja temperatura (-20 °C o menos) y son recuperados por centrifugación. El método más ampliamente utilizado en la extracción de ADN es precipitar con etanol en presencia de concentraciones moderadas de cationes monovalentes. El isopropanol en una relación de un volumen puede ser usado en lugar del etanol (dos volúmenes) para precipitar el ADN, con la ventaja de manejar un volumen menor (Maniatis *et al.*, 1982; Wallace, 1987; Rojas y Zavaleta, 2004).
  
- 4) Lavado.** Para eliminar cualquier soluto que se haya quedado en el precipitado, la pastilla con los ácidos nucleicos puede ser lavada con etanol a diferentes concentraciones, regularmente se emplea etanol al 70%, se agita con vórtex y se centrifuga.
  
- 5) Resuspensión.** Los ácidos nucleicos se resuspenden en algún amortiguador de baja astringencia iónica como el TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) o en agua destilada estéril (Farrell, 1988; Rojas y Zavaleta, 2004).



### 6.7.1. Protocolo experimental de extracción de ADN con la técnica estandarizada de sílica

La extracción de ADN de hojas de mango se realizó mediante la técnica de sílica (Echeverría-Machado *et al.*, 2005) que se estandarizó en el Laboratorio de Marcadores Moleculares y Genómica Funcional del CICY a cargo del Dr. L. Felipe Sánchez Teyer y fue modificada para extracción de hojas de mango (Cuadro 9), debido a que no se logró la amplificación del ADN de mango para AFLP por medio de otras técnicas utilizadas previamente. La extracción se realizó con hojas de plántulas de las colectas 2006 a 2009.

Cuadro 9. Extracción de ADN total mediante la técnica estandarizada de sílica (Echeverría Machado *et al.*, 2005, modificado para extracción en mango).

- 
- Tomar 0.5 g de tejido fresco y colocarlo dentro de un tanque con nitrógeno líquido (si el tejido está liofilizado, tomar 0.05 g).
  - Macerar el tejido con nitrógeno líquido en un mortero.
  - Colocar el tejido pulverizado en un tubo Eppendorf de 2 mL y añadir 1 mL de amortiguador de extracción precalentado (100 mM Tris pH = 8, 50 mM EDTA, 500mM NaCl).
  - Añadir 100 µL de β-mercaptoetanol 10 mM.
  - Añadir 100 µL de SDS 20% precalentado, mezclando con agitación vigorosa.
  - Incubar a 65 °C durante 10 min.
  - Adicionar 500 µL de acetato de potasio 5 M frío, agitar vigorosamente.
  - Incubar en hielo durante 20 min.
  - Centrifugar los tubos a 12,000 rpm durante 20 min.
  - Tomar 1.2 mL de sobrenadante (de 200 en 200 µL) y centrifugar a 12,000 rpm durante 5 min.
  - Pasar 1000 µL del sobrenadante a un tubo Eppendorf nuevo y agregar 300 µL de SILICA homogenizada (previamente mezclada suavemente durante 3 a 5 min manualmente).
  - Mezclar durante 5 min.
  - Centrifugar a 12,000 rpm durante 5 min.
  - Desechar el sobrenadante y lavar la pastilla 2 veces con 500 µL de etanol al 70%.
  - Entre cada lavado resuspender la pastilla y centrifugar a 12,000 rpm durante 5 min.
  - Desechar el sobrenadante y dejar secar la pastilla durante 2 h en campana de extracción o toda la noche a temperatura ambiente.  
Resuspender la pastilla en 60 µL de agua milli Q o estéril (pH ajustado a 7.3). NOTA: Ajustar el pH del agua a 7.3 – 7.8 con NaOH si está por debajo de 7, ya que si el pH es muy ácido se desprende también el ARN de la sílica.
  - Incubar a 55 °C durante 5 min y centrifugar a 12,000 rpm durante 2 min.
  - Transferir 50 µL de sobrenadante a un tubo nuevo de 500 µL y almacenar a -20 °C.
-

### 6.8. Concentración, pureza e integridad del ADN

Se realizó este análisis para conocer la calidad y cantidad del ADN (Cuadro 10). Dadas las características fisicoquímicas de la molécula de ADN, éstas pueden absorber luz cuando se encuentran en disolución. Esta propiedad permite aplicar la ecuación de la Ley de Lambert-Beer\*. La concentración de ácidos nucleicos (ng/mL) se calcula multiplicando la absorbancia a 260 nm ( $A_{260}$ ) por el coeficiente de extinción molecular C (medida de la cantidad de luz absorbida por una sustancia a una longitud de onda dada, por unidad de concentración), que en el caso del ADN en solución acuosa es de 50 (Sambrook *et al.*, 1989).

$$*[\text{Ácidos nucleicos}] = A_{260} \times C$$

La calidad o pureza se puede estimar mediante la relación de absorbancia 260/280 nm. Las proteínas por su composición pueden absorber a 280 nm, propiedad dada principalmente por los aminoácidos aromáticos (triptófano, fenilalanina y tirosina). Se considera una pureza alta cuando esta relación es de  $1.8 \pm 0.15$  para ADN y de  $2.0 \pm 0.15$  para ARN. Valores menores indican presencia de proteínas, fenoles u otros compuestos que absorban cerca de 280 nm. La relación 260/280 nm para los ácidos nucleicos depende de la composición de nucleótidos de una determinada muestra, pues los cuatro nucleótidos del ADN presentan una amplia variación de absorbancia (Wilfinger *et al.*, 1997).

La integridad de los ácidos nucleicos se puede conocer mediante electroforesis en geles de agarosa (Cuadro 10). La electroforesis separa las moléculas en una mezcla por aplicación de un campo eléctrico. La separación está basada en que las moléculas de los ácidos nucleicos tienen carga negativa (por los grupos fosfato) y al someterlas al campo eléctrico, migran hacia

el polo positivo de éste a través de la malla polimérica de un gel de agarosa a una velocidad determinada por su relación carga-masa. La agarosa puede separar fragmentos de ácidos nucleicos desde unos pocos cientos hasta 20,000 pares de bases. La concentración de agarosa, el tiempo y el voltaje determinan la resolución de la electroforesis. La visualización posterior se puede realizar mediante tinción con bromuro de etidio, tinción de plata, fluorescencia o radiactividad. De este modo, una muestra degradada presenta un fondo característico de pequeños fragmentos de ácidos nucleicos. En el caso del ADN debe aparecer una sola banda nítida (Wilfinger *et al*, 1997).

Cuadro 10. Análisis de la calidad y cantidad de ADN de mango.

- 
- Aplicar 2  $\mu$ L de ADN extraído de hojas de mango a una electroforesis en un gel de agarosa al 1%, con amortiguador TBE 1X y 0.5 mL de Bromuro de etidio a 80 volts, durante 35 min.
  - Visualizar el gel en un fotodocumentador.
  - Analizar 2  $\mu$ L por medio de espectrofotometría (absorbancia a longitudes de onda de 260 nm y 280 nm) (Thermo Scientific Nano Drop 1000 Spectrophotometer V3.7).
- 

### **6.9. Amplificación de ADN mediante marcadores moleculares AFLPs**

Los AFLP son considerados marcadores moleculares de alta eficiencia que permiten la detección de múltiples fragmentos de restricción de ADN mediante amplificación por PCR. La técnica de AFLP usualmente comprende los siguientes pasos (Fig. 10):

1. **Digestión de ADN con enzimas de restricción.** Este paso involucra la digestión del ADN con dos enzimas específicas de restricción, una de las cuales reconoce una secuencia de seis nucleótidos y otra una secuencia de cuatro (Azofeifa-Delgado, 2006).

2. **Ligación de adaptadores.** Es necesario agregar adaptadores de doble cadena para que éstos se peguen en los bordes de los fragmentos recién formados y proveer una secuencia conocida que sirva para poder realizar la PCR. Los adaptadores pegados actúan, de esta forma, como sitio de unión para los iniciadores. La unión de los adaptadores y los bordes de los fragmentos generados por las endonucleasas de restricción se realiza mediante el uso de ligasas (Karp *et al.*, 1997).
  
3. **Preamplificación de los fragmentos de restricción.** Para poder discriminar entre todos los fragmentos que se forman, se diseñan los iniciadores o primers, que se basan en la secuencia del adaptador añadido en el paso anterior, más uno, dos o tres nucleótidos adicionales en la posición 3'. El conjunto de iniciadores a utilizar siempre tiene que incluir iniciadores que terminen en cada uno de los nucleótidos posibles (A, G, C y T). La amplificación mediante PCR sólo ocurrirá en aquellos fragmentos en los que los iniciadores encuentren las secuencias complementarias tanto para el adaptador como para los pares de bases adicionales. Las pares de bases adicionadas actúan, de esta forma, como nucleótidos selectivos, pues para un primer específico (por ejemplo acabado en A) sólo se amplificará la subpoblación de ADN que contenga una T inmediatamente a continuación de la secuencia del adaptador para el que se haya diseñado ese primer. Normalmente se realizan dos amplificaciones por PCR, en la primera se utiliza un único nucleótido selectivo y en la segunda se utilizan el anterior nucleótido más uno o dos nucleótidos adicionales (Karp *et al.*, 1997; Valadez y Kahl, 2000). Cada nucleótido adicional supone una reducción en el número de fragmentos a obtener, facilitando su visualización.

4. **Gel de electroforesis.** Los fragmentos de restricción amplificados pueden ser luego separados en un gel desnaturizante de poliacrilamida mediante electroforesis y los productos de amplificación pueden ser visualizados mediante fluorescencia.

### **6.9.1. Optimización de la reacción de amplificación**

La amplificación mediante PCR implica, primeramente verificar la integridad y pureza, cantidad de ADN y origen de las muestras.

Se requiere del uso de DNA polimerasas, habitualmente se utiliza la *Taq* polimerasa, una enzima termoestable aislada de la bacteria termofila *Thermus aquaticus*. Se requiere también de cebadores, iniciadores o primers de tamaño entre 18 a 30 nucleótidos, cuya temperatura de disociación oscile entre 45 y 60 °C.

Los cuatro desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs): dATP, dGTP, dCTP y dTTP se deben añadir en la solución de la reacción en concentraciones que normalmente oscilan entre los 20 y los 200 mM cada uno. También es necesaria la existencia de sales en la reacción (tampón) para que amortigüe la reacción, por lo general se usa Tris-HCl 10 mM (pH=8.4), KCl 50 mM, y MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM. También se pueden usar detergentes como el Tween 20, Laureth 12 (0.1%) o Triton, que ayudan a estabilizar la enzima, o adyuvantes como polietilenglicol (PEG), glicerol, formamida, seroalbúmina bovina (BSA), dimetilsulfóxido (DMSO). La presencia y concentración de los cationes K<sup>+</sup> y Mg<sup>++</sup> influyen en la reacción, elevadas concentraciones de K<sup>+</sup> favorecen la desnaturización de secuencias cortas de ADN, mientras que concentraciones bajas ayudan a la desnaturización de cadenas largas. La presencia de Mg<sup>++</sup> es imprescindible para la actividad de la *Taq* polimerasa, altas concentraciones disminuyen la especificidad de la

reacción, bajas concentraciones de  $Mg^{++}$  aumentan la especificidad. El  $MgCl_2$ , además, aumenta la temperatura de hibridación del ADN.

El tiempo, la temperatura y el número de ciclos son factores determinantes en el resultado de la PCR. Por lo tanto, modificándolos se puede optimizar la reacción. La PCR consta de tres pasos:

1. **Desnaturalización.** Temperaturas de 94 °C durante 30 seg a 1 min. Si el ADN molde tiene alto contenido de G + C pueden aumentarse el tiempo o la temperatura. En la práctica se suele añadir un período de desnaturalización antes de comenzar los ciclos para asegurar que se produce en toda la muestra de ADN. Esta etapa suele ser de 94 °C durante 5 min.
2. **Hibridación-** La temperatura en este paso depende de tres factores relacionados con los cebadores: la composición de bases, el tamaño y la concentración. En la práctica la temperatura de hibridación se establece en unos 4-5 °C por debajo de la Temperatura de disociación de los cebadores, por lo que suele oscilar entre 45-65 °C. El tiempo de desarrollo de este paso es de 30 seg a 1 min.
3. **Extensión.** El tiempo de extensión depende del tamaño del fragmento a amplificar. Se puede estimar un tiempo de 1 min para elongar 1 kb. En la mayoría de las reacciones, la etapa de extensión se realiza a 72 °C. A esta temperatura la reacción. Se puede dejar un paso de extensión de 7 min al final, para que no queden moléculas incompletas.

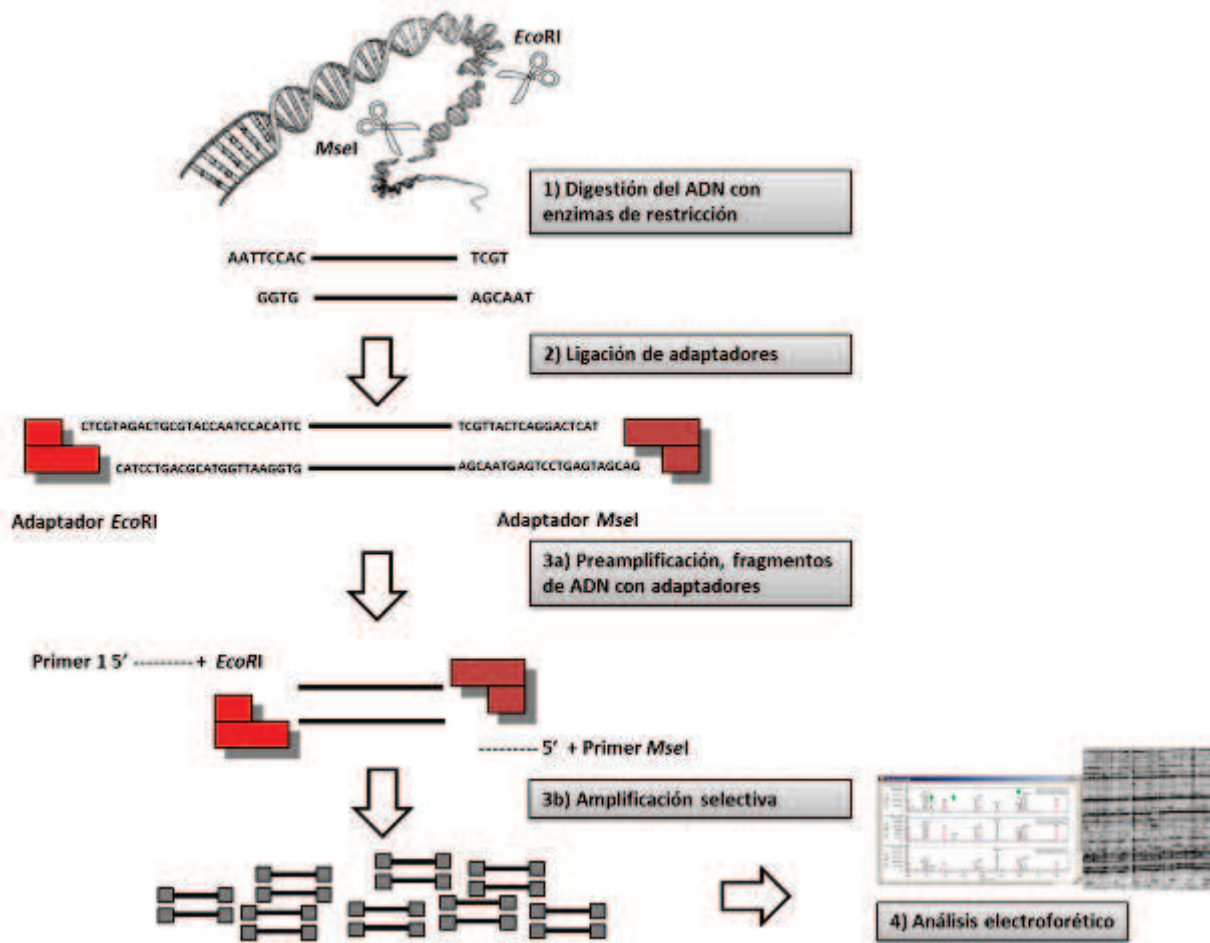


Figura 10. Esquema de los principales pasos de la técnica AFLP (Modificado de Vos *et al.*, 1995).

### 6.9.2. Procedimiento experimental para la amplificación de ADN de mango mediante AFLPs

Para amplificar el ADN, primeramente se verificó su integridad y concentración. La concentración recomendada para AFLPs es de 250 a 500 ng/ $\mu$ L. Sin embargo, en algunas de las muestras de mango no se logró extraer esa concentración por lo que se hicieron diluciones para tener una concentración homogénea de 50 ng/ $\mu$ L para iniciar la amplificación.

Para hacer las reacciones de digestión, ligación, preamplificación y amplificación selectiva se preparó un volumen total de reacción para un determinado número de muestras y después se agregó por separado un volumen exacto para cada reacción (Cuadros 11 a 14). Esto se realizó con la finalidad de reducir el error de pipeteo y redistribuir el posible error en todas las muestras.

### 6.9.2.1. Restricción

El ADN de cada muestra se depositó en tubos Eppendorf de 500  $\mu\text{L}$  y se agregó la mezcla de reacción a cada tubo (Cuadro 5).

Cuadro 11. Reacción de digestión de ADN con enzimas de restricción.

Concentración inicial Compuesto	Concentración final	Volumen (1x)
ADN 50 ng/ $\mu\text{L}$	250 - 500 ng/ $\mu\text{L}$	5 – 10 $\mu\text{L}$
10x <i>Mse</i> 4 buffer*	1x	2.0 $\mu\text{L}$
10 mg/ $\mu\text{L}$ BSA buffer*	0.1 mg/mL	0.2 $\mu\text{L}$
20 U/ $\mu\text{L}$ <i>Eco</i> R1*	4U	0.2 $\mu\text{L}$
10U/ $\mu\text{L}$ <i>Mse</i> 1*	1U	0.1 $\mu\text{L}$
Agua**		12.5 – 7.5 $\mu\text{L}$
		Volumen final = 20 $\mu\text{L}$

\*Invitrogen®; \*\* Milli Q estéril, pH = 7.8, GIBCO.

Se mezcló el ADN contenido en los tubos con vórtex y se dió un pulso en una picocentrífuga.

Las muestras se incubaron a 37 °C en baño María durante 3 h.

Las enzimas se inactivaron incubando a 65 °C durante 15 min en baño María.



### 6.9.2.2. Ligación de adaptadores

Se agregó la mezcla de reacción de ligación con los adaptadores (Cuadro 12).

Cuadro 12. Reacción de ligación de adaptadores al ADN digerido.

Concentración inicial Compuesto	Concentración final	Mezcla de reacción (1x)
ADN digerido		20 µL
5x ligasa buffer	1x	6 µL
Adaptador <i>EcoR1</i> 5 pmol	1.66 pmol	1 µL
Adaptador <i>Mse1</i> 50 pmol	0.166 pmol	1 µL
1U/ µL T4 ligasa	1U	1 µL
Agua		1 µL
		Volumen final = 30µL

Invitrogen® Adaptadores: *EcoR1*: 5'-CTC GTA GAC TGC GTA CC- oligo 1 *EcoR1*  
-CAT CTG ACG CAT GGT TAA-5' oligo 2 *EcoR1*  
*Mse1*: 5' -GAC GAT GAG TCC TGA G- oligo 1 *Mse1*  
-TA CTC AGG ACT CAT - 5' oligo 2 *Mse1*

Se mezcló con vórtex y se dió un pulso en una picocentrífuga.

El ADN se incubó toda la noche a temperatura ambiente.

Se tomaron 12 µL del ADN digerido de cada una de las muestras con 4 µL de buffer de carga y 2.5 µL de marcador (100 pb) para resolver en un gel de agarosa al 1.5% en buffer TBE 1x con bromuro de etidio (76 volts, durante 15 a 20 min). El gel se visualizó en un fotodocumentador.

### 6.9.2.3. Reacción de preamplificación

Del producto resultante en el paso anterior, se hizo una dilución 1:5 en buffer TE y se realizó la mezcla de reacción para la preamplificación (Cuadro 13).

Cuadro 13. Reacción de preamplificación del ADN por PCR.

Concentración inicial Compuesto	Concentración final	Mezcla de reacción para una muestra
ADN cortado y ligado (dilución 1:5)	4 ng	10 µL
10x PCR buffer	1x	2 µL
50 mM MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM	0.6 µL
10 mM dNTPs	0.2 mM	0.4 µL
Primers (20 pmol/ µL) cada uno*	1 pmol cada uno	2 µL (1 µL de cada uno)
5U/µL Taq Polimerasa	0.5 U	0.1 µL
Agua		4.9 µL
		Volumen final= 20µL

\*Sigma® Pream *Eco*R1 100 mM 5'-GAC TGC GTA CCA ATT (CA); C, nucleotide adicional; A, nucleotide selective.

Pream *Mse*I 100 mM 5'-GAT GAG TCC TGA GTA AC

El programa del termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient) de PCR para la preamplificación se realizó como se observa en la figura 11.

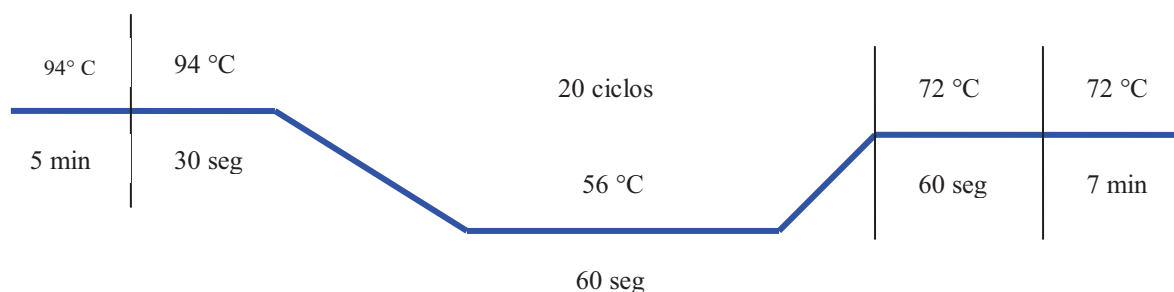


Figura 11. Programa del termociclador para la reacción de preamplificación de ADN.

Se aplicaron 8 µL del producto de la mezcla de preamplificación, más 4 µL de buffer de carga, y 2.5 µL de marcador (100 pb) en un gel de agarosa al 1.5% en buffer TBE 1x, 86 volts durante 15 min.

#### 6.9.2.4. Amplificación selectiva

Se probaron combinaciones de primers que pudieran ser utilizadas en el análisis de mango. Para identificar el origen cigótico o nucelar de plántulas de las variedades ‘Manila’ y ‘Ataulfo’ se compararon plantas madres con las plántulas hijas. En caso de no contar con plantas madre se compararon entre sí todas las plántulas originadas a partir de embriones de una misma semilla. En el caso de la variedad ‘Haden’ se compararon las plantas madres con las hijas.

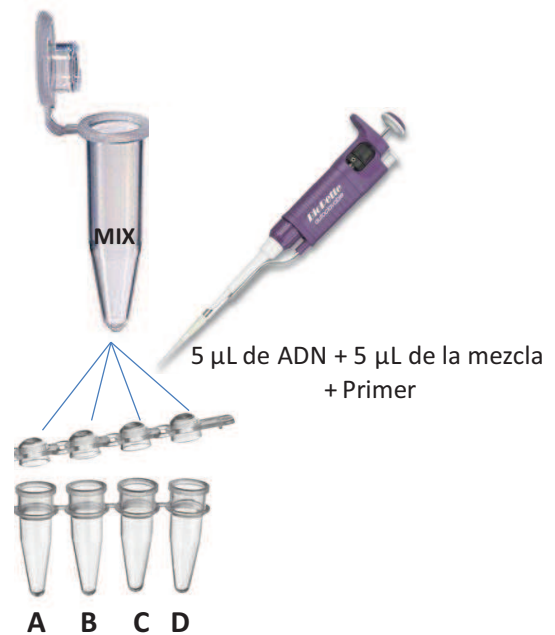


Figura 12. Mezcla para la amplificación selectiva.

Se realizaron diluciones (1:25 o 1:50, según el caso de cada muestra en particular) en buffer TE para tener las muestras en una concentración de 50 ng/ $\mu$ L antes de hacer la mezcla para la amplificación selectiva.

Se prepararon las mezclas de reacción de amplificación selectiva, por cuadruplicado para cada muestra, con la finalidad de colocar en cada tubo los cebadores con fluoróforo. Las mezclas se realizaron en frío (Fig. 12, Cuadro 14).

Cuadro 14. Reacción de amplificación selectiva de ADN.

Concentración inicial Compuesto	Concentración final	Mezcla de reacción (1x)
ADN preamplificado (dilución 1:25)		5 µL
10x PCR buffer	1x	1 µL
50 mM MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM	0.3 µL
10 mM dNTPs	0.2 mM	0.2 µL
Primers <i>Mse</i> 1 (6.7 ng/µL)	1.5 ng	2.25 µL
Primers <i>Eco</i> R1 (27.8 ng/µL)	1.0 ng	0.5 µL
5U/µL Taq Polimerasa	0.5 U	0.1 µL
Agua		0.65 µL
		Volumen final= 10µL

### *Combinaciones de primers AFLPs*

Los cebadores específicos marcados con fluoróforos durante la amplificación selectiva que detectaron un mayor número de bandas polimórficas fueron EcoR1-ACC con NED<sup>TM</sup>, ECOR1-ACT y ACA con FAM<sup>TM</sup> y EcoR1-ACC y ACG con JOE<sup>TM</sup> Oligo (Invitrogen), que producen una fluorescencia multicolor en el espectro del amarillo, azul y verde, respectivamente (Cuadros 15 y 16). La intensidad relativa de los fluoróforos o fluorocromos utilizados se observa en el cuadro 15.

Cuadro 15. Intensidad relativa de los fluorocromos utilizados en la detección de polimorfismo en mango

Fluocromo	Max A (nm)	Max E (nm)
FAM <sup>TM</sup>	494	530
JOE <sup>TM</sup>	528	554
NED <sup>TM</sup>	546	575
ROX <sup>TM</sup>	587	607

ROX<sup>TM</sup> se utilizó como marcador, detecta bandas de 75 a 500 pb.

El criterio para la selección de las combinaciones de primers o cebadores específicos empleados fue usar aquellas condiciones que permitieran amplificar el mayor número de fragmentos polimórficos (Cuadro 16), para lo cual primero se probaron varias combinaciones

de primers específicos. Cabe mencionar que algunas de estas combinaciones de primers ya se habían probado en individuos de poblaciones de *Agave angustifolia* (Sánchez-Teyer *et al.*, 2009). Los primers marcados con JOE sólo amplificaron para la variedad ‘Manila’, por lo que solamente se utilizaron durante las pruebas preliminares. Posteriormente solo se utilizaron mezclas con FAM y NED.

Cuadro 16. Combinaciones de primers que proporcionaron un mayor número de fragmentos polimórficos en mango.

Primers					
FAM <sup>TM</sup>		NED <sup>TM</sup>		JOE <sup>TM</sup>	
<i>EcoR1</i>	<i>Mse1</i>	<i>EcoR1</i>	<i>Mse1</i>	<i>EcoR1</i>	<i>Mse1</i>
ACA	CAC	ACC	CTA	ACG	CTT
ACT	CTA	ACC	CAC	ACC	CTT
ACA	CTT	ACC	CAC		
ACA	CTA	ACC	CTT		
ACA	CAC	ACC	CTA		
ACT	CTA	ACC	CTT		
ACT	CTT	ACC	CAC		
ACA	CTT	ACC	CTT		
ACA	CTA	ACC	CAC		

Secuencias de los primers *Mse1* sin marcar:  
 MCAC GAT GAG TCC TGA GTA AAC AC  
 MCTA GTA GAG TCC TGA GTA ACT A  
 MCTT GAT GAG TCC TGA GTA ACT T

El programa del termociclador (Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700) para la amplificación se realizó como se observa en la figura 13.

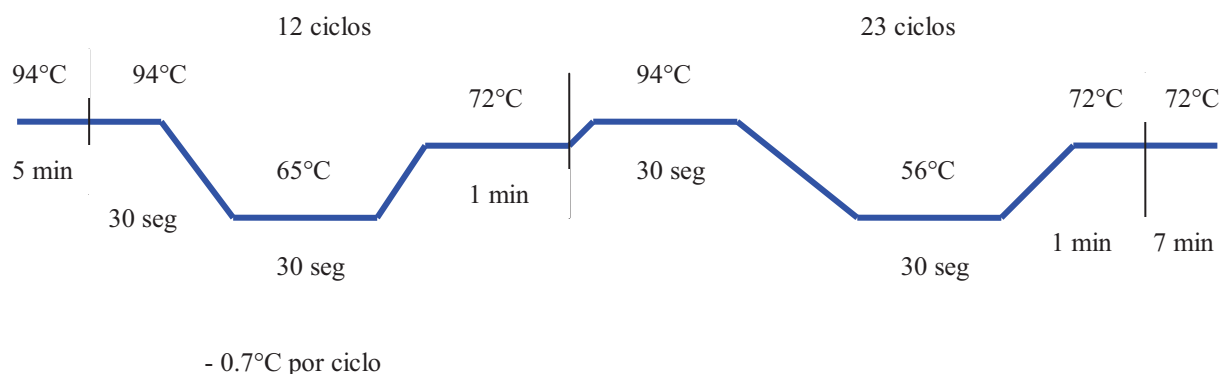


Figura 13. Programa del termociclador para la amplificación selectiva de ADN.

Para evaluar los fragmentos presentes en la amplificación selectiva, en un tubo de 500  $\mu\text{L}$  se preparó una mezcla para cada muestra, con 10  $\mu\text{L}$  de formamida, 0.4  $\mu\text{L}$  de ROX<sup>TM</sup> Size Estándar Gene SanTM-500 (Invitrogen), 2  $\mu\text{L}$  de la amplificación selectiva con los cebadores específicos marcados con los fluoroforos amarillo, azul y verde (Cuadro 17, Fig. 14). De esta manera, en la misma mezcla se analizaron las cuatro o seis combinaciones simultáneamente.

El ADN se desnaturalizó en el termociclador a 94 °C durante 5 min. Los tubos con las muestras se colocaron en un recipiente con hielo o se almacenaron a -20 °C para posteriormente correrlas y resolverlas por electroforesis en un secuenciador automático (ABI PRISM® 310 Genetic) con buffer EDTA 1x.

Cuadro 17. Reacción de desnaturalización de ADN

Compuesto	Mezcla de reacción (1x)
Formamida Hidi	10 $\mu\text{L}$
ROX <sup>TM</sup> Size Std	0.4 $\mu\text{L}$



Figura 14. Mezcla de reacción para la desnaturalización y marcaje del ADN.

### 6.10. Análisis de datos moleculares

Los electrofenogramas obtenidos en el secuenciador se analizaron visualmente con el programa Gene Marker® The Biologist Friendly Software SoftGenetics, considerando los fragmentos con un nivel de intensidad que no fuera confuso. El rango de tamaño que se estableció fue de 70 a 400 pb, estimado con base en el marcador Gene Scan™ 500 ROX™ Size Std y se identificaron para cada combinación bandas intensas como marcadores que facilitarían el seguimiento de las bandas de los individuos de cada variedad. La presencia de bandas se marcó con 1 y la ausencia con 0 para obtener una matriz binaria y cuantificar el

número de bandas polimórficas para cada iniciador. La matriz se exportó a un archivo de Microsoft Excel.

El análisis de estos resultados se realizó con el programa NTSYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analyses System, versión 2.20 o con el programa FREE TREE para estimar los coeficientes de similitud para cada muestra mediante el índice de Nei y Li (1979), cuya fórmula es la siguiente:

$$S_{ij} = 2a / (2a + b + c)$$

En donde:

$S_{ij}$ : similitud entre individuos  $i$  y  $j$

$a$ : número de bandas presentes en los dos individuos  $i$  y  $j$

$b$ : número de bandas presentes en  $i$  pero ausentes en  $j$

$c$ : número de bandas presentes en  $j$  pero ausentes en  $i$

Con base en los índices generados, se calculó la similitud para cada variedad y entre variedades. A partir de una matriz binaria de similitud generada se contruyeron los dendrogramas, usando el método de agrupación de pares no ponderados con media aritmética UPGMA (Unweighted Pair Group Method Arithmetic Average) mediante la utilización del programa Tree View.



## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. Características morfo-histológicas de frutos, semillas y embriones

Se describen a continuación las características de los frutos maduros de las variedades estudiadas. El color en la madurez de los frutos de la variedad ‘Manila’ es



Figura 15. Color de la cáscara de frutos de las variedades ‘Manila’ (amarillo), ‘Ataulfo’ (amarillo) y ‘Haden’ (amarillo con chapeo rojo).

predominantemente amarillo, mientras que en ‘Haden’ el color predominante fue el rojo y un poco de amarillo. La variedad ‘Ataulfo’ presentó en proporciones similares colores amarillo y rojo (Fig. 15, Cuadro 18).

La variedad ‘Manila’ presenta frutos de forma oblonga con ápice agudo y una prominencia cónica o “pico” bien desarrollado o prominente; al madurar la pulpa del fruto es suave, de color amarillo con una cantidad intermedia de fibras largas. La variedad ‘Ataulfo’ muestra forma oblonga a obovoide (con la base más ancha), ápice obtuso o un poco achatado y pico perceptible, con pulpa de textura suave color amarillo-naranja y pocas fibras cortas. Los frutos de la variedad monoembriónica ‘Haden’ tienen forma redondeada con ápice redondo, pulpa de textura firme de color amarillo–naranja y alta cantidad de fibras. Las tres variedades presentan la inserción del pedúnculo poco profunda sin cuello prominente (Fig. 16).

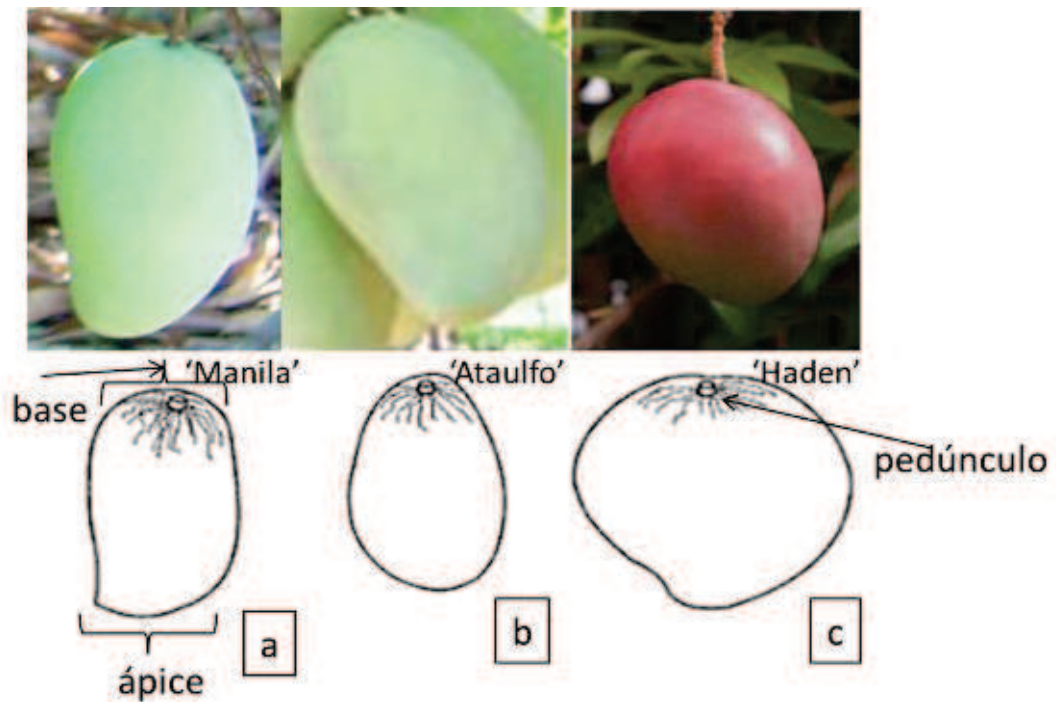


Figura 16. Forma de los frutos de mango de las variedades ‘Manila’, ‘Ataulfo’ y ‘Haden’. a) oblonga; b) obovoide y c) redondeada (IPGRI, 2006).

Las semillas se encuentran contenidas dentro de un endocarpo duro o hueso (Fig. 17) con surcos marcados y una cantidad intermedia de fibras cortas ( $\leq 1.0$  cm) en el lado menos abultado, mientras que en lado abultado o externo el endocarpo presenta fibras de longitud media (1.0 a 1.5 cm) y largas ( $\geq 1.5$  cm; IPGRI, 2006). La cantidad y longitud de las fibras es un carácter varietal.

Entre el endocarpo y la semilla se encuentra una “capa” o “membrana papirácea” muy delgada, de textura lisa y color blanco (Fig. 17a). La semilla posee una cubierta seminal delgada formada por la testa, que de acuerdo con lo reportado por Espinosa-Osornio y

Engleman (1998) se origina a partir del tegumento externo del óvulo, y el tegmen, originado por el tegumento interno y que se observa como una capa delgada, membranacea y de coloración café (Fig. 17b).

El tegmen presenta células isodiamétricas o elongadas. Las células de la testa son aplanadas periclinalmente y presentan taninos

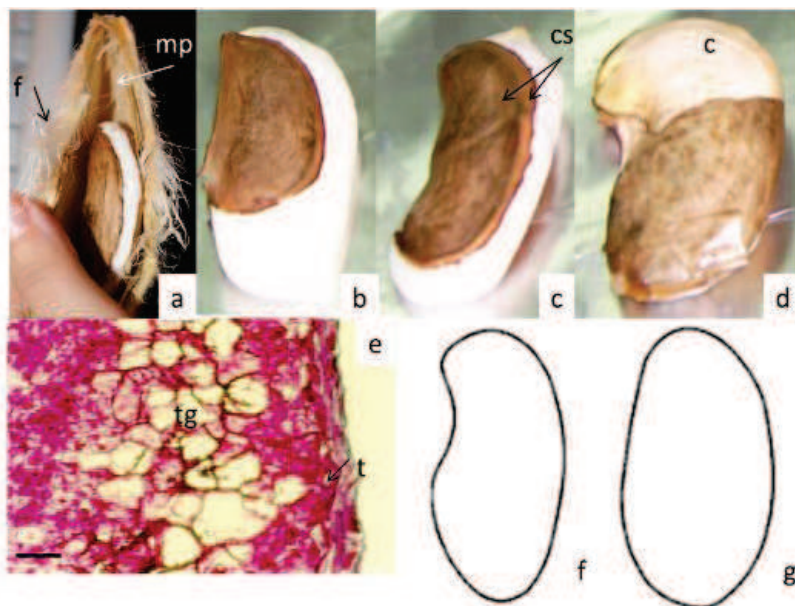


Figura 17. Semillas de las variedades de mango ‘Manila’, ‘Ataulfo’ y ‘Haden’. a) endocarpo, donde se muestran las fibras (f) y la membrana papirácea (mp) que rodea a la semilla; b) semilla var. ‘Manila’ de forma reniforme-oblonga; c) semilla de var. ‘Ataulfo’ de forma reniforme; d) semilla de la var. ‘Haden’, reniforme; e) corte histológico de la testa (t) y el tegmen (tg) de una semilla de mango de la variedad ‘Haden’, barra = 25 μm; f) semilla reniforme; g) semilla oblonga (IPGRI, 2006).

condensados al igual que las del tegmen cuando la semilla alcanza la madurez (Fig.17e).

Las semillas de las variedades ‘Manila’ y ‘Ataulfo’ son de tipo poliembriónico; en ‘Manila’ la mayor parte de las semillas son reniformes y una proporción presentan forma oblonga, su coloración es blanca con matices rosados. La variedad ‘Ataulfo’ presenta semillas de forma reniforme de color blanco. Las semillas de la variedad ‘Haden’ son de tipo monoembriónico y presentan forma reniforme con coloración blanca y matices rosados (Fig. 17 c, d, f y g).

La semilla del mango es recalcitrante y presenta arriba del 20% de humedad, sólo permanece viable unos pocos días o semanas (aproximadamente 30 días) en almacenamiento a

temperatura ambiente (Ledin y Ruehle, 1954; Ruehle y Ledin, 1955; Singh, 1960; Parisot, 1988; Doijode, 2001). La pérdida de viabilidad de las semillas se asocia con la falta de humedad y se presentan cambios a nivel celular durante el deterioro fisiológico, lo que provoca pérdidas de azúcares solubles y aminoácidos y una disminución de ARN, que conllevan a que la actividad de las deshidrogenas disminuya (Chandra, 1980; Doijode, 1989). El tiempo de viabilidad puede incrementarse hasta 84 días, colocando las semillas con endocarpo y libres de pulpa en bolsas de polietileno sobre algodón estéril húmedo con agua desionizada a 15 °C (Paul y Guneratnam, 1938; Simao, 1960; Chauran, 1979; Abdel-Galil, 1992; Doijode, 2001).

La composición físico-química de los cotiledones de semillas de mango ‘Hilacha’, de acuerdo con Medina y col. (2010) es de: agua (humedad), grasa cruda, ceniza total, proteínas, fibra cruda, azúcares, taninos y almidones (amilosa y amilopectina). La mayoría de las proteínas son metabólicamente inactivas y sirven como reserva para ser utilizadas durante el crecimiento del embrión durante la germinación. Las proteínas metabólicamente activas constituyen una pequeña cantidad del total, pero son muy importantes durante el desarrollo y germinación de la semilla. Como enzimas, participan en procesos de digestión, traslocación y utilización de reservas (Copeland y McDonald, 1995).

En la figura 18 se muestran micrografías de las variedades de mango estudiadas ‘Haden’ y ‘Manila’, donde se observa la acumulación de proteínas y gránulos de almidón predominantemente en semillas de frutos maduros. La cantidad de reservas acumuladas en los cotiledones es mayor en la variedad poliembriónica ‘Manila’, aunque el área de una semilla está dividida entre el número total de embriones presentes y los recursos nutritivos se reparten

entre todos los embriones. En cambio, en la variedad monoembriónica, los recursos son para un sólo embrión.

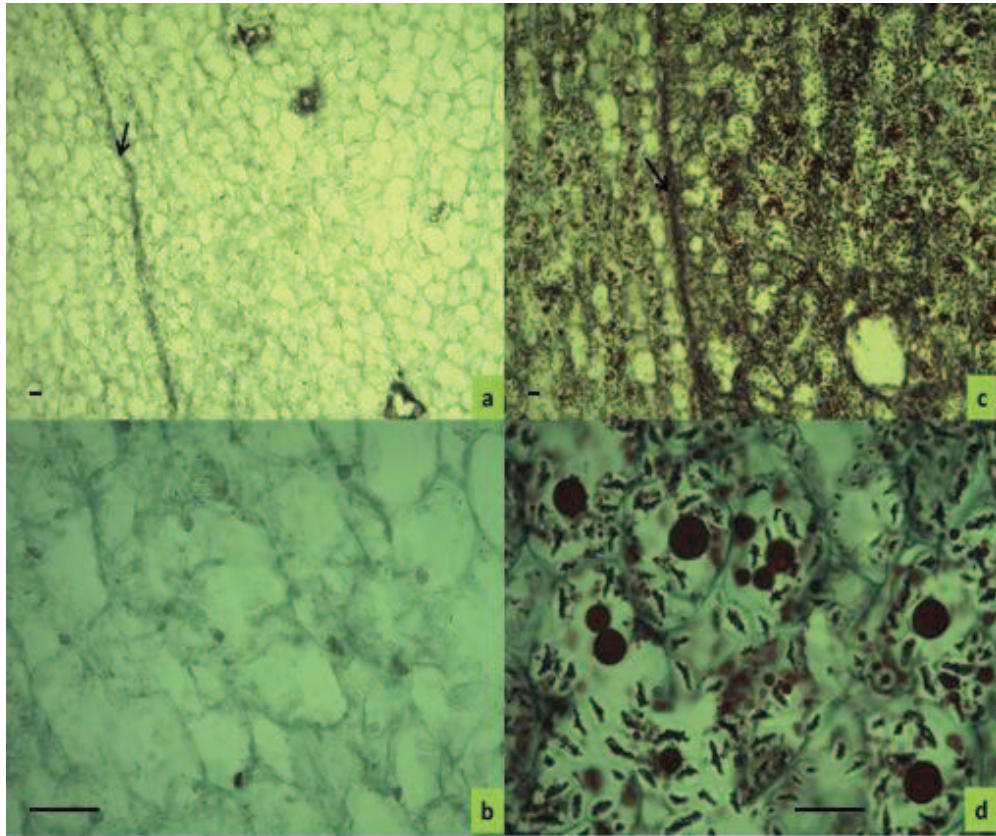


Figura 18. Micrografías de cortes histológicos de semillas de mango de las variedades ‘Haden’ (monoembriónica) (a y b) y ‘Manila’ (poliembriónica) (c y d), en los cuales se muestra la acumulación de reservas nutritivas en los cotiledones: proteínas y granulos de almidón. En a) la flecha muestra la división de los dos cotiledones en la variedad ‘Haden’; en c) la flecha muestra la división entre dos embriones de la variedad ‘Manila’. barra = 25 $\mu$ m.

En el Cuadro 18 se muestran datos de caracterización físico-química de frutos de mango de las colectas realizadas en los meses de junio o julio de 2003 a 2009. Para cada año se analizaron 11 frutos colectados al azar de 10 árboles seleccionados de cada una de las variedades ‘Haden’, ‘Manila’ y ‘Ataulfo’. Los parámetros evaluados fueron promedios de

PBF y tamaño de frutos, de semillas y del endocarpo, así como firmeza, sólidos solubles totales (°Brix) y color externo.

De manera general, durante los siete años analizados, los frutos de la variedad 'Haden' presentan en promedio un PBF mayor que los de las variedades 'Manila' y 'Ataulfo'; 219-393.3 g, 151.4-259 g y 149.9-344 g, respectivamente. Los PBF de los frutos varían de año a año de producción (Cuadro 18). Existe variación en el PBF de los frutos también de árbol a árbol, como se observa en el análisis realizado con los frutos de las variedades 'Haden' y 'Manila' colectados en el año 2004 (Fig. 19).

Gálvez-López y col. (2007b), determinaron algunas características de cuatro variantes de mango de la variedad 'Ataulfo' de Chiapas y encontraron que el PBF del fruto varía entre 245 y 374 g. En las variedades 'Edward', 'Otts', 'Irwin', 'Parvin' y 'Gleen', Soto y col. (2004) reportan promedios de PBF que varían de los 345.8 a los 508.8 g y se consideran como frutos grandes (tienen una mayor masa que los frutos estudiados en este trabajo). Bila (2010), en un estudio realizado en 30 variedades de Mozambique, reporta que los frutos de la variedad 'Haden' pesan en promedio 512.5 g. Lo anterior indica que existe variación en el PBF del fruto también de acuerdo a la localidad de producción y a las condiciones ambientales.

Los frutos de la variedad 'Manila' tienen forma más alargada que los de las variedades 'Haden' y 'Ataulfo'. Las dimensiones son 9.3-10.4/6.7-8.4, 10.2-12.3/5.5-6.5 y 8.7 a 12.6/5.7-7.4 cm de largo/ancho, en las variedades 'Haden', 'Manila' y 'Ataulfo', respectivamente (Cuadro 18), lo cual los clasifica como frutos de tamaño mediano a grande de acuerdo con la categorización realizada por Cumare y Avilán (1994a), en nueve variedades de mango:

'Divine', 'T. Manzana', 'Julie', 'Tolbert', 'Ceylon', 'Currucal', 'Perú 2', 'Rosa' y 'Selección 80', que presentan tamaños entre 6.5/5.3 cm a 10.1/7.9 cm largo/ancho y están reportados como frutos de tamaño pequeño a mediano. Los frutos de las variedades de mango 'Edward', 'Otts', 'Irwin', 'Parvin' y 'Gleen' están reportados por Soto y col. (2004) como de tamaño grande y miden de 11.7/8.8 cm a 12.2/8.5 cm largo/ancho. En la variedad 'Ataulfo' de Chiapas las dimensiones de tamaño de fruto reportadas por Gálvez-López y col. (2007b) son de 11.1 a 11.5/6.9 a 7.9 cm largo/ancho. Los frutos de la variedad 'Haden' de Mozambique miden 18.56 cm de longitud (Bila, 2010), mucho más grandes que los colectados para este estudio en Sinaloa.

El color predominante en el exocarpo de los frutos de la variedad 'Manila' al momento de la madurez es el amarillo, éste osciló entre 55 y 97% del total del fruto, el resto del exocarpo fue verde. En la variedad 'Haden' el color predominante fue el rojo (63 a 70%), otros colores presentes en el pericarpo son el amarillo y el verde. La variedad 'Ataulfo' presenta entre el 46 a 99 de color amarillo y con chapeo rojo (Cuadro 18).

La firmeza es variable en las tres variedades, así como respecto al año de producción. Los frutos presentan valores de firmeza que van de 3.9 a 8.6, 2.4 a 5.5 y 2.8 a 7.4 Lb-F en 'Haden', 'Manila' y 'Ataulfo', respectivamente (Cuadro 18). Los valores de firmeza en nueve variedades de mango reportadas por Cumare y Avilán (1994a): 'Divine', 'T. Manzana', 'Julie', 'Tolbert', 'Ceylon', 'Currucal', 'Perú 2', 'Rosa' y 'Selección 80' varían de 2.53 a 5.68 Lb-F. En la variedad 'Manila', en la colecta del año 2005, la firmeza fue considerablemente menor, debido probablemente, a que durante ese año los periodos de floración y cosecha en la huerta se adelantaron por las condiciones ambientales que se presentaron y los frutos fueron

colectados algunos días después de que se había realizado la cosecha para la comercialización de los mismos, por lo que algunos de los frutos en el momento de la colecta se encontraban en estado de madurez fisiológica, presentando características tales como ablandamiento de la pulpa. En la colecta del año 2008, las variedades ‘Manila’ y ‘Ataulfo’ presentaron un valor de 2.8 Lb-F de firmeza. De acuerdo a los comentarios hechos por los productores, durante ese periodo de producción se presentó una buena floración en el mes de febrero; sin embargo, hubo un largo invierno frío de diciembre a marzo, motivo por el cual argumentaron que en los frutos no hubo una síntesis y desenmascaramiento adecuados de pigmentos, y los colores externo e interno de los frutos no se evidenciaron notablemente. La cosecha se realizó a mediados de julio de 2008, encontrando que muchos de los frutos habían alcanzado otros parámetros de madurez en la pulpa, tales como ablandamiento del mesocarpo y altos valores de °Brix, como se nota también en los datos del Cuadro 18 para el año 2008 en las variedades ‘Manila’ y ‘Ataulfo’.

En el cultivo de mango, de acuerdo con Cumare y Avilán (1994b), la aparición de las etapas de floración, fructificación y flujos vegetativos dependen en gran medida de los cambios climatológicos y de una acumulación interna de unidades fototérmicas indispensable para el inicio y culminación efectiva de cada fase. No obstante, existen diferencias entre las variedades que crecen en un mismo sitio en cuanto a las fechas de aparición, magnitud y frecuencia de las fases. En agave azul (*Agave tequilana*), Pimienta-Barrios y col. (2005) encontraron que los factores ambientales pueden provocar efectos fisiológicos en las plantas, como es el caso de la fotosíntesis y respiración y que la aparición de cambios drásticos en la



temperatura reducen la producción y acumulación de azúcares en los tejidos de reserva, ya que se incrementa la tasa de respiración y se reduce la de fotosíntesis.

Por otro lado, aunque los frutos de las tres variedades hayan sido colectados bajo las mismas condiciones, en los frutos de la variedad ‘Manila’ los procesos de maduración y senescencia se presentan de manera más acelerada, por eso tienen un menor tiempo de vida de anaquel con respecto a la variedad ‘Haden’ (Barbosa, 2003). Con relación a los SST los resultados muestran que la variedad ‘Haden’ presenta los valores más bajos: 10.8 a 16.8°Brix, mientras que ‘Manila’ y ‘Ataulfo’ presentan valores similares que varían de 15 a 20.7°Brix (Cuadro 18).

Las semillas de la variedad ‘Haden’ tienen mayor PBF (15.3-22.9 g) que las de las variedades poliembriónicas ‘Manila’ y ‘Ataulfo’ (8-11.8 y 8.2 a 12.2 g, respectivamente) (Cuadro 19). Los valores reportados para los mangos ‘Ataulfo’ de Chiapas oscilan entre 11.8 y 18.4 g (Gálvez-López *et al.*, 2007b). En las variedades de mango ‘Divine’, ‘T. Manzana’, ‘Julie’, ‘Tolbert’, ‘Ceylon’, ‘Currucal’, ‘Perú 2’, ‘Rosa’ y ‘Selección 80’, reportadas por Cumare y Avilán (1994a) los PBF de las semillas varían entre 10 a 20.1 g. En la variedad ‘Haden’ de Mozambique las semillas pesan en promedio 30.33 g (Bila, 2010), mucho más grandes que las colectadas para este estudio en el Rosario, Sinaloa.

Cuadro 18. Caracterización físico-química de frutos de mango var. ‘Haden’, ‘Manila’ y ‘Ataulfo’ durante los años 2003 a 2009.

Año de colecta	Variedad	PBF (g)	Fruto		Color (%)	Firmeza (lb-F)	SST °Brix
			Tamaño (cm)				
			largo	ancho			
2003	‘Haden’	303.0±30.4b	9.9±0.5a	6.7±0.4a	63R	4.2±1.5a	14.7±2.1a
	‘Manila’	234.3±24.7a	12.3±0.6b	6.5±0.3a	97A	5.0±1.6a	18.2±1.9b
2004	‘Haden’	270.8±46.0b	9.3±0.5a	7.6±0.4b	65R	4.4±0.4a	17.3±0.8b
	‘Manila’	225.9±50.5a	11.5±0.6b	6.5±0.5a	70A	4.0±1.7a	16.2±1.9a
2005	‘Haden’	219.3±41.5b	9.4±0.5a	6.7±0.4b	70R	4.3±1.8a	16.0±1.7a
	‘Manila’	207.8±32.3ab	11.4±1.1b	6.4±0.3ab	59A	2.4±1.2a	15.0±2.0a
	‘Ataulfo’	164.7±41.5a	9.1±1.0a	5.9±0.5a	46A	4.4±3.5a	15.0±4.1a
2006	‘Haden’	334.4±63.7c	10.1±1.0b	7.0±0.3b	70R	3.9±1.1a	15.4±1.3a
	‘Manila’	227.0±49.6b	11.7±1.2b	6.5±0.3ab	75A	3.7±0.9a	19.6±1.9b
	‘Ataulfo’	149.9±22.2a	8.7±0.9a	5.7±0.5a	50A	4.4±0.8a	17.3±1.9c
2007	‘Haden’	393.3±53.7b	10.2±1.1a	7.1±1.0b	65R	8.6±4.8a	10.8±1.3a
	‘Manila’	259.5±34.8a	10.9±1.3a	6.2±0.8ab	87A	3.8±0.9a	14.9±1.2b
	‘Ataulfo’	304.2±38.2a	9.6±0.7a	5.8±0.4a	79A	4.0±0.7a	18.5±1.2a
2008	‘Haden’	341.7±75.9c	10.4±1.01a	8.4±0.45c	63R	6.2±1.9b	16.2±0.7a
	‘Manila’	151.4±19.5a	10.2±0.6a	5.9±0.3a	92A	2.8±0.9a	20.6±1.3b
	‘Ataulfo’	184.5±19.2b	9.8±0.5a	6.7±0.2b	99A	2.8±1.2a	20.7±0.9b
2009	‘Haden’	329.5±35b	10±0.4a	7.6±0.4b	63R	6.2±2.2b	15.6±1.5a
	‘Manila’	155±25.7a	10.2±0.6a	5.5±0.3a	55A	3.1±1.1a	16.2±1ab
	‘Ataulfo’	344.2±36b	12.6±0.4b	7.4±0.9b	97A	7.0±1.8b	16.8±2.2b

abc=Promedios por año entre variedades con diferente letra son estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ). Se obtuvieron los promedios y desviación estándar (prom±DS), n=110 frutos por variedad. PBF, peso base fresca; SST, sólidos solubles totales; R = rojo; A = amarillo

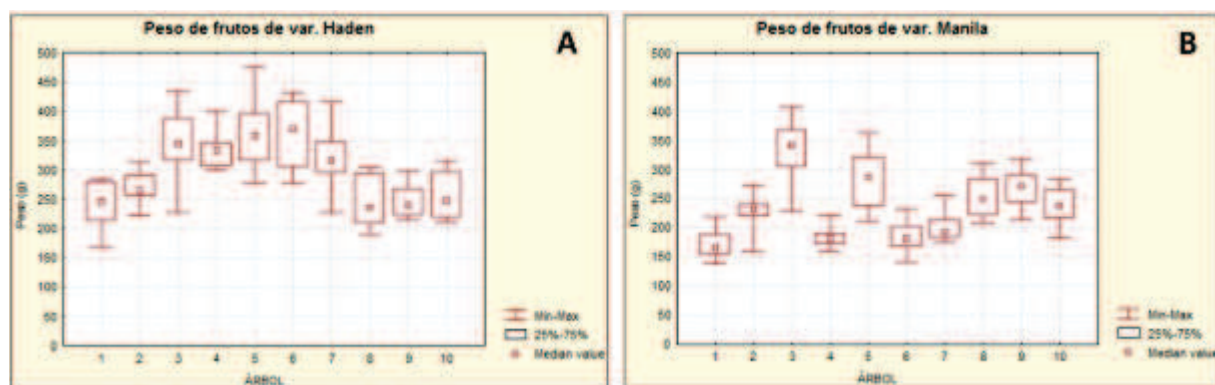


Figura 19. Promedios de PBF de frutos de las variedades A) ‘Haden’ y B) ‘Manila’ en los 10 árboles donde se cosecharon los frutos (colecta 2004).

Respecto a las dimensiones de tamaño de semilla, la variedad ‘Haden’ presenta valores ligeramente superiores (5.5/2.7 a 6.8/3.6 cm de largo/ancho) que las dos variedades poliembriónicas (5.0/2.4 a 5.9/2.9 y 5.0/2.3 a 5.4/2.9 cm largo/ancho, en ‘Manila’ y ‘Ataulfo’, respectivamente), las cuales son muy similares. Gálvez-López y col. (2007b) reportan longitudes de semillas de la variedad ‘Ataulfo’ de Chiapas entre 8.6 a 9.9 cm. En la figura 20 se observa que el tamaño de semilla varía de árbol a árbol.

A la semilla y al endocarpo les corresponde un porcentaje muy pequeño del PBF total del fruto, el mayor porcentaje de PBF total del fruto le corresponde a la pulpa; en ‘Haden’ el PBF de la semilla representa entre el 5 y el 7.1% del total del fruto, mientras que el endocarpo ocupa solamente del 3.3 al 15% del fruto. En ‘Manila’ la semilla representa del 4 al 5.4% y el endocarpo del 8.1 al 13%, aproximadamente (Cuadro 19). En las variedades ‘Edward’, ‘Otts’, ‘Irwin’, ‘Parvin’ y ‘Gleen’ reportadas por Soto y col. (2004) el porcentaje del endocarpo corresponde a 7.13 a 9.46% del total del fruto.

La variabilidad fenotípica de la semilla depende tanto de las condiciones geográficas, climáticas y edáficas, así como de la disponibilidad de agua durante el desarrollo de la semilla y la alocaión de recursos maternos (Willson, 1983; Westoby *et al.*, 1992 y 1996; Leishman *et al.*, 2000; Fenner y Thompson, 2005). El tamaño de la semilla tiene que ver también con la forma de crecimiento y la altura de las plántulas (Jurado *et al.*, 1991; Leishman y Westoby, 1994; Leishman *et al.*, 1995; Alexander *et al.*, 2001). La variación en el tamaño de semillas se ha puesto de manifiesto entre poblaciones, entre años de producción y entre individuos (Thompson, 1984; Michaels *et al.*, 1988; Stöckling y Favre, 1994; Vaughton y Ramsey, 1997 y 1998).

Cuadro 19. Caracterización morfológica de semillas de mango var. ‘Haden’, ‘Manila’ y ‘Ataulfo’ antes de la siembra, durante los años 2003 a 2009.

Año de colecta	Variedad	Semilla			Endocarpo		
		PBF (g)	Tamaño (cm)		PBF (g)	Tamaño (cm)	
			Largo	Ancho		largo	ancho
2003	‘Haden’	19.6±2.8b	6.2±0.6a	2.7±0.2a	24.5±5.1a	7.0±0.5a	3.6±0.2a
	‘Manila’	8.8±2.1a	5.2±0.4a	2.8±0.2a	29.0±7.8a	9.2±0.4b	3.3±0.3a
2004	‘Haden’	19.2±3.3b	5.7±0.4a	2.7±0.2a	9.0±1.3a	6.8±0.4a	3.4±0.1a
	‘Manila’	11.1±1.3a	5.3±0.5a	2.6±0.1a	17.9±0.8b	9.4±0.5b	3.2±0.2a
2005	‘Haden’	15.3± 3.2b	5.5±0.3a	2.8± 0.1a	37.8± 7.2b	7.2± 0.7a	3.8± 0.5a
	‘Manila’	8.8± 3.2a	5.3± 0.2a	2.5± 0.2a	26.2± 6.5a	9.1± 0.4b	3.4± 0.3a
	‘Ataulfo’	8.9± 3.7a	5.1± 0.2a	2.3± 0.3a	21.4± 5.9a	7.6± 0.2a	3.1± 0.2a
2006	‘Haden’	20.2±3.9b	6.5±0.7a	2.8±0.2b	15.5±3.5b	7.7±1.5a	3.5±0.3a
	‘Manila’	11.8±3.2a	5.9±0.4a	2.7±0.2b	18.6±5.0b	9.6±0.9b	3.9±0.5a
	‘Ataulfo’	8.2±2.3a	5.0±0.2a	2.4±0.3a	9.8±1.7a	7.9±0.8a	3.5±0.4a
2007	‘Haden’	22.6±3.7b	6.4±0.6a	3.1±0.2b	17.8±3.3b	7.5±0.8a	3.7±0.4a
	‘Manila’	10.8±2.1a	5.5±0.7a	2.8±0.3a	23.4±2.8c	8.8±0.5b	3.4±0.5a
	‘Ataulfo’	12.2±3.1a	5.2±0.3a	2.7±0.2a	12.6±1.8a	7.8±0.7a	3.3±0.3a
2008	‘Haden’	22.3±3.2b	6.8±0.3c	3.6±0.3b	14.3±3.2b	7.4±0.2a	3.9±0.2b
	‘Manila’	9.4±1.7a	5.8±0. 3b	2.9±0.2a	10.4±1.5a	8.4±0.6b	3.1±0.2a
	‘Ataulfo’	8.4±1.7a	5.3±0.2a	2.9±0.2a	10.2±1.4a	7.8±0.3a	3.1±0.1a
2009	‘Haden’	22.9±4.9b	6.4±0.7b	2.9±0.3b	23.8±4.5b	7.2±0.6a	3.5±0.3a
	‘Manila’	8.0±2.7a	5.0±0.7a	2.4±0.3a	10.0±1.6a	8.3±0.7b	3.2±0.3a
	‘Ataulfo’	11.7±3.9a	5.4±0.9a	2.8±0.3b	20.3±4.4b	6.5±0.4a	3.1±0.2a

abc=Promedios por año entre variedades con diferente letra son estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ). Se obtuvieron los promedios y desviación estándar (prom±DS),  $n=110$  semillas por variedad. PBF, peso base fresca.

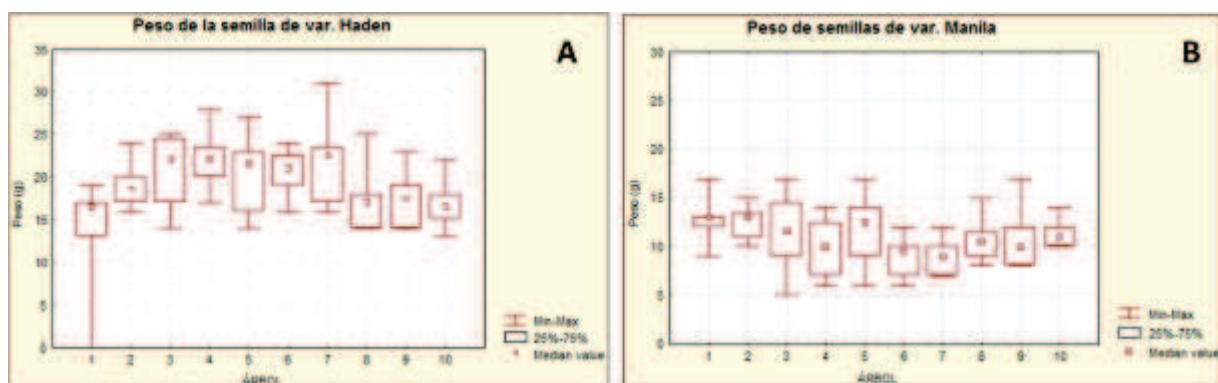


Figura 20. Promedios de PBF de semillas de las variedades A) ‘Haden’ y B) ‘Manila’ en los 10 árboles donde se cosecharon los frutos (colecta 2004).

La variación en el tamaño de la semilla dentro de una planta puede tener un carácter adaptativo ante ambientes variables (Harper et al., 1970; Janzen, 1977, 1978 y 1982; Leishman et al., 2000; Hereford y Mirouchi, 2005) y frente a las presiones selectivas que ejercen los dispersores y el ambiente de germinación y desarrollo de las plántulas (Alcántara y Rey, 2003; Gómez, 2004). La variabilidad genética constituye también un factor de gran importancia en la variación en el tamaño de la semilla (Stanton, 1984; Temme, 1986; Wolfe, 1995). La adjudicación de recursos que la planta madre hace a cada una de sus estructuras influye también en el tamaño de la semilla (Gutterman, 1992; Méndez, 1997; Vaughton y Ramsey, 1997 y 1998). En este sentido, la planta madre podría proveer cantidades desiguales de recursos, debido a restricciones físicas o fisiológicas asociadas a la posición de los frutos en la planta (Schaal, 1980; Waller, 1982; Gutterman, 1992; Méndez, 1997) o de las semillas dentro de los frutos, o de la posición de los embriones dentro de una semilla. El tamaño de semilla también puede deberse a cambios temporales en el entorno físico o fisiológico de la planta (Cook, 1975; Cavers y Steel, 1984). Por último, el tipo de polinización (Richards, 1986; Jordano, 1993) y los costes asociados a ésta (Sakai y Sakai, 1996) también han sido propuestos entre los factores que afectan la variabilidad en el tamaño de la semilla.

Los resultados anteriores muestran que existe una amplia variación en los parámetros físico-químicos evaluados en los frutos y semillas en éste y en otros estudios de acuerdo. Las diferencias se marcan de acuerdo a la localidad, año de producción e incluso a la planta madre de la cual se colectan los frutos. Lo cual demuestra que existe plasticidad fenotípica adaptativa en las plantas de mango, de tal manera, que pueden producir respuestas fenotípicas de un genotipo expresado en un gradiente ambiental. La plasticidad fenotípica es un fenómeno que

se da a una escala ecológica y sus consecuencias a este nivel son evidentes, por ejemplo, aumento a la tolerancia de hábitats extremos (Guianoli, 2004).

### ***7.1.1. Relación entre el PBF del fruto y el PBF de la semilla***

El PBF del fruto no siempre está relacionado con el PBF de la semilla, es decir, un fruto que presente un PBF alto, no necesariamente presentará una semilla de mayor PBF. En el Cuadro 20 se presenta la relación que existe entre el PBF del fruto y la semilla para las variedades ‘Haden’, ‘Manila’ y ‘Ataulfo’.

En la variedad ‘Haden’ existe una relación positiva fuerte entre el PBF del fruto y de la semilla; el valor de  $r^2 = 0.48475$ , indica que el 48% del PBF de las semillas de la variedad ‘Haden’ depende del PBF de los frutos (Cuadro 20).

En la variedad ‘Manila’ la relación que existe entre el PBF del fruto y el de la semilla también es positiva, pero débil (Cuadro 20). El valor de  $r^2$  es de 0.0728 y  $r=0.263735$ , lo que significa que el PBF de la semilla está en función del PBF del fruto solamente en el 7% de los casos.

Con respecto a la variedad ‘Ataulfo’, se encontró igualmente una relación entre el PBF del fruto y el PBF de la semilla, siendo  $r = 0.57182$  y  $r^2 = 0.3269$ . El PBF de la semilla está determinado por el PBF del fruto en un 32%.

A diferencia de los resultados encontrados en las tres variedades de mango, en el caso de *Zizyphus mistol* –mistol o mistol del monte, árbol de la familia Ramnácea típico de bosques de regiones septentrionales de Argentina, Perú, Bolivia y Paraguay- los autores encontraron que el PBF de la drupa se correlaciona positivamente con los PBF del endocarpo y la semilla (El Tahir, 1995). Asimismo, Khan y col. (1999) observaron en *Mesua ferrea* –árbol originado en la India de la familia Gutiferae- que las semillas provenientes de frutos grandes son más pesadas.

Cuadro 20. Coeficiente de determinación ( $r^2$ ) entre el PBF del fruto y de la semilla de las variedades de mango ‘Haden’, ‘Manila’ y ‘Ataulfo’.

	PBF semilla		
	‘Haden’	‘Manila’	‘Ataulfo’
PBF fruto	0.48475	0.0728	0.3269
	P=0.0001	P=0.0007	P=0.0001

## 7.2. Capacidad y Tiempo Medio de Germinación de semillas de mango

La germinación de las semillas de mango puede ocurrir entre los 5 y 40 °C, sin embargo, las temperaturas óptimas oscilan entre 25 y 30 °C. Las plántulas se desarrollan adecuadamente a las mismas temperaturas. (Giri y Chaudhary, 1966). Las temperaturas a las cuales se colocaron a germinar las semillas en este estudio fueron de  $25 \pm 3$  °C.

El Cuadro 21 representa los parámetros de germinación en las variedades ‘Haden’, ‘Manila’ y ‘Ataulfo’ durante los años 2003 a 2009. En 2003 el tiempo medio de germinación (TMG) fue de 5.1 días para la variedad ‘Haden’ y 9.6 días para la variedad ‘Manila’. En 2004 fue de 6 días para la variedad ‘Haden’, mientras que para la variedad ‘Manila’ fue el doble (12 días). Reddy (1998) afirma que la germinación comienza entre los 12 y 15 días y se continúa

durante tres semanas. Si se elimina el endocarpo y se libera la semilla, el tiempo de germinación se reduce. La capacidad de germinación se incrementa y se facilita la emergencia de las plántulas, tanto en las variedades monoembriónicas como en las poliembriónicas (Sinnadurai, 1975; Chauran *et al.*, 1979).

A partir de 2005 se colectó la variedad ‘Ataulfo’. En los años de 2005 a 2008, ‘Haden’ y ‘Ataulfo’ presentan TMG similares y más bajos que ‘Manila’, mientras que en el año 2009 ‘Haden’ germinó con mayor lentitud (Cuadro 21).

Con respecto a la capacidad de germinación (%), en el año 2003 la variedad ‘Manila’ presentó un porcentaje de germinación más alto que ‘Haden’ (98 y 76%, respectivamente). Para la variedad ‘Haden’ en el año 2004, el porcentaje de germinación fue del 99%, mientras que en ‘Manila’ sólo germinó el 58% ( $p = 0.00013$ ) (Cuadro 21).

De 2005 a 2009, los porcentajes de germinación fueron altos para las tres variedades (superiores a 88%). Las diferencias en el porcentaje de germinación por año no fueron estadísticamente significativas.

Pérez y col. (1998), reportan que en la variedad poliembriónica ‘Pico de Loro’, de Zulia, Venezuela, la capacidad de germinación es de 90% y el TMG es de 5.2 días. Las condiciones ambientales, precipitación y temperatura presentes en las diferentes zonas de producción donde se desarrollan las plantas madre, influyen en el desarrollo de las semillas y en la acumulación de sustancias de reserva, por lo que en semillas de una misma especie puede encontrarse toda una gama de colores y tamaños, según el sitio de procedencia, así como también puede variar el tiempo y el porcentaje de germinación (Herrera *et al.*, 2006).



Las diferencias en la capacidad y velocidad de germinación pueden deberse a las condiciones ambientales de la huerta durante el proceso de fructificación y desarrollo de las semillas, además de las características genéticas de las semillas, que pueden responder de diferente manera a condiciones adversas del medio, por lo que pueden resistir más o menos a daño mecánico (al extraer las semillas del endocarpo para la siembra, por ejemplo) y a patógenos del ambiente. Las diferencias más marcadas en los parámetros de germinación de semillas, se presentaron en los años 2003 y 2004. De acuerdo con Shant y Saproo (1974), las semillas de mango germinan rápidamente y con una alta frecuencia (76 a 91%) en condiciones favorables.

De acuerdo con Baskshi (1963), Parisot (1988) y Avilán y col. (1995) las variedades monoembriónicas germinan más rápidamente por el hecho de presentar un PBF mayor de los cotiledones; lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en este estudio, ya que la variedad 'Haden' (monoembriónica) germinó en menor tiempo que la variedad 'Manila' y presenta un PBF de semilla promedio mayor (Cuadro 21). Sin embargo, algunas semillas de la variedad 'Ataulfo' germinan tan rápidamente como 'Haden', es decir, un día después de la siembra (Cuadro 21). Giri y Chaudhary (1966) observaron que la germinación y el vigor de las plántulas están relacionados con el PBF de la semilla. Las plántulas de la variedad 'Chausa' que germinaron a partir de semillas grandes resultaron más altas que las de 'Langra'. Grandes embriones promueven una rápida emergencia y plántulas más vigorosas (Naik, 1941 y 1949; Simao, 1960; Corbineau *et al.*, 1987).

En el caso de las variedades 'Manila' y 'Ataulfo', el promedio del PBF de la semilla fue menor que en 'Haden' y, además, en aquellas el PBF total se distribuye entre todos sus

embriones (de 1 a 9 embriones por semilla), lo cual incide directamente sobre la velocidad de emergencia de cada uno de ellos.

El índice de germinación (IG) asigna un valor ponderado al número de semillas que germinan cada día y los valores más altos corresponden a los primeros días de germinación. El índice de germinación, por lo tanto, indica en conjunto la cantidad de semillas germinadas y la velocidad a la cual germinaron. De manera general el IG fue mayor en las variedades ‘Haden’ y ‘Ataulfo’ con respecto a ‘Manila’.

Cuadro 21. Parámetros de germinación de mango de las variedades ‘Haden’, ‘Manila’ y ‘Ataulfo’ en los años de colecta 2003 a 2009.

Año de colecta	Variedad	Capacidad de germinación (%)	TMG (Días)	IG
2003	‘Haden’	76±4a	5.1±0.2a	999±36.7b
	‘Manila’	98±1b	9.6±0.7b	563±76a
2004	‘Haden’	99±1b	6±1a	1095±120b
	‘Manila’	58±6a	12±3b	276±49a
2005	‘Haden’	93.6±2.9ab	3.5±1.6a	1388±69a
	‘Manila’	96.4±2.7b	6.5±1b	1118±165a
	‘Ataulfo’	88.2±1.8a	5.5±1.2ab	1118±154a
2006	‘Haden’	98±1a	3.6±0.6b	1467±54b
	‘Manila’	98±1a	7.1±0.7c	1071±49a
	‘Ataulfo’	100±0a	1.8±0.2a	1661±53c
2007	‘Haden’	92±2a	4.63±0.7a	1292±107b
	‘Manila’	90±2a	7.19±0.96b	970±20a
	‘Ataulfo’	97.5±1.7b	5.51±0.99ab	1232±118b
2008	‘Haden’	100±0b	2.57±0.77a	1579±121a
	‘Manila’	95±2a	4.68±0.88b	1287±213a
	‘Ataulfo’	95±1a	1.47±0.59a	1622±131a
2009	‘Haden’	92±2a	5.13±1.13b	1173±27a
	‘Manila’	98±1b	3.44±0.88ab	1460±123b
	‘Ataulfo’	92.1±0.4a	2.3±0.79a	1515±68b

abc=Promedios por año entre variedades con diferente letra son estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ). Se obtuvieron los promedios y desviación estándar (prom±DS), n=110 semillas por variedad. TMG, Tiempo Medio de Germinación; IG, Índice de germinación.

### ***7.2.1. Distribución de PBF de semillas de las variedades ‘Haden’, ‘Manila’ y ‘Ataulfo’***

Con la finalidad de comprobar si el tamaño o el PBF de la semilla influyen sobre los parámetros de capacidad y velocidad de germinación en mango, en este trabajo se tomó el PBF de la semilla como criterio para formar grupos. Se analizaron sólo dos años de colecta, 2004 (‘Haden’ y ‘Manila’) y 2005 (‘Haden’, ‘Manila’ y ‘Ataulfo’).

Las semillas de cada variedad se categorizaron en tres grupos, de acuerdo al PBF. El PBF promedio de las semillas en las dos variedades analizadas en 2004 difiere significativamente ( $p=0.0001$ ) media =  $19.63\pm 2.31g$ , para ‘Haden’, y para ‘Manila’, media =  $11.77\pm 1.23g$ .

En el cuadro 22 y figura 21 se presentan los grupos de semillas categorizados por PBF para las variedades ‘Haden’ y ‘Manila’ en el año 2004. Las diferencias de PBF de semilla entre los grupos dentro de cada variedad también fueron significativas ( $p=0.0003$ ).

En el año 2005 se colectó además la variedad ‘Ataulfo’ (Cuadro 22), el PBF promedio de las semillas entre las tres variedades resultó significativamente diferente ( $p=0.00001$ ). Dentro de cada variedad, comparando los grupos de PBF de semillas, las diferencias también fueron estadísticamente diferentes (Fig. 22).

El mayor número de semillas se concentró en semillas con PBF medio, como se observa en la figura 23.

Cuadro 22. Categorización del PBF de semillas de las variedades ‘Haden’ y ‘Manila’, colecta 2004 y además ‘Ataulfo’, colecta 2005.

Categoría por PBF de semillas	PBF (g)				
	2004		2005		
	‘Haden’	‘Manila’	‘Haden’	‘Manila’	‘Ataulfo’
<b>Grupo 1 (bajo)</b>	12.8-16.9	4.5-9.9	5.0-12.6	1.6-6.5	1.0-6.9
<b>Grupo2 (medio)</b>	17-22.9	10-13.9	12.7-19.5	6.6-11.3	7.0-12.9
<b>Grupo 3 (alto)</b>	23-30.9	14-17.3	19.6-26.5	11.4-16.1	13.0-19.2

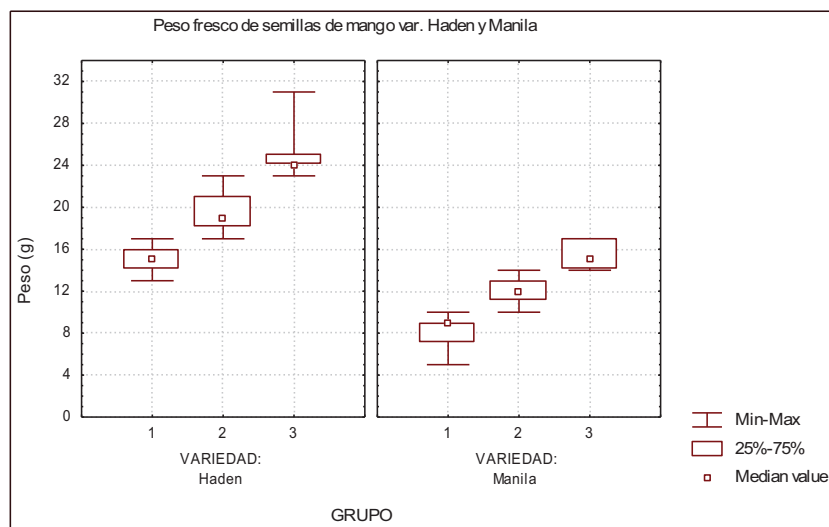


Figura 21. Categorización por grupos de PBF de semillas de mango de las variedades ‘Haden’ y ‘Manila’ (año 2004).

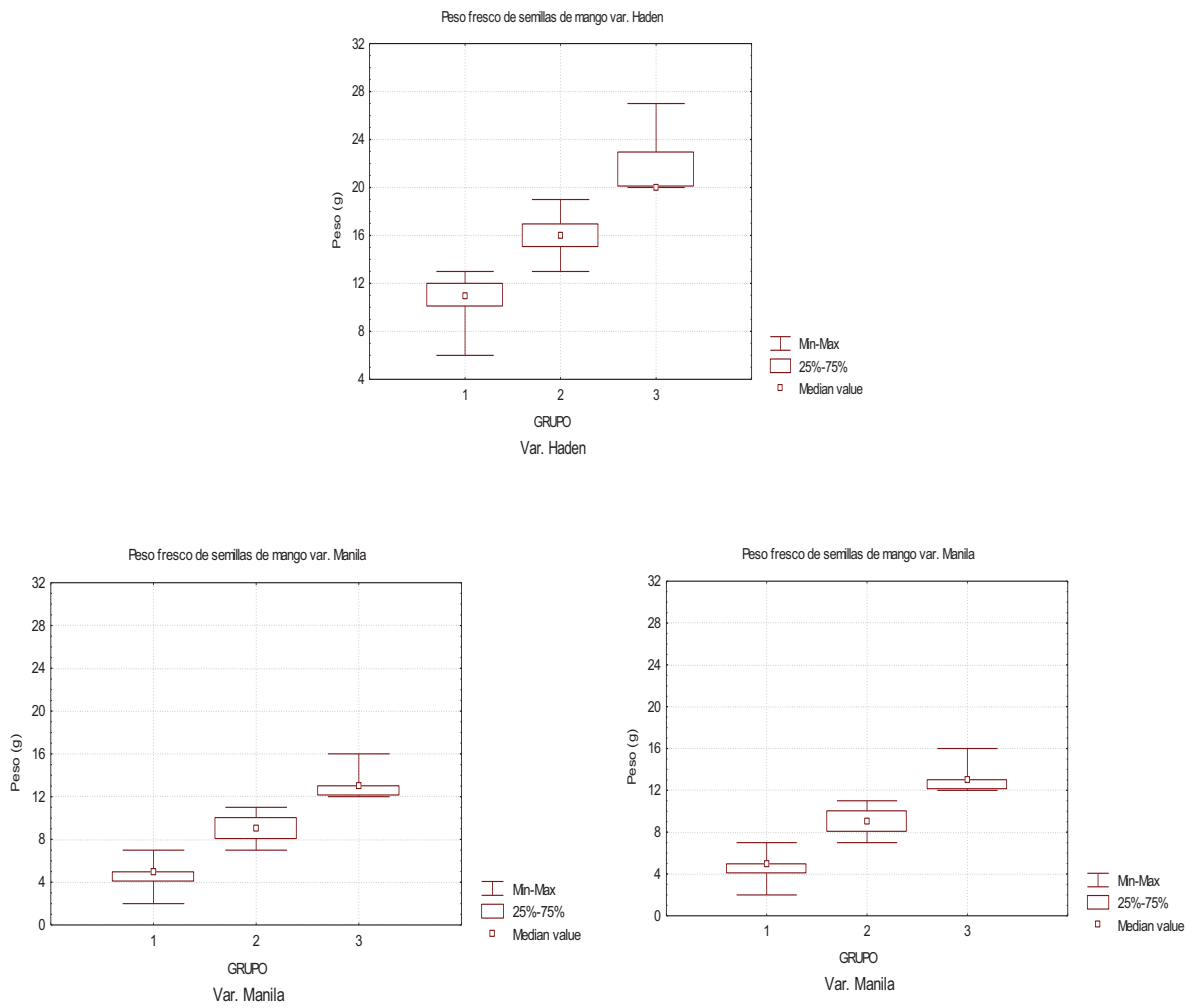


Figura 22. Categorización por grupos de PBF de semillas de mango colectadas en el año 2005. Variedades 'Haden' ( $p = 0.00001$ ), 'Manila' ( $p = 0.001$ ) y 'Ataulfo' ( $p = 0.001$ ).

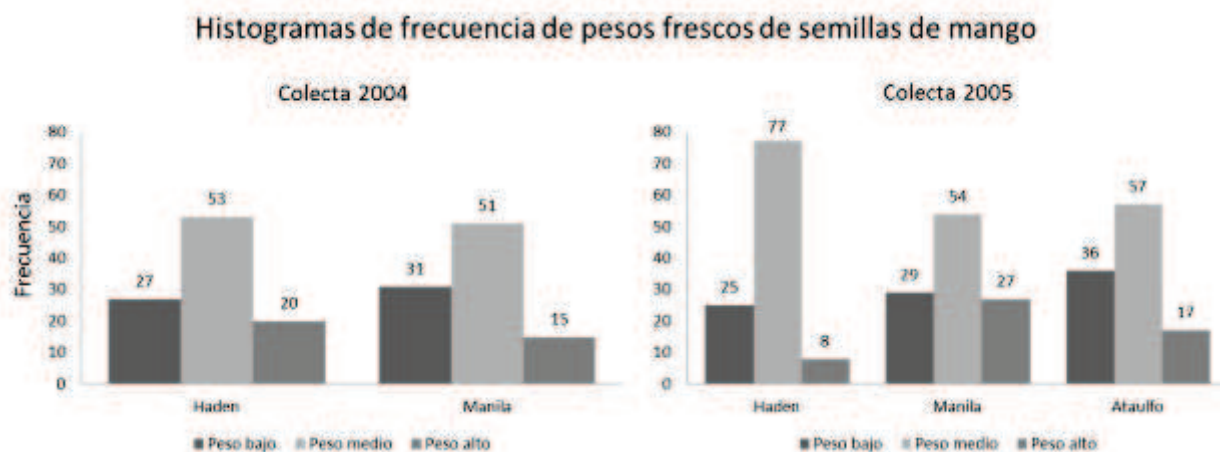


Figura 23. Histograma de frecuencias del PBF de semillas de mango de las variedades ‘Haden’, ‘Manila’ y ‘Ataulfo’

### 7.2.2. Germinación por grupos de semillas categorizadas por PBF

En el cuadro 16 se presentan los parámetros de germinación evaluados durante 16 días por grupos categorizados por PBF de semillas para las variedades ‘Haden’ y ‘Manila’ colectadas en 2004 y 2005 (en este caso, como ya se mencionó anteriormente, se incluye a la variedad ‘Ataulfo’). En la variedad ‘Haden’, en el grupo 1 (semillas de PBF bajo) germinaron 26 de las 27 semillas que lo componen (96.3%), mientras que en los grupos 2 (semillas de PBF medio) y 3 (semillas con PBF alto) germinaron el 100% de las semillas. Las diferencias en la germinación no fueron estadísticamente significativas. Sin embargo, en la variedad ‘Manila’ dentro del grupo 1 germinó sólo el 44% de las semillas, en el grupo 2 el 62% y en el grupo 3 se presentó el porcentaje más alto de germinación (73%). En la variedad ‘Manila’ sí se observa la tendencia de que el grupo 1, con menor PBF, germina en menor porcentaje que

el de las semillas con PBF medio (grupo 2) y éstas a su vez menor que el grupo 3 de semillas con mayor PBF, las diferencias respecto al grupo 1 fueron estadísticamente significativas.

En el año 2005, las semillas del grupo 1 (pequeñas) germinaron en menor porcentaje (88% en ‘Haden’ y 89.7% en ‘Manila’) que las del grupo 2 (94.8 y 98.1%, respectivamente) y éstas a su vez tuvieron una germinación menor que el grupo 3 (100% en ambas variedades). Las diferencias son estadísticamente significativas en el caso de la variedad ‘Haden’, pero no son suficientemente claras en la variedad ‘Manila’. En la variedad ‘Ataulfo’, en los grupos 1 y 2 el porcentaje de germinación fue similar (88.9 y 85.9%), mientras que el grupo 3 presentó 94.1% de germinación, las diferencias tampoco resultaron significativas en este caso.

Existe cierta tendencia en que el PBF de la semilla en las variedades de mango, entre los grupos afecta la capacidad y la velocidad de germinación, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas en algunos casos. En resultados de otro trabajo similar, los autores encontraron que el PBF de la semilla en mango de la variedad ‘Espada’ no afecta a la germinación (Borges *et al.*, 2003). Sin embargo, Wilcox (1984) encontró que en *Ludwigia leptocarpa*, el tamaño de la semilla tiene un efecto significativo sobre la capacidad y la velocidad de germinación.

La producción de semillas con un rango amplio de tamaños posibilita la capacidad de germinar, establecerse y sobrevivir en un también rango amplio de condiciones ambientales; varios estudios reportan que tanto el PBF como el tamaño de la semilla influyen en los procesos anteriores (Silvertown, 1981; Willson, 1983; Wilcox, 1984; Westoby *et al.*, 1992; 1996; Geritz, 1995; Bonfil, 1998; Parisot, 1988; Leishman *et al.*, 2000; Leishman y Westoby,

1993 y 1994; Borges *et al.*, 2003; Fenner y Thompson, 2005). Las semillas más grandes tienen ventaja en la germinación, establecimiento y supervivencia (Herrera *et al.*, 1994; Leishman y Westoby, 1994; Jakobsson y Eriksson, 2000; Susko y Lovett-Doust, 2000; Paz y Martínez-Ramos, 2003; Alcántara y Rey, 2003).

El índice de germinación, además de presentar diferencias significativas entre las variedades (es mayor en la variedad ‘Haden’, ver Cuadro 21) también las presenta entre grupos. Cabe destacar que el grupo 2 muestra valores en el índice de germinación más altos que los otros dos grupos en cada variedad, en los años 2004 y 2005 (Cuadro 23). Lo anterior puede ser debido a que el grupo 2 (semillas de PBF medio) está conformado por un mayor número de individuos (Fig. 23).

Cuadro 23. Parámetros de germinación por grupos categorizados por PBF de semillas durante los años 2004 y 2005.

Año de colecta	Variedad	Grupo categorizado por PBF de semillas	Capacidad de germinación (%)	TMG (Días)	IG
2004	‘Haden’	1	96.3a	5.9a	291
		2	100a	6.4a	575
		3	100a	5.7a	221
	‘Manila’	1	44a	12.8b	61
		2	62b	11.5a	152
		3	73b	12a	48
2005	‘Haden’	1	88a	3.3a	302
		2	94.8ab	3.5a	977
		3	100b	3.7a	109
	‘Manila’	1	89.7a	6.7a	248
		2	98.1a	6.4a	484
		3	100a	6.3a	280
	‘Ataulfo’	1	88.9a	5.5a	349
		2	85.9a	5.3a	511
		3	94.1a	5.7a	161

abc=Promedios por año entre grupos categorizados por PBF de semillas en las variedades de mango con diferente letra son estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ). n=de 8 a 77 semillas de acuerdo al grupo y variedad (ver Fig. 23). TMG, Tiempo Medio de Germinación; IG, Índice de germinación. Grupo 1, semillas de PBF bajo; Grupo 2, semillas de PBF medio; Grupo 3, semillas de PBF alto.



### ***7.2.3. Relación entre el PBF de la semilla y el porcentaje de germinación entre y dentro de las variedades.***

Existe una relación positiva ( $r^2 = 0.76$ ;  $p = 0.02$ ) entre el PBF de la semilla y la capacidad de germinación en las variedades ‘Haden’ y ‘Manila’ analizadas en el año 2004. Las semillas de la variedad ‘Haden’ que presentan un mayor PBF en relación a las semillas de la variedad ‘Manila’, germinaron en un mayor porcentaje. El porcentaje de germinación está determinado en un 76% por el PBF de la semilla (Cuadro 24).

Para el año 2005 se corroboró que la germinación entre variedades presenta una relación positiva débil con el PBF de la semilla: el porcentaje de germinación está explicado por el PBF de la semilla en un 40% (Cuadro 24).

Al realizar el análisis de correlación por grupos para cada variedad se encontró que en el año de colecta 2004, ‘Haden’ presentó una relación positiva  $r^2 = 0.75$ , mientras que en 2005 la  $r^2 = 0.97$ , lo cual indica que el porcentaje de germinación en la variedad ‘Haden’ está determinado en 75 y 97% por el PBF de la semilla en 2004 y 2005 (Cuadro 25). La variedad ‘Manila’ presentó relaciones positivas fuertes en los dos años evaluados: en 2004 el PBF de la semilla influyó sobre la capacidad de germinación en un 99%, mientras que en 2005 la germinación estuvo determinada por el PBF de la semilla en un 89%. En 2005, la capacidad de germinación de la variedad ‘Ataulfo’ estuvo determinada por el PBF de la semilla sólo en un 49% (Cuadro 25).

Cuadro 24. Coeficiente de determinación ( $r^2$ ) entre el PBF de la semilla y la capacidad de germinación entre las variedades de mango ‘Haden’ y ‘Manila’ en las colectas 2004 y 2005.

Capacidad de germinación (%)	PBF de semillas (g)	
	2004	2005
	0.76	0.40
	P=0.02	P<0.064

Cuadro 25. Coeficiente de determinación ( $r^2$ ) entre el PBF de semillas y la capacidad de germinación entre grupos categorizados por PBF de semillas dentro de las variedades de mango ‘Haden’, ‘Manila’ y ‘Ataulfo’ en las colectas 2004 y 2005.

Capacidad de germinación (%)		PBF de semillas (g)		
		‘Haden’	‘Manila’	‘Ataulfo’
2004		0.75	0.99	
		P<0.3	P=0.03	
2005		0.97	0.89	0.49
		P<0.09	P<0.2	P=0.5

Araóz y col. (2004) señalan que el tamaño y peso de las drupas, endocarpos y semillas puede influir sobre la germinación y el vigor de las plántulas, lo cual puede atribuirse a la mayor cantidad de sustancias de reserva en las semillas más grandes. La abundancia de reservas en las semillas podría asegurar un periodo de establecimiento más prolongado en un nuevo ambiente, por lo que los tamaños de semilla y plántula estarían normalmente correlacionados (Hellum, 2000; Sorensen y Campbell, 2000). Tales relaciones se han observado en distintas especies como alfalfa (Beveridge y Wilsie, 1959), *Cicer* (Towsend, 1972), *Falcatus* (Towsend, 1972), trigo (Rogler, 1954; Lafond y Baker, 1986; Gan y Stobbe, 1996) y jute (Bhattacharjee *et al.*, 2000). Wetzel (1985) encontró que el vigor y la germinación de plantas de soya aumentan con el tamaño de semilla. Sin embargo, los resultados en ese sentido son un tanto controvertidos, otros autores no han logrado establecer tal relación (Illipront *et al.*, 1999). En *Bertholletia excelsa* el tamaño de la semilla no incide sobre la germinación (Kainer *et al.*, 1999). Sturion (1990) reportó que el poder germinativo y la

sobrevivencia de las plántulas se relacionan con la procedencia (parámetros ecológicos y ambientales) y no con el tamaño de las semillas.

#### ***7.2.4. Germinación de semillas poliembriónicas***

Las semillas poliembriónicas de las variedades ‘Manila’ y ‘Ataulfo’ presentan más de un embrión funcional. A partir de cada semilla se originan entre 1 y 9 plántulas (Fig. 24), cuyas radículas y epicótilos pueden emerger de forma sincrónica o asincrónica. De acuerdo con Garner y Chaudhri (1976), frecuentemente se pueden observar alrededor de tres a ocho plántulas que se originan de una sola semilla poliembriónica, aunque se han podido reconocer hasta 30 o más embriones en una sola semilla poliembriónica de mango (Juliano, 1934 y 1937). En semillas poliembriónicas de mango del Sur y Norte de la India, Iyer y Degani (1997) observaron que el número de embriones por semillas es de 2 a 10 y el número de plántulas emergidas de 1 a 7. La capacidad de germinación reportada en las semillas poliembriónicas es del 40.6 al 87.5% (Iyer y Degani, 1997). En la variedad poliembriónica ‘Pico de Loro’ se reporta el 90% de germinación.

En este estudio, durante la cosecha del año 2004, en la variedad ‘Manila’ el 67% de las semillas germinadas dio origen a una sola plántula, el 16% originó plántulas dobles, el 9% de las semillas plántulas triples, 5% originó cuatro plántulas y solamente el 3% dio origen a cinco plántulas por semilla (Cuadro 26), obteniéndose un total de 94 plántulas emergidas para la variedad ‘Manila’.

En 2005, el porcentaje de germinación de la variedad ‘Manila’ fue más alto comparado con el 2004, germinó el 96.4% de las semillas, lo que corresponde a 106 semillas germinadas de las 110 que se sembraron. Varias de estas semillas presentaron más de un embrión funcional, de las cuales el 8.8% originó una sola plántula, el 18.4% dió origen a dos plántulas, 38.4, 22.4 y 12% corresponden a semillas que presentaron 3, 4 y 5 plántulas (Cuadro 26), lo que dió por resultado un total de 284 plántulas germinadas. En la variedad ‘Ataulfo’ el porcentaje de germinación fue de 88.2%, es decir, germinaron 97 semillas de las 110 sembradas, cada semilla presentó entre 1 y 5 embriones funcionales (germinados). De estas semillas el 5.98% germinó originando una sola plántula, el 23.23% originó dos plántulas, el 29.57% dió origen a tres plántulas, el 32% originó cuatro plántulas y el 8.08% cinco plántulas, contabilizándose un total de 250 plántulas para la variedad ‘Ataulfo’.

En el año 2006 las semillas presentaron entre 3 y 9 embriones funcionales en la variedad ‘Manila’, y no hubo semillas que originaran plántulas únicas o dobles: el 4% de las semillas originó tres plántulas, el 18% cuatro, el 26% de las semillas presentaron 5 y 6 embriones funcionales, el 12% de las semillas 7 y 8 embriones y en el 2% de las semillas germinaron hasta 9 embriones. La variedad ‘Ataulfo’ presentó hasta ocho embriones funcionales, el 10% de las semillas presentaron plántulas triples, en 22% germinaron 4 plántulas, en el 24% germinaron 5 plántulas, en el 30% de las semillas germinaron 6 plántulas, en el 12% y 2% emergieron 7 y 8 plántulas, respectivamente (Cuadro 26).

En el año 2008, las semillas de la variedad ‘Manila’ originaron de una a tres plántulas por semilla y ‘Ataulfo’ un máximo de cuatro plántulas, mientras que en la cosecha del año

2009, tanto en la variedad ‘Manila’ como en la ‘Ataulfo’ las semillas produjeron un mayor número de plántulas únicas o dobles (Cuadro 26).

La poliembrionía puede ser afectada por factores ambientales y variar de acuerdo a la variedad y de un año de producción a otro en la misma planta. El número de embriones por semilla varía también en el mismo árbol. Mathews y Litz (1992) y Brettell y col. (2004) sugieren que las altas temperaturas durante las fases de floración y desarrollo del fruto pueden provocar que algunas variedades monoembriónicas produzcan semillas poliembriónicas o que, como ocurre en el caso de la variedad ‘R2E2’ que produce predominantemente semillas poliembriónicas, en algunas estaciones se presente 30% de semillas monoembriónicas (Bally, 1998; Bally *et al.*, 2009). La poliembrionía parece estar influida por un simple gen dominante (Aron *et al.* 1998; Brettell *et al.*, 2004). En las semillas estudiadas en este trabajo, la frecuencias de plántulas únicas y múltiples varía con el año de producción, a pesar de que solamente en los años 2005 y 2008 se reportó la aparición de eventos climáticos distintos (como ya se comentó previamente, en 2005 se adelantó la floración y cosecha de frutos y en 2008 se presentó un largo invierno frío).

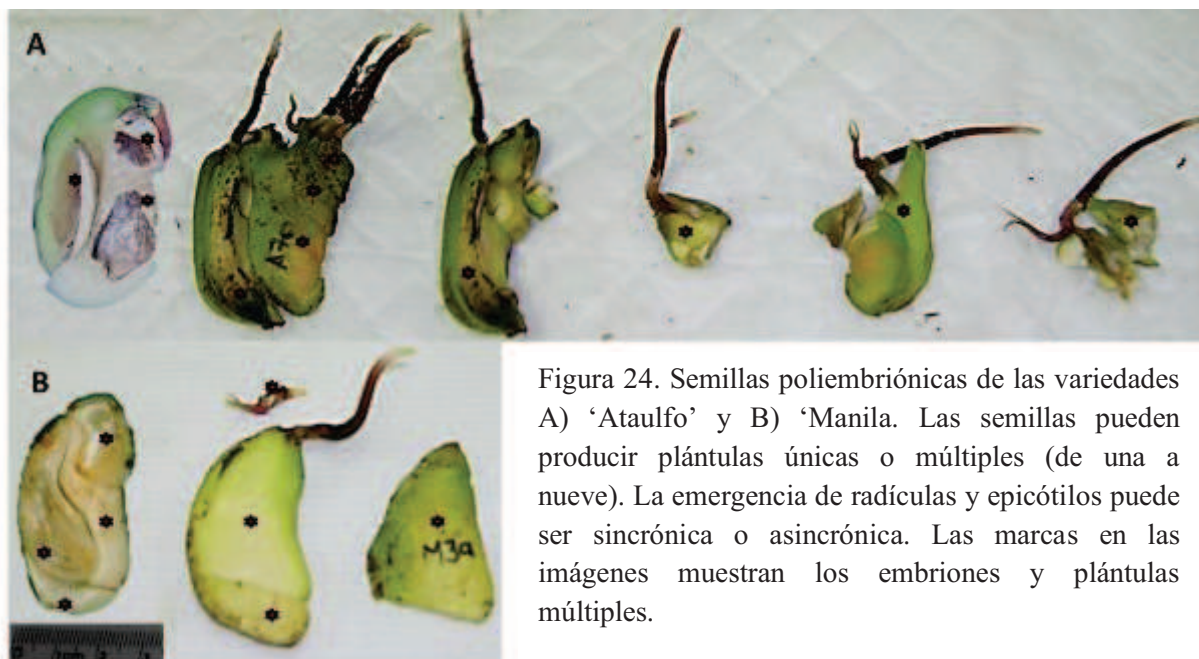


Figura 24. Semillas poliembriónicas de las variedades A) ‘Araulfo’ y B) ‘Manila. Las semillas pueden producir plántulas únicas o múltiples (de una a nueve). La emergencia de radículas y epicótilos puede ser sincrónica o asincrónica. Las marcas en las imágenes muestran los embriones y plántulas múltiples.

Cuadro 26. Aparición de plántulas múltiples en las variedades de mango poliembriónicas en los años de colecta 2004, 2005, 2006, 2008 y 2009.

Año de colecta	Variedad	Frecuencia (%) de aparición de plántulas múltiples									Total de plántulas emergidas/semillas sembradas
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
2004	‘Manila’	67	16	9	5	3	0	0	0	0	94/110
2005	‘Manila’	8.8	18.4	38.4	22.4	12	0	0	0	0	284/110
	‘Araulfo’	5.98	23.23	29.57	32	8.08	0	0	0	0	250/110
2006	‘Manila’	0	0	4	18	26	26	12	12	2	62/50
	‘Araulfo’	0	0	10	22	24	30	12	2	0	75/50
2008	‘Manila’	8.3	70.83	20.83	0	0	0	0	0	0	24/20
	‘Araulfo’	3.03	54.54	33.33	9.09	0	0	0	0	0	33/20
2009	‘Manila’	49.12	36.84	8.77	1.75	1.75	1.75	0	0	0	57/50
	‘Araulfo’	28.81	47.45	15.25	5.08	3.38	0	0	0	0	59/50

Con las semillas de la variedad ‘Manila’ del año 2004, que dieron origen a entre 1 y 5 plántulas, se realizó una gráfica para determinar si aquellas que presentan mayor número de embriones funcionales tienen un mayor PBF (Figura 25). Existen ligeras diferencias entre el

PBF de las semillas con un embrión funcional y las que presentaron entre dos y cinco: las semillas que presentan más de un embrión funcional no necesariamente tienen un mayor PBF, no existe tampoco una correlación alta entre PBF de semilla y número de embriones funcionales ( $r^2 = 0.09$ ).

Pérez y col. (1998) reportan que las semillas poliembriónicas de la variedad 'Pico de Loro' que presentan mayor PBF dieron como resultado menor número de plántulas por semilla, pero con buen desarrollo. Esto difiere a lo reportado por Hartmann y Kester (1987) y Austin y Longden (1967), quienes señalan que en zanahoria existe una relación directa entre el PBF de la semilla y el número de plántulas, que a su vez son de mayor vigor cuando las semillas presentan mayores cantidades de reservas. Corbineau (1988) afirma que las plántulas jóvenes de mango son más vigorosas cuando los embriones son más voluminosos, debido a que las semillas presentan mayor cantidad de reservas. En las semillas poliembriónicas de mango, los embriones difieren en el número y el PBF de sus cotiledones, siendo la germinación más rápida en la medida que los cotiledones son más grandes (Parisot, 1988).

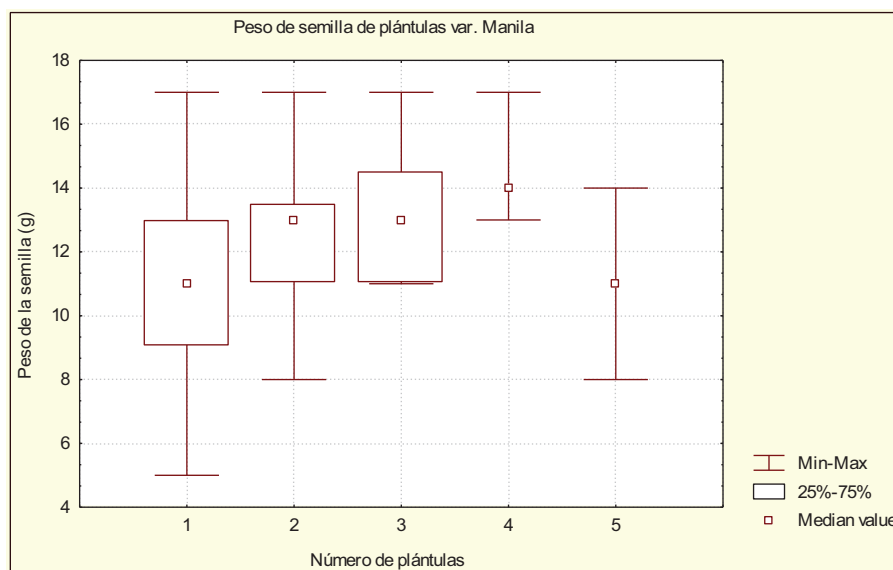


Figura 25. PBF de semillas de mango de la variedad ‘Manila’ con diferente número de plántulas originadas por semilla, datos 2004 ( $F = 2.63$ ;  $p = 0.04$ ).

### 7.3. *Transplante, establecimiento en maceta y sobrevivencia*

De las 99 semillas que germinaron en la variedad ‘Haden’ en el año 2004, 90 de ellas se establecieron como plántulas y fueron transplantadas, mientras que en la variedad ‘Manila’, de las 58 que germinaron solamente 40 de ellas sobrevivieron para ser transplantadas. El transplante se realizó en diferentes días, a medida que el epicótilo de las plántulas alcanzó entre 3 y 8 cm. El transplante en la variedad ‘Haden’ fue más rápido debido a que las semillas germinaron también de manera más acelerada que las de la variedad ‘Manila’.

Al finalizar el transplante de todas las plántulas, se evaluó el establecimiento (se consideró que las plántulas estaban establecidas cuando las hojas comenzaron a desarrollarse, aproximadamente 20 días después de la fecha del primer transplante). En el caso de la



variedad 'Haden', de 90 plántulas transplantadas 86 sobrevivieron. En la variedad 'Manila', de las 40 plántulas transplantadas 38 sobrevivieron (Fig. 26). Las diferencias en el porcentaje de sobrevivencia entre las dos variedades son significativamente diferentes ( $p=0.001$ ): el porcentaje de sobrevivencia hasta el momento del establecimiento fue mayor en la variedad 'Haden'.

La figura 27 representa el porcentaje de sobrevivencia para la colecta del año 2005, en la variedad 'Haden' germinó el 93.6% de las semillas, sobreviviendo 82.7% de las plántulas, que fueron transplantadas. El mismo porcentaje consiguió establecerse en las macetas. De la variedad 'Manila' se transplanto el 79.1% de las plántulas, ya que el 17% de las plántulas que habían germinado no sobrevivió para ser transplantadas, y se establecieron en maceta el 73.7% de las plántulas. En la variedad 'Ataulfo' germinó el 88.2% de las semillas sembradas, el 70% de las plántulas se transplantó y se establecieron en macetas el 50.9% (Fig. 27). Los datos anteriores indican que para el año 2005 el mayor porcentaje de sobrevivencia hasta el establecimiento lo presentaron las plántulas de la variedad 'Haden', seguido por la variedad 'Manila' y el menor porcentaje de plántulas establecidas corresponde a la variedad 'Ataulfo'. Las diferencias son estadísticamente significativas entre las tres variedades ( $p=0.01$ ). A pesar de que la acumulación de reservas en cada embrión puede ser mayor en las semillas poliembriónicas, como se ve en la figura 18, en éstas el tamaño y PBF de cada embrión es más pequeño que en el embrión de una variedad monoembriónica. Si se considera que las semillas poliembriónicas presentan entre 1 y 9 embriones, entonces queda claro que las semillas con mayor cantidad de nutrientes en los cotiledones son las monoembriónicas de 'Haden'. Como se mencionó anteriormente, el tamaño de la semilla se considera como indicador de calidad

fisiológica, ya que aquéllas más grandes o de mayor PBF muestran mejor germinación, vigor y sobrevivencia (Aguiar, 1995). El tamaño de la semilla juega un papel importante en los procesos de germinación y establecimiento durante las primeras fases del desarrollo de plántulas dentro de una población (Harper y Obeid, 1967; Milberg *et al.*, 1996; Kidson y Westoby, 2000; Baloch *et al.*, 2001). Las semillas de las variedades poliembriónicas sobrevivieron en menores porcentajes para ser transplantadas, esto posiblemente debido a la poca cantidad de reservas disponibles en los embriones, las cuales son necesarias para el crecimiento inicial de las plántulas en forma de carbohidratos, lípidos y proteínas, de ahí que se obtuvieron plántulas de poco vigor y estas plántulas pueden no ser capaces de resistir condiciones desfavorables, con lo que sucumbirían más rápidamente ante el ataque de patógenos (Hartmann y Kester, 1987; Pérez *et al.*, 1998).

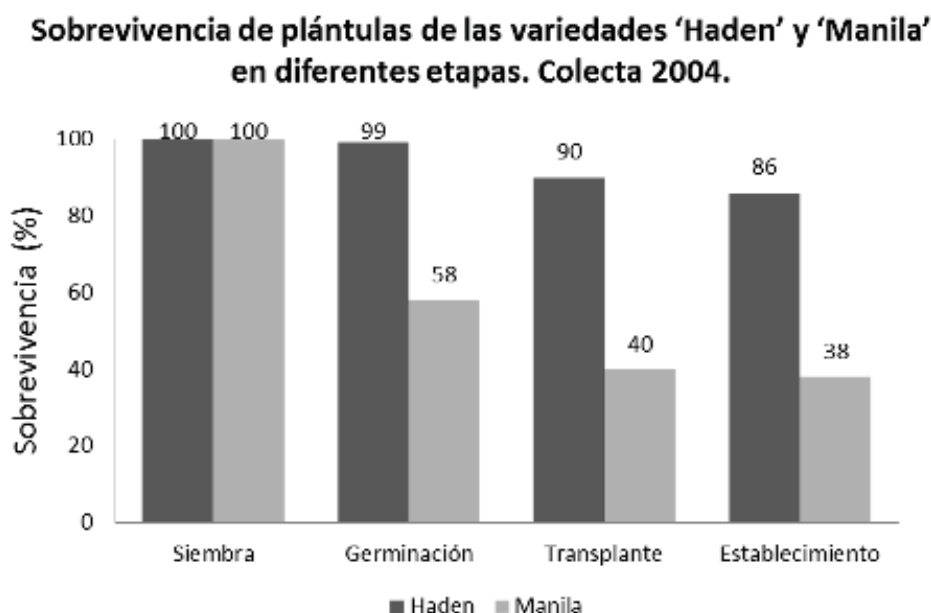


Figura 26. Porcentaje de sobrevivencia de semillas de mango de las variedades 'Haden' y 'Manila' desde la siembra hasta el establecimiento en macetas en el año 2004 ( $F = 0.53$ ;  $p = 0.001$ ).

**Sobrevivencia de plántulas de las variedades ‘Haden’, ‘Manila’ y ‘Ataulfo’ en diferentes etapas. Colecta 2005.**

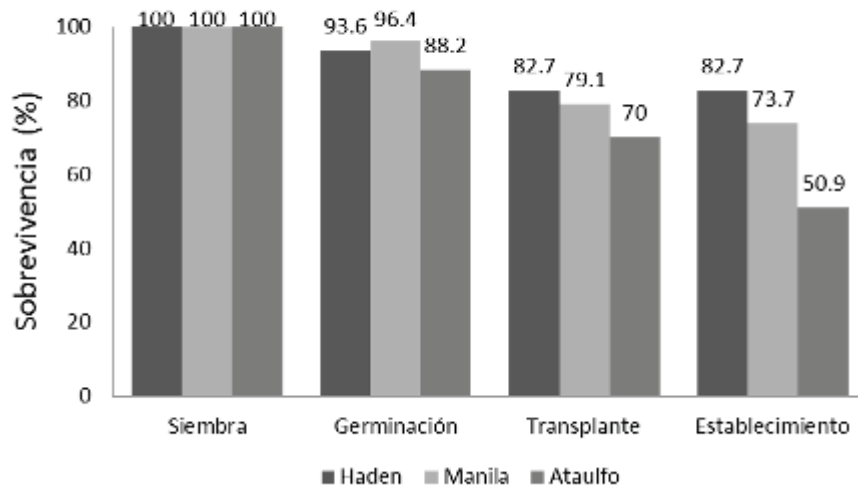


Figura 27. Porcentaje de sobrevivencia de semillas de mango de las variedades ‘Haden’, ‘Manila’ y ‘Ataulfo’ desde la siembra hasta el establecimiento en macetas en el año 2005 ( $p=0.01$ ).

En el Cuadro 27 se observa que el grupo 1 (semillas de PBF bajo) presenta un porcentaje de sobrevivencia menor en la variedad ‘Haden’ en el año 2004 hasta el momento del establecimiento (70%), las diferencias no son significativas ( $p<0.11$ ). En el año 2005 es el grupo 2 el que presenta menor porcentaje de sobrevivencia. En la variedad ‘Manila’ las semillas del grupo 1 también presentan el menor porcentaje de sobrevivencia ( $P=0.025$ ) en los dos años analizados. En la variedad ‘Ataulfo’ durante el año 2005 se observa la misma tendencia.

Los resultados de sobrevivencia obtenidos para la variedad ‘Manila’ son similares a los encontrados por Bonfil (1998), quien reporta que el tamaño de las semillas afecta claramente

la sobrevivencia en *Quercus rugosa*, las semillas más grandes presentaron un mayor porcentaje de sobrevivencia que las semillas pequeñas.

Cuadro 27. Sobrevivencia de plántulas de las variedades ‘Haden’ y ‘Manila’ en el año de colecta 2004 y además ‘Ataulfo’ en 2005, categorizadas por PBF de semilla, durante cuatro etapas de evaluación: siembra, germinación, transplante y establecimiento.

Año de colecta	Variedad	Grupo categorizado por PBF de semillas	Siembra	Germinación	Transplante	Establecimiento
2004	‘Haden’	1	100	96.3	75	70
		2	100	100	98	92
		3	100	100	90	90
	‘Manila’	1	100	44	19	14
		2	100	62	40	37
		3	100	73	66	66
2005	‘Haden’	1	100	88	88	88
		2	100	94.8	79	78
		3	100	100	88	88
	‘Manila’	1	100	89.7	52	52
		2	100	98.1	60	60
		3	100	100	71	71
	‘Ataulfo’	1	100	88.9	75	31
		2	100	85.9	85	48
		3	100	94.1	90	71

Grupo 1, semillas de PBF bajo; Grupo 2, semillas de PBF medio; Grupo 3, semillas de PBF alto.

#### 7.4. Sobrevivencia y Crecimiento de plántulas

##### 7.4.1. Sobrevivencia de variedades

Después del establecimiento, las 86 plántulas sobrevivientes de la variedad ‘Haden’ del año 2004 se consideraron como el 100%, para evaluar el porcentaje de sobrevivencia durante la fase de crecimiento (14 semanas, 98 días, en los cuales se realizaron las observaciones semanalmente). En la variedad ‘Manila’, aunque hasta el establecimiento habían sobrevivido

37 semillas (y dado que es poliembriónica y que algunas de sus semillas presentaron más de un embrión germinado y establecido) al hacer el recuento de plántulas vivas se obtuvieron un total de 94. Estas 94 plántulas de la variedad ‘Manila’ se consideraron como el 100% al inicio de la fase de crecimiento (Cuadro 28). Para el año 2005, la variedad ‘Haden’ presentó un mayor porcentaje de sobrevivencia que las variedades ‘Manila’ y ‘Ataulfo’ durante la fase de crecimiento, siendo las diferencias estadísticamente significativas ( $P=0.004$ ) (Cuadro 28).

Cuadro 28. Sobrevivencia de plántulas de las variedades ‘Haden’, ‘Manila’ y ‘Ataulfo’ en los años de colecta 2004 y 2005. La evaluación se realizó durante 98 días después del establecimiento.

<b>Año de colecta</b>	<b>Variedad</b>	<b>Sobrevivencia (%)</b>
<b>2004</b>	‘Haden’	66±9b
	‘Manila’	47±8a
<b>2005</b>	‘Haden’	64±13b
	‘Manila’	10±7a
	‘Ataulfo’	10±7a

#### **7.4.2. Sobrevivencia de grupos dentro de las variedades**

En el cuadro 23 se observa el porcentaje de sobrevivencia de los tres grupos de plántulas de la variedad ‘Haden’ en la colecta del año 2004: el grupo 3 (semillas con mayor PBF) presentó un porcentaje de sobrevivencia ligeramente menor que el grupo 2 y éste a su vez menor que el del grupo 1. Sin embargo, las diferencias no son significativamente diferentes ( $p<0.17$ ). En la variedad ‘Manila’ no se observa ninguna tendencia clara en cuanto al porcentaje de sobrevivencia, las diferencias en el porcentaje de sobrevivencia tampoco son estadísticamente diferentes ( $P=0.5$ ), por lo que se puede deducir que el PBF de la semilla entre los grupos dentro de cada variedad no afecta a la sobrevivencia. En el año 2005, las variedades ‘Haden’, ‘Manila’ y ‘Ataulfo’ presentan datos similares. Se observa que el grupo 3, de

semillas con mayor PBF, presenta un porcentaje mayor de sobrevivencia que los otros dos grupos (Cuadro 29). Los resultados encontrados en el año 2005 coinciden con los que encontraron Bonfil (1998) y Huerta-Paniagua (2011) para *Q. rugosa*, en la cual el porcentaje de sobrevivencia está afectado directamente por el tamaño de la semilla. Sin embargo, en *Q. lauriana*, Bonfil no encontró un efecto claro del tamaño de la semilla en relación al porcentaje de sobrevivencia, lo que concuerda con los resultados obtenidos en este estudio para la colecta del año 2004.

Cuadro 29. Sobrevivencia de plántulas de las variedades ‘Haden’, ‘Manila’ y ‘Ataulfo’ en los años de colecta 2004 y 2005, categorizadas por grupo de acuerdo al PBF de semillas. La evaluación se realizó durante 98 días después del establecimiento.

Año de colecta	Variedad	Grupo categorizado por PBF de semilla	Sobrevivencia (%)
2004	‘Haden’	1	75±7a
		2	73±8a
		3	66±10a
	‘Manila’	1	45±2ab
		2	38±4a
		3	55±12b
2005	‘Haden’	1	0a
		2	57±3b
		3	71±9c
	‘Manila’	1	10±8a
		2	10±9a
		3	23±2b
	‘Ataulfo’	1	9±3a
		2	18±5b
		3	29±4c

Grupo 1, semillas de PBF bajo; Grupo 2, semillas de PBF medio; Grupo 3, semillas de PBF s alto.

#### 7.4.3. Sobrevivencia de plántulas poliembriónicas de la variedad ‘Manila’

En el cuadro 30 se presenta el número de plántulas de la variedad ‘Manila’ generadas a partir de semillas con 1 hasta 5 embriones funcionales y categorizadas por grupos de acuerdo

al PBF de semilla en el año de colecta 2004. Las plántulas que sobrevivieron en mayor porcentaje fueron las que se originaron a partir de semillas con un solo embrión funcional y posteriormente las de 2, 3, 4 y, finalmente, 5 embriones funcionales ( $P=0.003$ ) (Cuadro 31). Estas plántulas se distribuyeron dentro de los grupos sin importar el PBF, ya que como anteriormente se mencionó, el PBF de la semilla no condiciona el número de plántulas producidas por semilla.

Las primeras plántulas emergidas de las semillas poliembriónicas de la variedad 'Manila' que produjeron plántulas únicas, sobrevivieron hasta el final de la evaluación (14 semanas después del establecimiento) y presentaron un porcentaje de sobrevivencia igual o mayor que el de las segundas, terceras, cuartas y quintas plántulas producidas (Cuadro 31).

Las diferencias en el porcentaje de sobrevivencia en las plántulas que emergen primero no fueron significativas entre las plántulas provenientes de semillas poliembriónicas (1 a 5 plántulas por semilla) ( $p=0.06$ ), es decir, no necesariamente las plántulas únicas presentan un porcentaje de sobrevivencia mayor que las plántulas emergidas primero y producidas a partir de dos, tres, cuatro y cinco embriones funcionales, o viceversa. La sobrevivencia de las primeras plántulas emergidas no depende del número de embriones que comparten los recursos de una misma semilla. Las plántulas que sobreviven en menor porcentaje son las últimas que emergen.

Sen y Mallik (1940) señalan que la variación en el desarrollo, vigor y sobrevivencia entre embriones sexuales y nucelares están determinados por la posición del embrión en la semilla. Es posible que la diferencia en el vigor de las plántulas esté dada más por la ubicación

del embrión en la semilla, así como por la cantidad de reservas almacenadas en los cotiledones de cada embrión.

Cuadro 30. Plántulas establecidas por grupos de PBF de semillas poliembriónicas de la variedad 'Manila' en la colecta 2004 (las semillas originaron entre 1 y 5 plántulas).

Grupo	Plántulas establecidas a partir de 1 a 5 embriones funcionales					Total
	1	2	3	4	5	
1	16	0	0	0	1	17
2	38	13	5	2	0	58
3	9	2	3	3	2	19
	63	15	8	5	3	94
<b>Porcentaje</b>	<b>67</b>	<b>16</b>	<b>9</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	

Grupo 1, semillas de PBF bajo; Grupo 2, semillas de PBF medio; Grupo 3, semillas de PBF alto.

Cuadro 31. Supervivencia de plántulas de la variedad 'Manila' provenientes de semillas con uno a cinco embriones funcionales. Colecta 2004.

Número de embriones funcionales	Número de plántulas	Supervivencia (%)
1	1	50
2	1	42±14 <sup>a</sup>
	2	42±14 <sup>a</sup>
3	1	100b
	2	40±10 <sup>a</sup>
	3	40±10 <sup>a</sup>
4	1	100b
	2	100b
	3	34±9 <sup>a</sup>
	4	34±9 <sup>a</sup>
5	1	100
	2	100
	3	50±10
	4	50±10
	5	0

Grupo 1, semillas de PBF bajo; Grupo 2, semillas de PBF medio; Grupo 3, semillas de PBF alto.



#### 7.4.4. Características morfológicas de la raíz y el tallo de las plántulas de mango

Una vez que se extrajeron las semillas del endocarpo y se colocaron sobre agrolita estéril humedecida con agua, las semillas absorbieron el agua y dió comienzo el proceso de germinación hipogea. Concluido el proceso de germinación, el reto para las plántulas es emerger del suelo y alcanzar la luz y de esta

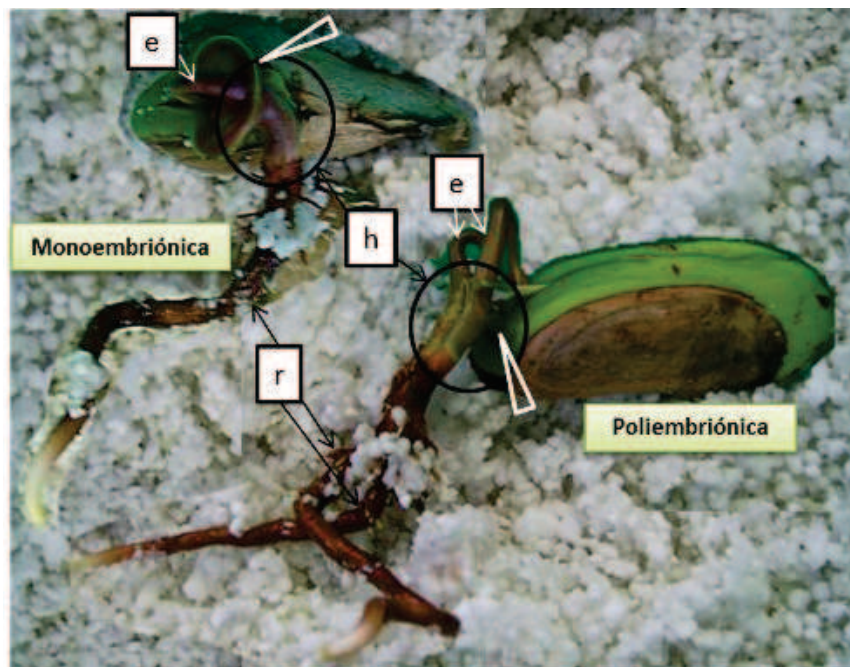


Figura 28. Emergencia de radícula y epicótilo en semillas de las variedades monoembriónica 'Haden' y poliembriónica 'Manila'. La radícula y el epicótilo están unidos al eje hipocótilo-radicular. El círculo marca el ejehipocótilo-radicular y la flecha, los cotiledones que permanecen unidos a éste. e, epicótilo; h, eje hipocótilo-radicular; r, radícula.

manera iniciar los procesos de fotosíntesis y de asimilación (Herrera *et al.*, 2006). Tanto en las variedades poliembriónicas como en la monoembriónica, emerge primeramente el eje hipocótilo-radicular junto con la radícula en uno de sus extremos por debajo del sustrato. El eje hipocótilo-radicular que permanece unido a los cotiledones se extiende y por el otro extremo emerge el epicótilo con los primordios foliares, que formarán el tallo y las hojas. En la variedad 'Haden' el epicótilo emerge de uno a tres días después de que ha emergido la radícula y en las variedades poliembriónicas ('Manila' y 'Ataulfo') el epicótilo tarda en emerger entre 2 a 7 días después de que ha germinado la radícula (Fig. 28).

El embrión junto con los cotiledones conforma la semilla adulta. Los cotiledones ocupan gran parte de la semilla del mango y después de la germinación permanecen funcionales, principalmente como órganos de reserva y fotosintéticos, en el caso de que queden expuestos sobre el sustrato y puedan alcanzar la luz. Durante las primeras etapas del desarrollo de las plántulas, el embrión depende completamente de la transferencia de material de reserva de los cotiledones. En las plántulas con germinación hipogea, los cotiledones completan su función después de transferir los nutrientes almacenados y en el momento en que las hojas comienzan a realizar los procesos fotosintéticos (Ampofo *et al.*, 1976). En las variedades ‘Manila y ‘Ataulfo’, una vez que comienzan a desarrollarse las hojas, los cotiledones agotan sus reservas y se marchitan, pero no siempre se caen, en la mayoría de los casos quedan adheridos durante largos períodos de tiempo a una de las plántulas producidas por las semillas de las variedades poliembriónicas. En la variedad ‘Haden’ los cotiledones pueden permanecer verdes incluso después de medio año a partir de la germinación y aún secos permanecen adheridos a las plántulas, en algunos casos hasta durante más de dos años.

Cuando emerge la radícula, ésta presenta un color blanquecino y rosado en la parte de la caliptra y posteriormente se torna parda (Fig. 29a). El sistema radical se caracteriza por una raíz pivotante primaria y comienza entonces a desarrollarse el sistema de coronas de raíces adventicias cerca del cuello de la plántula, la raíz crece rápidamente y se forman raíces secundarias o laterales que se alargan rápidamente.

Poco antes de la emergencia del epicótilo, los cotiledones comienzan a tornarse de color blanquecino a amarillo verdoso y verde claro. La raíz puede alcanzar entre 10 a 12 cm cuando el epicótilo tiene de 3 a 5 cm de longitud. La raíz presenta entre 8 y 15 coronas de raíces

adventicias cuando las plántulas son transplantadas, lo cual ocurrió cuando el epicótilo de las plántulas alcanzó entre 3 y 8 cm en la variedad ‘Haden’ y entre 1 y 8 cm en las variedades poliembriónicas. En las semillas de las variedades poliembriónicas emergen de forma sincrónica o asincrónica varias raíces en la misma posición o en diferentes zonas, de acuerdo a la ubicación de los embriones (Fig. 29b - i). Al momento del transplante el tallo presentó entre 4 y 8 hojas pequeñas en las tres variedades estudiadas.

Tanto en la variedad monoembriónica como en las poliembriónicas, el epicótilo emerge curvado (Fig. 30a, b y c) y cuando se libera completamente adquiere una posición vertical (Fig. 30 d). En el momento de la emergencia, el epicótilo presenta cuatro primordios foliares. El crecimiento de la parte aérea se da a partir de las células meristemática ubicadas en el ápice del tallo (yemas apicales) y en las axilas de las hojas (yemas laterales y axilares). A partir de los meristemas de las yemas apicales se desarrollan los primordios de nudos, hojas y brotes (Fig. 30e), adquiriendo así una mayor altura (crecimiento ortotrópico). En cada nudo formado en el tallo se desarrollan una o dos hojas alternas simples. Después de 14 semanas de evaluación del crecimiento, las plántulas de la variedad ‘Haden’ pueden formar hasta 12 hojas, la variedad ‘Manila’ hasta 8 hojas y la variedad ‘Ataulfo’ un máximo de 9 hojas.

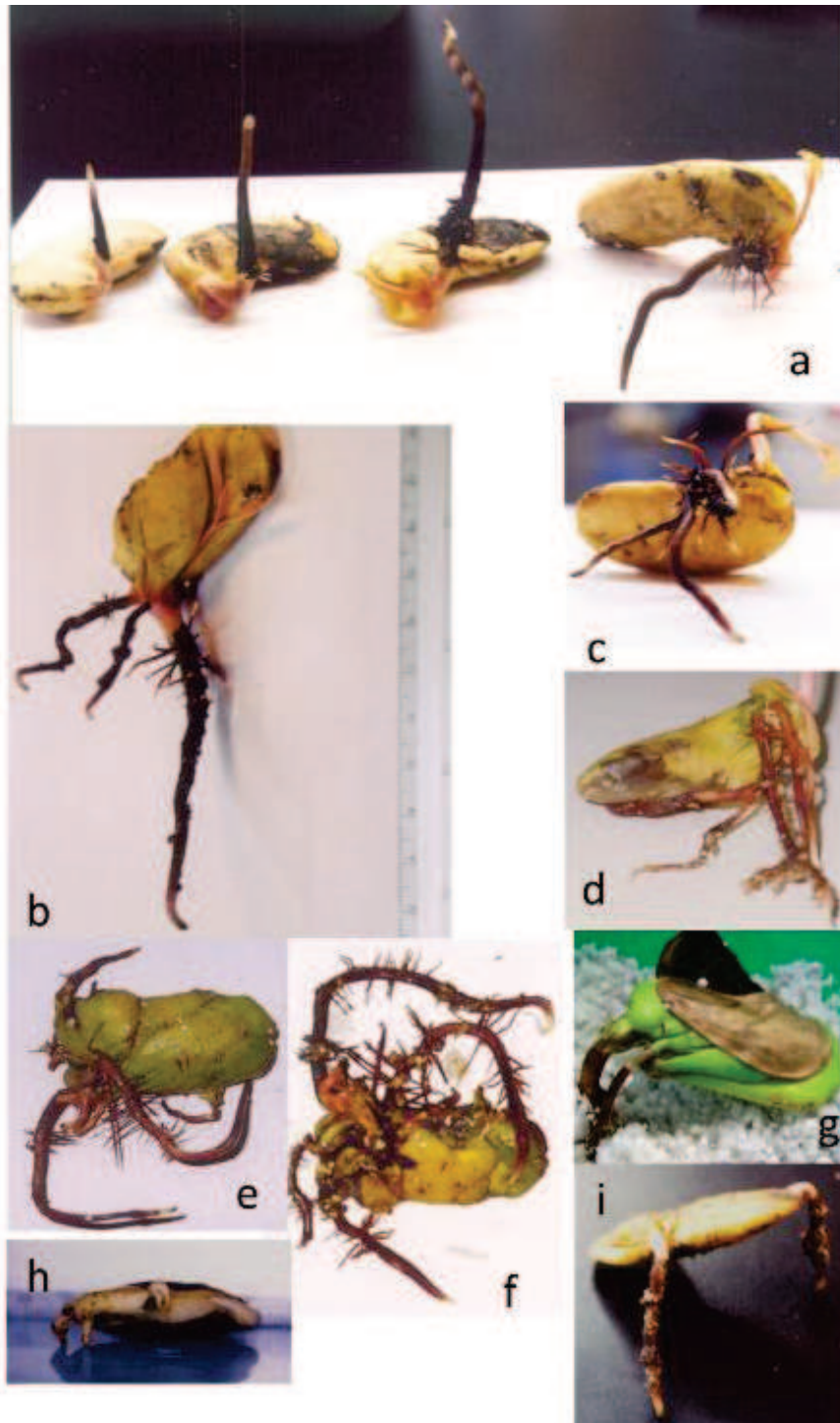


Figura 29. Semillas de mango germinadas, a) desarrollo de raíz y emergencia de epicótilo en la variedad monoembriónicas ‘Haden’; b, c y d) emergencia de varias raíces en un mismo sitio de la semilla en las variedades poliembriónicas ‘Manila’ y ‘Ataulfo’; e, f, g, h, i) emergencia de varias raíces en distintos sitios de las semillas en las variedades poliembriónicas ‘Manila’ y ‘Ataulfo’.



Figura 30. Emergencia y crecimiento del epicótilo de mango. Los círculos señalan los nudos y las yemas apical y lateral.

La lámina de las hojas es elíptica, oblonga, con la base acutada y el ápice acuminado (de acuerdo con los descriptores IPGRI, 1989). El margen es entero con algunos bordes ondulados. La nervadura central y las laterales son muy prominentes (Fig. 31a). En las hojas maduras, la cara superior es dura y brillante, de color verde oscuro (Fig. 31a), mientras que la inferior es verdosa opaca. Tienen una textura áspera o correosa. El crecimiento de las hojas es basípeto, ya que comienza en el ápice y continúa hacia la base, por lo que lo último en formarse es el peciolo. Una vez que se han formado los peciolo de las hojas miden de 5 a 25 mm de largo.

Cuando las hojas son jóvenes presentan color rosado o ámbar (Fig. 32a). Conforme avanza el desarrollo, las hojas adquieren un color verde pálido, se hacen más correosas y toman una posición casi

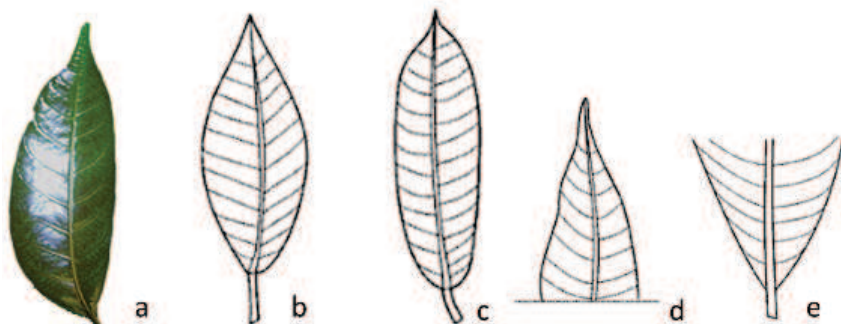


Figura 31. Forma de las hojas maduras de plántulas de mango. a) hoja de forma elíptica-oblonga presentada en las variedades de estudio; b) hoja elíptica; c) hoja oblonga; d) ápice acuminado; e) base acutada (IPGRI, 2006).

perpendicular con relación al tallo (Fig. 32b). Cuando las hojas alcanzan la madurez se tornan de color verde oscuro y en ocasiones los peciolo se levantan casi en posición paralela al tallo (Fig. 32c).



Figura 32. Hojas de mango, a) hojas jóvenes de color rosado o ámbar en el nudo superior y de color verde claro en el nudo inferior; b) hojas en desarrollo de color verde claro; c) hojas maduras con coloración verde oscuro.

Después de 14 semanas de crecimiento, la raíz en las plántulas de las dos variedades poliembriónicas, en la mayoría de los casos, es solo un eje principal con numerosas raicillas adventicias (Fig. 33A), con peso base seca (PBS) entre 0.18 a 0.34 g; mientras que en la variedad 'Haden' existe una gama de formas de crecimiento, desde un solo eje principal con raicillas adventicias hasta más de 30 raíces secundarias con PBS entre 0.64 y 1.54 g (Fig. 33B).

Trocme y Gras (1966) señalan la existencia de una relación entre el volumen de las raíces y la parte aérea, como índice de vigor en relación con el rendimiento. Un mayor volumen de raíces se corresponde con un rendimiento más elevado (Kolesnikov, 1971). Además, existe una relación directa entre raíz y parte aérea en términos de tamaño, la cual observa valores de 0.3 a 0.5 con base en el PBS, representando, el sistema radical, alrededor del 30% del PBS total de la planta (Rogers y Booth, 1959; Kolesnikov, 1971; Atkinson, 1980; Sánchez *et al.*, 2001). La parte radical y la aérea están estrechamente interrelacionadas, tanto sinérgicamente por las aportaciones de cada parte al metabolismo vegetal y al desarrollo de toda la planta, como antagónicamente, en razón de la competencia que existe entre ambas partes, lo que se traduce en que si una de las partes está en crecimiento activo la otra detiene su crecimiento parcial o totalmente (letargo). El letargo es causado por factores ambientales, cuando el letargo se presenta en la parte aérea, los carbohidratos son translocados a tallos y al sistema radical (Becerril *et al.*, 1995), donde son almacenados y, eventualmente, utilizados para la reiniciación del crecimiento vegetal. Por lo tanto, el crecimiento de las plantas se da en flujos de crecimiento radical y aéreo.



Figura 33. Desarrollo de raíces y de la parte aérea de las plántulas de A) las variedades poliembriónicas y B) variedad monoembriónica, después de 14 semanas de crecimiento.



#### ***7.4.5. Evaluación del crecimiento de plántulas***

El crecimiento es el incremento de masa, volumen, longitud o área, que resulta de la división, expansión y diferenciación celular (Lambers *et al.*, 2008). La división celular no puede causar un aumento de volumen, y por lo tanto no conduce a crecimiento en sí, pero, es el marco estructural para la expansión celular posterior (Green, 1976). El crecimiento requiere además, de la elongación celular y la deposición de material en el citoplasma y en las paredes celulares que determinen el incremento en el volumen o la masa (Lambers *et al.*, 2008).

El análisis de crecimiento de plantas requiere de un enfoque integrador que aborde tanto la forma como la función de la planta. Generalmente, se utilizan datos simples de masa (peso), áreas, volúmenes y contenidos de las diferentes partes de la planta (Hunt *et al.*, 2002).

Para evaluar el crecimiento de las plántulas de mango, en este estudio se determinaron los siguientes parámetros: longitud total de la plántula, número de entrenudos, longitud entre entrenudos, número de hojas por entrenudo, número total de hojas en la plántula y área foliar, PBF de la plántula y PBF de las hojas al final de la evaluación de crecimiento y PBS de la plántula y PBS de las hojas después de secar el material a 60 °C durante 2 semanas. Además, se tomaron algunos datos de PBS de plántulas muertas en un tiempo intermedio y se calculó la tasa de crecimiento relativo (RGR).

La longitud entre entrenudos, el número de hojas por entrenudo y el número total de hojas fueron muy variables en el tiempo y entre variedades, ya que el crecimiento de los entrenudos no fue continuo y, aunque en cada nudo se formaron entre dos y cuatro hojas, algunas de estas hojas se caían muy jóvenes y otras, una vez que alcanzaban su tamaño

máximo, comenzaban a secarse y se caían. Por ello, estos parámetros no se tomaron en consideración para el análisis estadístico de crecimiento. Los parámetros que sí se consideraron para este análisis fueron longitud de la plántula, número de entrenudos y área foliar, las curvas de crecimiento se presentan en las figuras 34 a 39.

El crecimiento de las plántulas de la colecta del año 2004 fue considerablemente mayor en la variedad 'Haden', tanto en la longitud total de la plántula como en el número de entrenudos y el área foliar. La longitud promedio que alcanzaron las plántulas de la variedad 'Haden' después de las 14 semanas de evaluación fue de 32 cm, mientras que en las plántulas de la variedad 'Manila' la altura promedio fue de 12.3 cm (Fig. 34). El número promedio de entrenudos en la variedad 'Haden' fue de 3, aunque en algunos casos se acumularon hasta 8 ó 9 entrenudos; la variedad 'Manila' en promedio tiene entre 2 y 3 (Fig. 35). El área foliar fue aproximadamente de 508 y 138 cm<sup>2</sup> para 'Haden' y 'Manila', respectivamente (Fig. 36).

Los parámetros de longitud total de la planta, número de entrenudos y área foliar evaluados para la colecta de 2005 fueron mayores en la variedad 'Haden' que en las variedades poliembriónicas. Sin embargo, alcanzaron una menor longitud (22.37 cm) con respecto al año 2004. Las plántulas de la variedad 'Manila' de 2005 alcanzaron una altura de 19.77 cm en promedio al final de la evaluación, en este caso mayor que la de 2004. La altura de las plántulas en la variedad 'Ataulfo' fue similar a la de la variedad 'Manila' (18.93 cm). Las diferencias de longitud entre las tres variedades en el año 2005 resultaron estadísticamente significativas (Fig. 37). En la variedad 'Haden' de 2005, las plántulas produjeron en promedio 4 entrenudos, las variedades 'Manila' y 'Ataulfo' produjeron aproximadamente 2 entrenudos (Fig. 38).

El área foliar, al igual que la altura, de las plantas originadas a partir de la colecta de 2005 fue menor en la variedad 'Haden' con respecto a las de 2004 (275 cm<sup>2</sup>), mientras que las variedades 'Manila' y 'Ataulfo' presentaron valores de área foliar similares (123.25 y 142.28 cm<sup>2</sup>). Las diferencias en el área foliar entre las tres variedades son fueron estadísticamente significativas (Fig. 39).

Con respecto a la longitud de la plántula y el área foliar, cuánto mayor es la altura de la plántula más se incrementa el área foliar en las tres variedades ( $r^2 = 0.87, 0.89, 0.9$  para 'Haden', 'Manila' y 'Ataulfo, respectivamente). De acuerdo con Blackman (1919), el área foliar aumenta en la medida que crece la planta completa, y el incremento en el área foliar se relaciona con un incremento en la producción de material de asimilación, lo que a su vez conduce a un crecimiento aún más rápido, y por lo tanto, a la formación de hojas nuevas (mayor área foliar) y una mayor producción de material de asimilación, y así sucesivamente. Este aumento en el tamaño de la superficie de asimilación se verá directamente relacionado con el peso de la planta en diferentes períodos de tiempo.

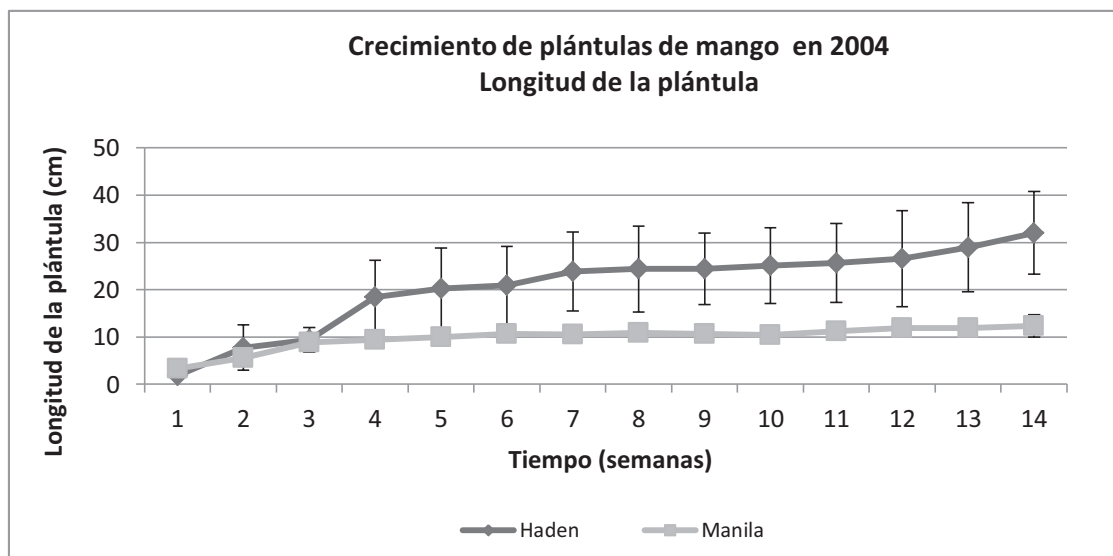


Figura 34. Longitud total de plántulas de mango variedades ‘Haden’ y ‘Manila’ durante 14 semanas de evaluación en el año 2004 ( $p=0.0001$ , al final de la evaluación).

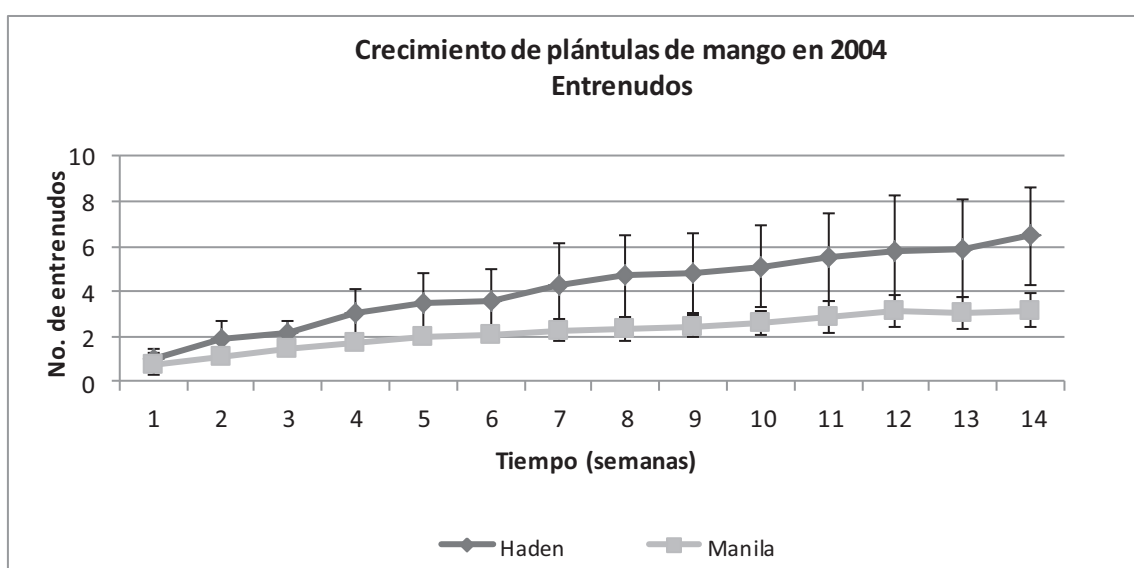


Figura 35. Número total de entrenudos en plántulas de mango variedades ‘Haden’ y ‘Manila’ durante 14 semanas de evaluación en el año 2004 ( $p=0.0005$ , al final de la evaluación).

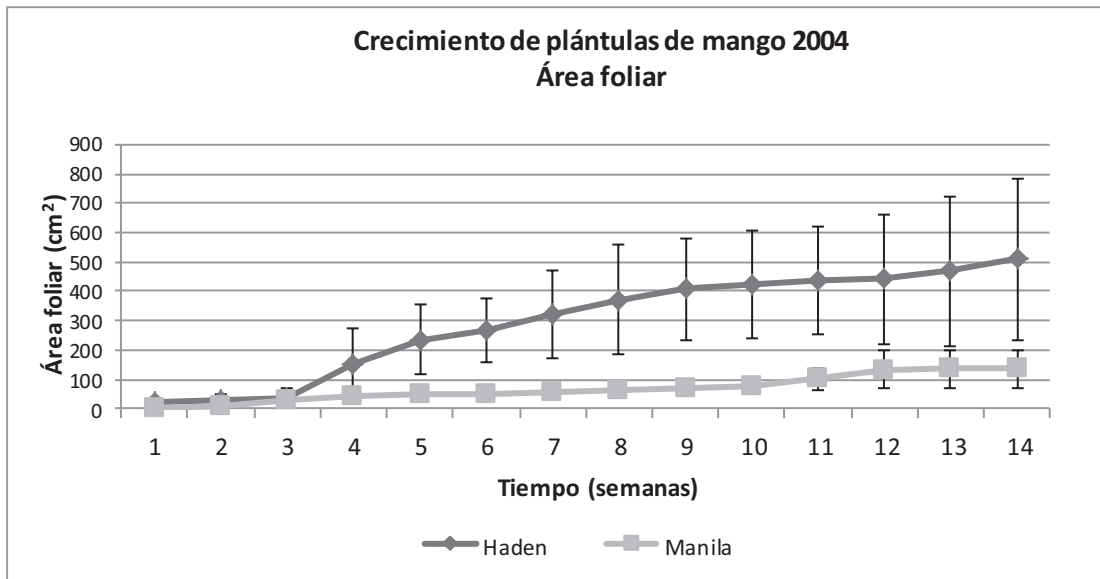


Figura 36. Área foliar de plántulas de mango variedades 'Haden' y 'Manila' durante 14 semanas de evaluación en el año 2004 ( $p=0.0005$ , al final de la evaluación).

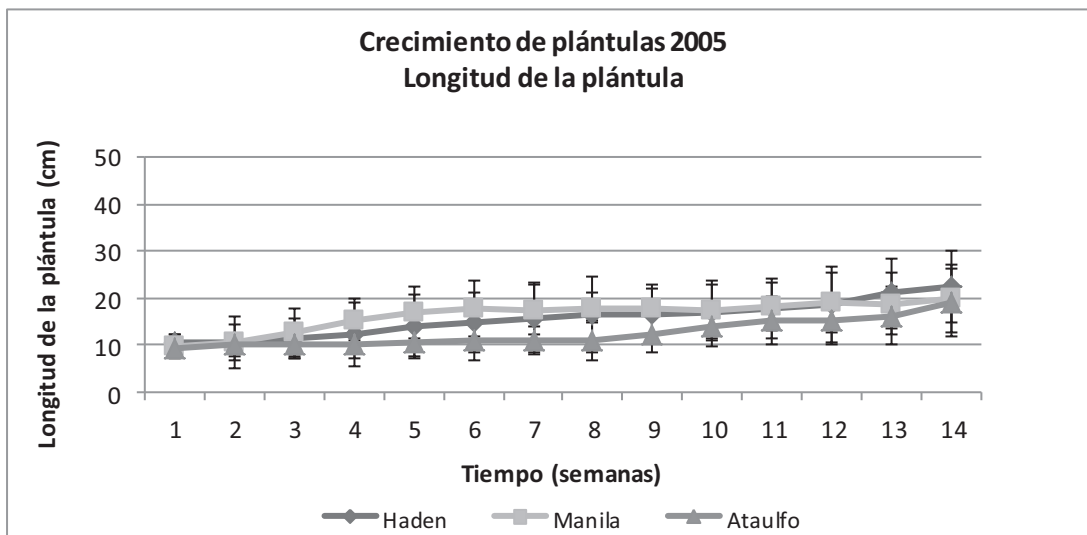


Figura 37. Longitud total de plántulas de mango variedades 'Haden', 'Manila' y 'Ataulfo' durante 14 semanas de evaluación en el año 2005 ( $p=0.004$ , al final de la evaluación).

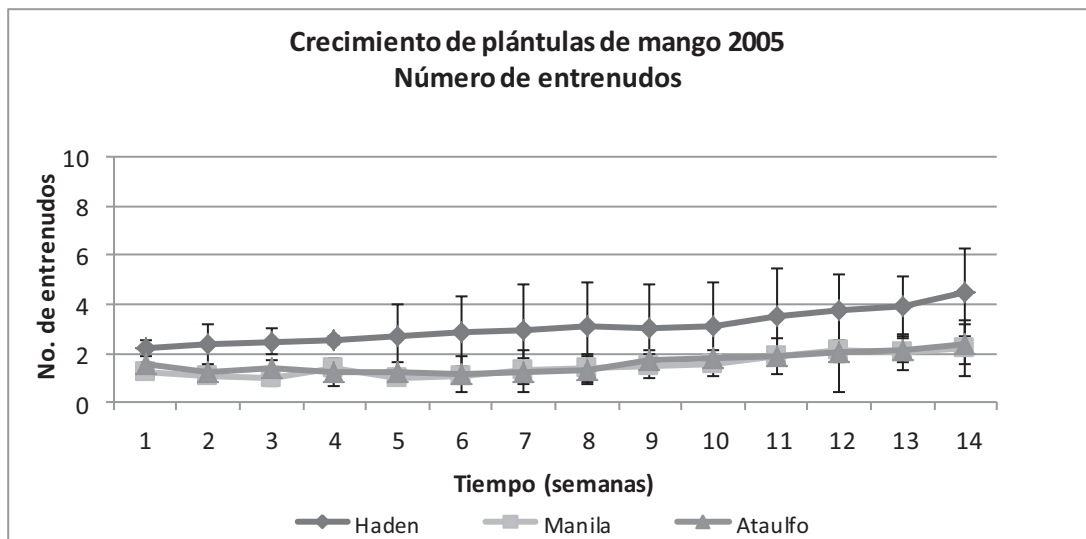


Figura 38. Número total de entrenudos en plántulas de mango variedades ‘Haden’, ‘Manila’ y ‘Ataulfo’ durante 14 semanas de evaluación en el año 2005 ( $p=0.0005$ , al final de la evaluación).

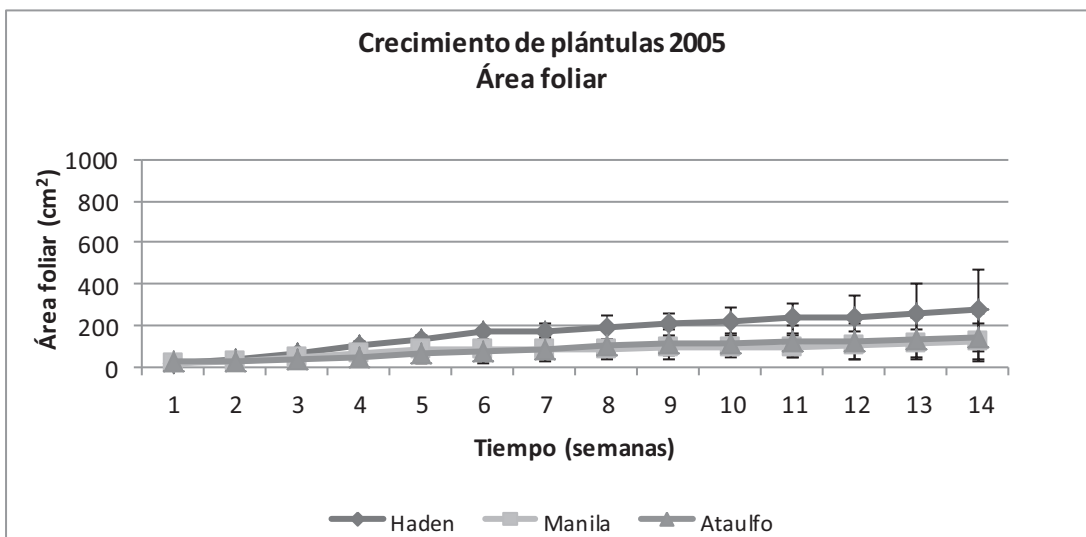


Figura 39. Área foliar de plántulas de mango variedades ‘Haden’, ‘Manila’ y ‘Ataulfo’ durante 14 semanas de evaluación en el año 2005 ( $p=0.0002$ , al final de la evaluación).

#### **7.4.6. Tasa de crecimiento relativo (RGR)**

Los parámetros anteriores son buenos indicadores del crecimiento; sin embargo, se evalúo también la tasa de crecimiento relativo. La tasa de crecimiento relativo (también conocida por las siglas RGR, del inglés “Relative Growth Rate”) es la medida principal del análisis de crecimiento y se define como el incremento irreversible de biomasa por unidad de masa y unidad de tiempo. Durante la primera fase, el crecimiento suele tener una dinámica exponencial y refleja diferencias significativas entre especies o entre individuos. Las diferencias en RGR se pueden explicar por las diferencias en el área foliar (A) y por otros parámetros que relacionan la tasa de incremento de biomasa de la planta por unidad de área foliar por unidad de tiempo, llamado también tasa de unidad de hoja (URL, Unit Leaf Rate); el área específica foliar (SLA, Specific Leaf Area) que es la cantidad de área foliar por peso de la hoja; la proporción de masa foliar (LMF, Leaf Mass Fraction) es la fracción del total de biomasa que la planta distribuye a hojas, es una medida de su inversión en órganos fotosintéticos, es decir, la alocaación de biomasa hacía las hojas. URL representa la ganancia de carbono en la fotosíntesis y las pérdidas de carbono en la respiración, evapotranspiración, exudación, así como la concentración de carbono en la planta. SLA explica la cantidad de radiación capturada por unidad de hoja. URL y SLA son los factores más importantes para explicar la variación inherente a la RGR. SLA, que es el cociente entre la superficie y el peso de las hojas puede explicar en ocasiones hasta el 80% de la variación en las tasas de crecimiento (Lambers y Poorter 1992; Cornelissen, 1996; Antúnez *et al.*, 2001). Los componentes de la tasa de crecimiento permiten conocer la contribución relativa de los aspectos morfológicos de las plántulas en el incremento de biomasa.

Al examinar los componentes que determinan la tasa relativa de crecimiento (RGR), se observó que el área foliar por masa foliar (SLA) fue significativamente mayor en la variedad 'Haden' que en la variedad 'Manila' para la colecta 2004 (Cuadro 32). En el año 2005, la SLA resultó menor en la variedad 'Haden' que en las dos variedades poliembriónicas (Cuadro 33). Tholen y col. (2004) reportan que un valor alto de SLA puede ser debido a que las hojas son más delgadas o que presentan una densidad más baja y, por lo tanto, la absorción de radiación solar es mayor. Los valores bajos de SLA se deben a la disminución del área foliar disponible, lo que conlleva a una menor captación de luz y ganancia de carbono fotosintético y, por lo tanto, una posible reducción en la RGR.

La planta invierte sus recursos de forma diferente entre los órganos con función de captación de luz y asimilación de bióxido de carbono (hojas), de captación de agua y nutrientes minerales (raíz) y de sostén (tallos). La mayoría de las especies leñosas presentan una gran proporción de biomasa foliar (sobre el 40% de peso total) (Poorter y Nagel, 2000). Existe, por lo tanto, un compromiso para la planta entre una mayor asignación de biomasa a las hojas, con la consecuente mayor capacidad para captar luz y dióxido de carbono, o bien en una mayor asignación de biomasa a las raíces, consiguiendo así captar más agua y nutrientes minerales del suelo, pero a expensas de un menor crecimiento. Desde el punto de vista ecológico, una planta con mayor proporción de biomasa en raíz tendría un crecimiento más lento, pero en cambio podría tener algunas ventajas (una mayor superficie de absorción) y una mayor supervivencia en hábitats donde los recursos del suelo (agua y nutrientes) son limitantes (Villar *et al.*, 2004).



La alocaación de biomasa hacía las hojas (LMF) fue menor en la variedad ‘Haden’ que en la variedad ‘Manila’ en 2004 y también que ‘Ataulfo’ en la colecta de 2005 (Cuadros 32 y 3), lo que significa que las plántulas de la variedades ‘Manila’ y ‘Ataulfo’ asignaron una mayor cantidad de recursos a las hojas (a pesar de tener plántulas muy pequeñas con pocas hojas).

La tasa de crecimiento por unidad de área foliar (URL) fue significativamente mayor en la variedad ‘Haden’ en los dos años analizados, presentó un incremento de biomasa por día mayor que las variedades ‘Manila’ y ‘Ataulfo’. De acuerdo con Tholen y col. (2004), la URL es impulsada por la fijación de carbono en el proceso de fotosíntesis. Una parte del carbono fijado se incorpora a la biomasa de la planta para el suministro de energía para la biosíntesis y mantenimiento. La variación en la URL parece tener menor importancia para explicar las diferencias en RGR. La disminución de la URL debido a factores ambientales tales como niveles bajos CO<sub>2</sub> puede ser compensada por un aumento de la SLA. Se encontró una relación negativa entre la SLA y la URL en la mayoría de los casos (Cuadros 32 y 33).

Si comparamos las variedades poliembriónicas con la monoembriónica se puede decir que el PBF de la semilla es esencial en el tamaño que alcanzan las plántulas en las primeras etapas de desarrollo. Bonfil (1998) encontró que, en general, en las especies de *Q. rugosa* y *Q. lauriana* la RGR aumenta con el tamaño de semilla. Leishman y col. (2002) también encontraron que las diferencias en el tamaño de las semillas pueden afectar la talla de las plantas adultas en varias especies, como se observó en este estudio. Por otro lado, Wilcox (1984) en un estudio con *Ludwigia leptocarpa* y Borges y col. (2003) en mango de la variedad ‘Espada’ reportan que el tamaño de semilla no afecta al crecimiento de las plántulas.

Cuadro 32. Tasa de Crecimiento Relativo de plántulas de mango de las variedades ‘Haden’ y ‘Manila’.  
Colecta 2004.

Variedad	Grupo	SLA (m <sup>2</sup> kg <sup>-1</sup> )	LMF (g g <sup>-1</sup> )	URL (g m <sup>2</sup> d <sup>-1</sup> )	RGR (mg g <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
‘Haden’	1	69.56	0.23	0.0031	0.050
	2	93.62	0.31	0.0018	0.054
	3	98.96	0.28	0.0023	0.064
	<b>Prom</b>	<b>87.38</b>	<b>0.27</b>	<b>0.0024</b>	<b>0.056</b>
‘Manila’	1	39.82	0.58	0.0018	0.042
	2	76.35	0.5	0.0003	0.010
	3	80.98	0.39	0.0009	0.029
	<b>Prom</b>	<b>65.71</b>	<b>0.49</b>	<b>0.0010</b>	<b>0.027</b>

Grupos categorizados por PBF de semillas. 1, PBF bajo; 2, PBF medio; 3, PBF alto.

Cuadro 33. Tasa de Crecimiento Relativo de plántulas de mango de las variedades ‘Haden’, ‘Manila’ y ‘Ataulfo’. Colecta 2005.

Variedad	Grupo	SLA (m <sup>2</sup> kg <sup>-1</sup> )	LMF (g g <sup>-1</sup> )	URL (g m <sup>2</sup> d <sup>-1</sup> )	RGR(mg g <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
‘Haden’	<b>Grupo 1</b>	98.45	0.26	0.0048	0.125
	<b>Grupo 2</b>	137.95	0.17	0.0118	0.272
	<b>Grupo 3</b>	152.66	0.16	0.0073	0.177
	<b>Prom</b>	<b>129.68</b>	<b>0.19</b>	<b>0.0079</b>	<b>0.191</b>
‘Manila’	<b>Grupo 1</b>	382.19	0.29	0.0006	0.067
	<b>Grupo 2</b>	166.72	0.23	0.0005	0.021
	<b>Grupo 3</b>	244.86	0.22	0.0004	0.021
	<b>Prom</b>	<b>264.59</b>	<b>0.24</b>	<b>0.0005</b>	<b>0.036</b>
‘Ataulfo’	<b>Grupo 1</b>	668.91	0.12	0.0004	0.035
	<b>Grupo 2</b>	250.46	0.26	0.0005	0.032
	<b>Grupo 3</b>	144.40	0.32	0.0007	0.032
	<b>Prom</b>	<b>354.59</b>	<b>0.23</b>	<b>0.0005</b>	<b>0.033</b>

Grupos categorizados por PBF de semillas. 1, PBF bajo; 2, PBF medio; 3, PBF alto.

En los análisis de crecimiento de 24 especies leñosas no se encontró una correlación positiva entre el PBF de la semilla y la RGR, pero sí se observó una correlación negativa con el SLA (Villar *et al.*, 2004). Se podría pensar que las plántulas emergidas a partir de semillas pequeñas, con menos recursos propios, invierten preferentemente en área foliar para crecer lo más rápido posible. El área foliar específica (SLA) es una característica morfológica que podría haber sido seleccionada evolutivamente para aumentar la velocidad de crecimiento de

las plántulas. Entre las características asociadas a mayores tasas de crecimiento, se pueden destacar mayor área específica foliar (SLA), mayor asignación de biomasa hacia las hojas y menor a las raíces, concentración alta de proteínas en hojas y altas tasas de fotosíntesis neta (Villar *et al.*, 2004). En otros estudios, durante las primeras fases de desarrollo, la RGR suele estar correlacionada positivamente con el PBF de la semilla (Osunkoya *et al.*, 1994; Bonfil, 1998; Leishman, *et al.*, 2000; Tholen *et al.*, 2004). En animales y organismos unicelulares, Shipley y Peters (1990) reportan que existe una correlación negativa entre la RGR y el PBF del cuerpo de los individuos. Shipley y Peters (1990) reportan que en general, existe una correlación débil negativa en 204 especies de plantas tomadas de diferentes estudios, pero que la RGR en el caso de las plantas no sólo está afectada por el tamaño de las semillas, sino que existen otros factores de suma importancia que pueden afectar de manera preponderante a la RGR, tales como el estrés producido por el hábitat y las condiciones de perturbación, así como la asignación de biomasa a cada parte de la planta.

### ***7.5. Análisis molecular de plántulas de mango mediante AFLPs***

De acuerdo con Bally (2006), es posible identificar a las plantas cigóticas de las nucelares, pues las plántulas de origen cigótico generalmente presentan menor vigor que las nucelares y sobreviven un menor periodo de tiempo (por lo que las primeras raramente se seleccionan para propagación). Pero existen casos en los que en algunas variedades esto ocurre de forma inversa y las plántulas cigóticas son las más vigorosas. Morfológicamente, es pues, complicado distinguir entre plántulas nucelares y cigóticas. Avilán y col. (1992) reportan que

no hay manera definitiva para distinguir las plántulas cigóticas de las nucelares. Sin embargo, de acuerdo con Juliano y Cuevas (1932) los embriones adventicios de mango, provenientes de las células de la nucela, presentan un desarrollo más retardado comparado con el embrión sexual. Ram (1997) refuta esta idea, pues en plantaciones comerciales el autor observó que las plántulas nucelares pueden ser distinguidas de las cigóticas con base en su gran vigor un mes después de la germinación. A menudo, las plántulas cigóticas y nucelares pueden ser morfológicamente muy similares.

La detección y separación de las plántulas nucelares es muy importante, ya que en muchas áreas de cultivo de mango las variedades monoembriónicas y poliembriónicas son injertadas sobre portainjertos de plántulas nucelares con la finalidad de conservar las características genéticas de las plantas madre y homogeneizar la calidad de producción de frutos en las plantaciones y la tolerancia a enfermedades y condiciones de salinidad del suelo. Es por esta razón que en este trabajo se aborda la posible identificación de las plántulas nucelares y las cigóticas por medio de marcadores moleculares AFLPs.

#### ***7.5.1. Extracción de ADN de hojas de mango***

Para la extracción de ADN, se utilizó aproximadamente 1 g de tejido de hojas jóvenes sin nervaduras de plántulas de mango de las variedades ‘Manila’, ‘Ataulfo’ y ‘Haden’ sembradas en los años 2004 a 2007 y 2009. En algunos casos el ADN se extrajo de raíz y epicótilo, e incluso de cotiledón, partiendo entonces de una cantidad más pequeña de tejido. Las muestras extraídas de cotiledón no resultaron apropiadas para la amplificación de ADN,

ya que no fue posible separar el ADN de todos los componentes de los cotiledones. Para la estandarización de la extracción de ADN de mango se utilizaron las técnicas de CTAB y sílica, obteniendo una mejor calidad y mayor cantidad de ADN mediante el método de extracción con sílica (Fig. 40). El método de sílica (Echeverría-Machado *et al.*, 2005) es seguro y económico, ya que no utiliza solventes orgánicos, y ha sido probado en otras especies vegetales como agave y caoba. El método resultó eficiente en la extracción de ADN genómico de mango.

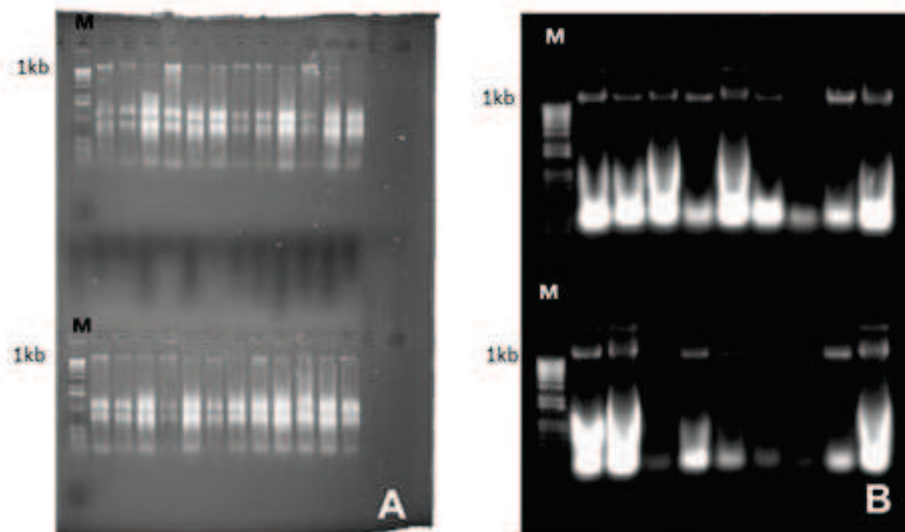


Figura 40. Geles de extracción. Comparación de dos métodos utilizados para la extracción de ADN de mango. A) Método estandarizado de Sílica; B) Uso de CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide, Bromuro de cetiltrimetilamonio)

En muchas de las muestras de mango se obtuvo una alta concentración de ADN, por lo que a partir del ADN obtenido de la extracción con el método de sílica se realizaron diluciones hasta 50 o 100 ng/ $\mu$ L, para realizar la amplificación de ADN mediante la técnica de AFLP (Fig 41).

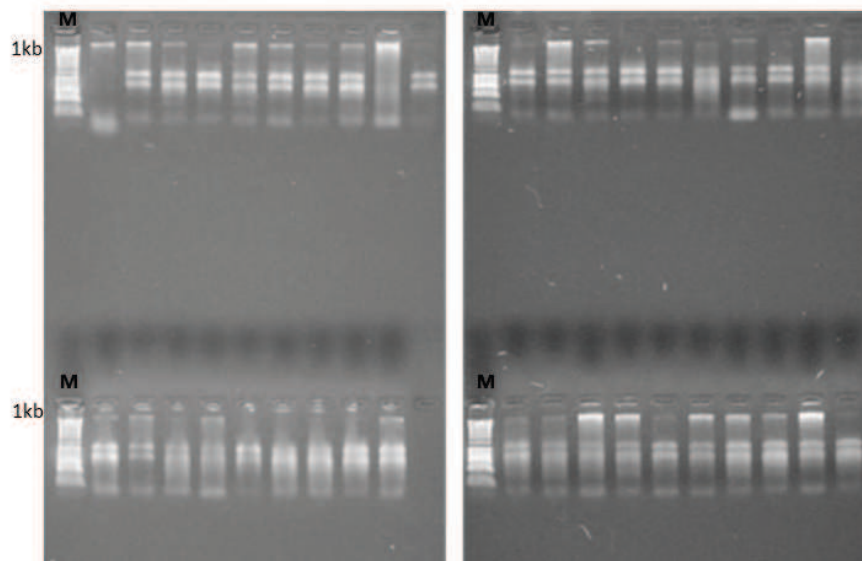


Figura 41. Geles de dilución del ADN genómico de mango hasta 100 y 50 ng/ $\mu$ L.

### 7.5.2. Análisis AFLPs

En el año de colecta 2006 se obtuvieron las primeras amplificaciones exitosas mediante AFLP; sin embargo, la resolución del gel de poliacridamida con tinción de plata resultante no permitió hacer una adecuada interpretación de los datos. En los años 2007 a 2009 se amplificó el ADN de mango de extracciones realizadas con plántulas obtenidas de las colectas de 2007 y 2009. Los patrones de bandas se generaron a través de electroforesis hechas en un secuenciador automático. Las matrices de similitud y los dendrogramas se obtuvieron del análisis con NTSYS y FREE TREE - TREE VIEW.

Los frutos colectados en el año 2007 se llevaron al CICY en Mérida, las semillas se sembraron y se extrajo ADN de plántulas muy jóvenes, cuyo epicótilo aún no había desarrollado laminas foliares grandes. Con el ADN de las muestras extraídas se realizaron las primeras pruebas de amplificación mediante AFLPs y análisis en un secuenciador automático, utilizando nueve combinaciones diferentes de primers *EcoR1* marcados y *Mse1* no marcados, de las cuales seis produjeron un mayor número de bandas polimórficas: *EcoR1ACA/CACMse1*, *EcoR1ACC/CTAMse1* y *EcoR1ACG/CTTMse1*; *EcoR1ACT/CTAMse1*, *EcoR1ACC/CACMse1* y *EcoR1ACC/CTTMse1* (Ver Cuadro 13).

En la figura 42 se observan los agrupamientos resultantes del análisis de 23 individuos de la colecta 2007, que incluyen plantas madre y plántulas hijas. Se forman cinco grupos, uno que contiene únicamente individuos de la variedad ‘Ataulfo’ (líneas verdes, identificados con la letra inicial A); dos que contienen sólo la variedad ‘Manila’ (líneas amarillas, identificados con la letra inicial M), un grupo que incluye a variedad monoembriónica ‘Haden’ (líneas rojas, identificados con la letra inicial H) y una plántula de ‘Manila’, finalmente un grupo con individuos de las variedades ‘Ataulfo’ y ‘Manila’. Las variedades poliembriónicas en los grupos de colores únicos están relacionados con la planta madre de la cual provienen, por ejemplo M3 es la planta madre de la cual se colectaron las semillas poliembriónicas y M3a1 y M3a2 son individuos provenientes de una misma semilla; M4 es la planta madre de M4b2, M4b3, M4b5 y M4b6, las cuales todas son plántulas emergidas de una misma semilla. De la misma forma, A7 es la planta madre de A7c1, A7c2, A7c3 y A7c4, que son todas plántulas provenientes de una misma semilla, en ese grupo A6b1 y A6b3 son plántulas hermanas, pero provenientes de otra planta madre.

Las plántulas de la variedad 'Haden' se agrupan juntas, a pesar de provenir todas de diferentes árboles, H1 y H2 son plantas madres distintas, H4b es una plántula hija proveniente de un árbol distinto. Estos últimos tres individuos se agrupan con una plántula de la variedad 'Manila', igual que dos plantas madre de 'Ataulfo' se agrupan con otro individuo de 'Manila' (Fig. 46). A pesar de que sí se forman grupos claros de las tres variedades, en el caso de las poliembriónicas se esperaría que las plantas madres se encontraran en el mismo nivel de similitud que las plántulas hijas (o, al menos, que las plántulas hijas, en el caso que todas fueran de origen nucelar -y por lo tanto plántulas genéticamente idénticas- estuvieran emparentadas todas muy estrechamente). Esto no queda claro para aquellas plántulas que provienen de la planta madre M4. Si se preservaran plántulas de origen cigótico, lo que se esperaría es que esas plántulas presentaran diferencias con respecto a las nucleares e incluso con relación a la planta madre.



## Análisis con 100 repeticiones de Bootstrap

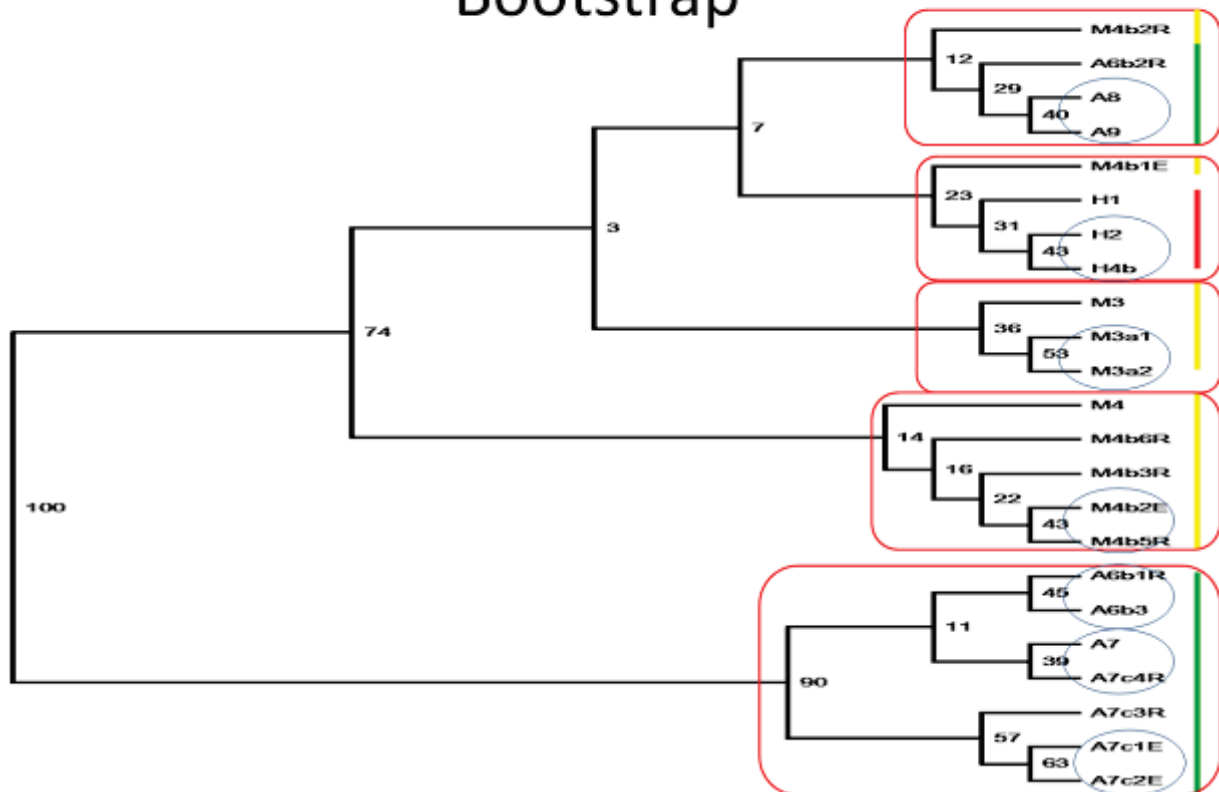


Figura 42. Dendrograma generado por el programa Free Tree de 23 individuos de la colecta 2007 analizados con AFLPs con seis combinaciones de primers. UPGMA, Nei-Li similitud (1979). La similitud genética entre los individuos viene definida por la longitud de las ramas horizontales. En cada bifurcación se indican los valores de bootstrap para 100 réplicas. Las líneas rojas a la derecha señalan las plántulas de la variedad 'Haden', las amarillas a 'Manila' y las verdes a 'Ataulfo'. Los recuadros rojos indican los agrupamientos y los ovalos azules agrupan a los individuos más similares. Nomenclatura: H, M, A, variedades 'Haden', 'Manila' y 'Ataulfo'; 1, 2, 3, etc, árbol de colecta; a, b, c, etc., semilla; en el penúltimo sitio 1, 2, 3, etc, embriones hermanos en la misma semilla; R, E, extracción de raíz o epicótilo.

Con la finalidad de verificar si los resultados anteriores eran consistentes, en febrero de 2008 se volvieron a analizar las muestras de la colecta del año 2007, incluyendo 20 individuos más. Se utilizaron las combinaciones de primers EcoR1ACA/CTTMse1 y EcoR1ACC/CAC Mse1; EcoR1ACA/CTAMse1 y EcoR1ACC/CTTMse1 y;

Total de bandas	Bandas compartidas				Bandas específicas		
	A-H-M	A-M	A-H	H-M	A	M	H
373	182	65	26	12	46	23	19

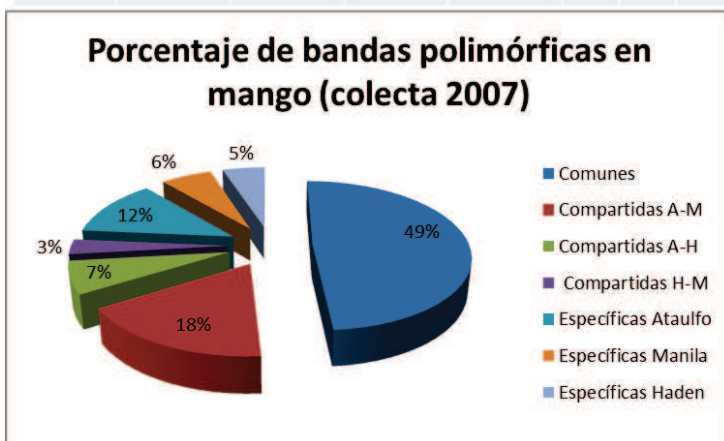


Figura 43. Número y porcentaje de bandas compartidas o comunes entre las variedades de mango 'Haden', 'Manila' y 'Ataulfo' y específicas de cada variedad. H, 'Haden'; M, 'Manila'; A, 'Ataulfo'.

EcoR1ACA/CACMse1 y EcoR1ACC/CTAMse1. Con las seis combinaciones de iniciadores se obtuvieron un total de 372 bandas, de las cuales 182 (49%) son compartidas o comunes para las tres variedades de mango, 65 bandas (18%) son comunes en las dos variedades poliembriónicas, 26 bandas (7%) se comparten entre 'Ataulfo' y 'Haden' y 12 bandas (3%) son compartidas entre las variedades 'Haden' y 'Manila' (Fig 43). 46 bandas (12%) son específicas de la variedad 'Ataulfo', 23 (6%) de 'Manila' y 19 (5%) de 'Haden'. El número de bandas compartidas es más alto entre las variedades poliembriónicas que con la variedad monoembriónica 'Haden'.

En la figura 44 se observa el índice de similitud de las plántulas analizadas en febrero de 2008 a partir de la colecta del año 2007. El índice de similitud en las tres variedades se

encuentra entre 0.2 y 0.93. Las variedades poliembriónicas resultaron más variables que la monoembriónica ‘Haden’.

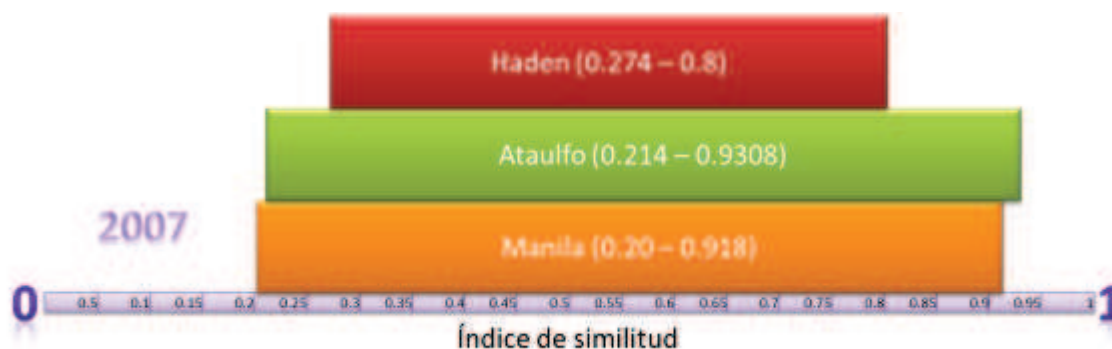


Figura 44. Límites de similitud (Nei y Li, 1979) para las variedades ‘Haden’, ‘Ataulfo y ‘Manila’ de la colecta 2007, procesadas en febrero de 2008.

En el dendrograma representado en la figura 45, se observa un agrupamiento claro en la variedad ‘Ataulfo’, dos en ‘Manila’ y uno en ‘Haden’. Un grupo incluye individuos de las tres variedades y se presentan subgrupos pequeños de las variedades poliembriónicas. Aunque muchas de las plántulas hermanas se agrupan en los mismos nodos, también existe variabilidad entre ellas: el índice de similitud va desde 0.58, en A8c3 y A8c2 a 0.93 en A7c1E y A7c1R, que finalmente son el mismo individuo con la diferencia de que la extracción del ADN se realizó a partir de tejido del epicótilo (E) y de la raíz (R). Estas dos muestras se agrupan muy cercanamente a sus hermanas y a otros individuos provenientes de otra semilla A6b (Fig. 45). No resulta fácil distinguir de esta forma a los individuos nucelares y cigóticos de cada semilla.

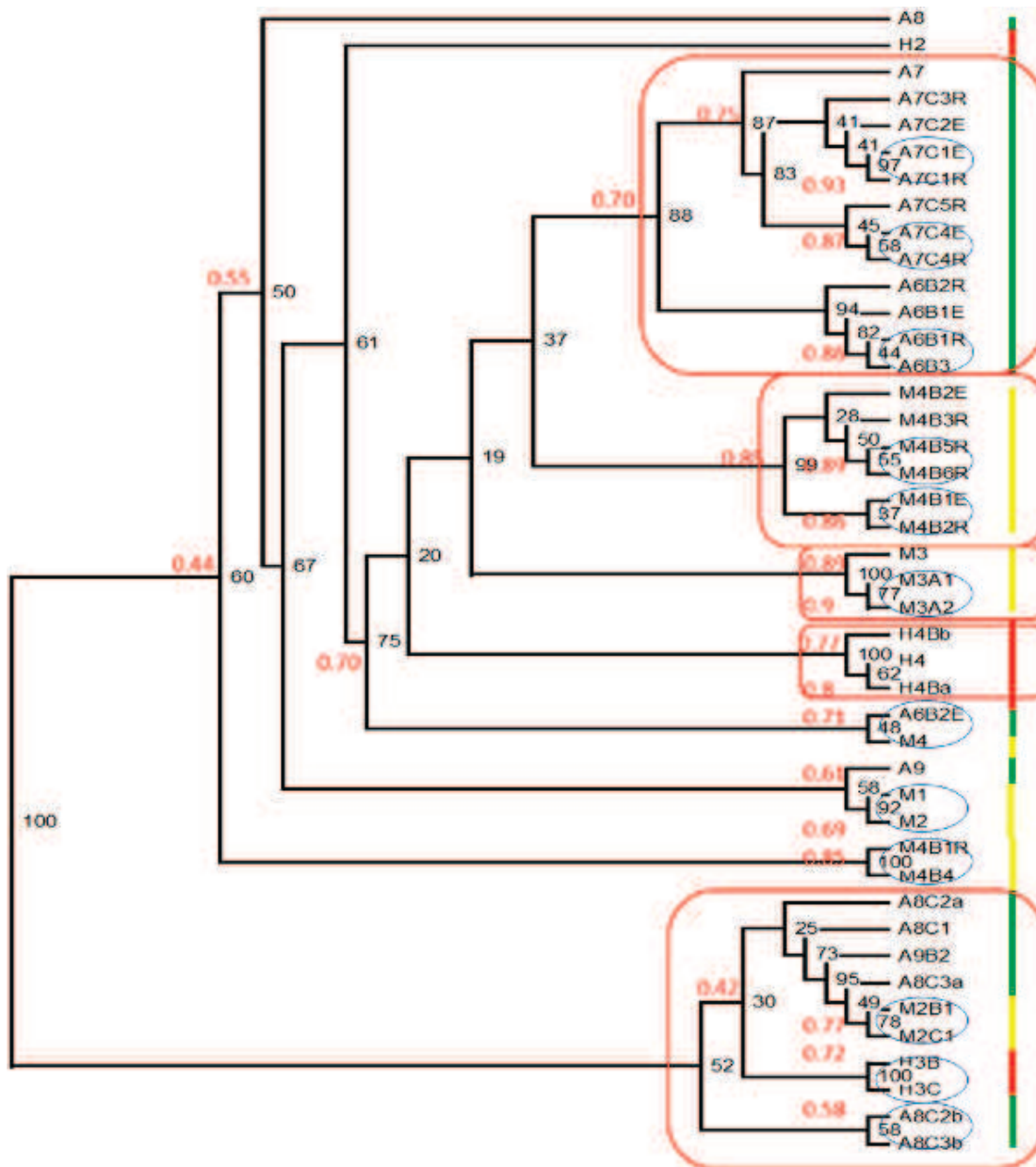


Figura 45. Dendrograma generado por el programa Free Tree de 43 individuos de la colecta 2007 analizados con AFLPs con seis combinaciones de primers. UPGMA, Nei-Li similitud (1979). La similitud genética entre los individuos viene definida por la longitud de las ramas horizontales. En cada bifurcación se indican los valores de bootstrap para 1000 réplicas. Los números en rojo indican el índice de similitud. Las líneas rojas señalan las plántulas de la variedad 'Haden', las amarillas a 'Manila' y las verdes a 'Ataulfo'. Los recuadros rojos indican los agrupamientos y los ovalos azules agrupan a los individuos más similares. Nomenclatura: H, M, A, variedades 'Haden', 'Manila' y 'Ataulfo'; 1, 2, 3, etc., árbol de colecta; a, b, c, etc., semilla; en el penúltimo sitio 1, 2, 3, etc, embriones hermanos en la misma semilla; R, E, extracción de raíz o epicótilo.

En el año 2009 el ADN se extrajo únicamente de hojas jóvenes, se analizaron 63 individuos con cuatro combinaciones de iniciadores: EcoR1ACT/CTAMse1 y EcoR1ACC/CTTMse1; EcoR1ACT/CTTMse1 y EcoR1ACC/CACMse1. Se

Total de bandas	Bandas compartidas				Bandas específicas		
	A-H-M	A-M	A-H	H-M	A	M	H
421	225	111	5	8	38	30	4

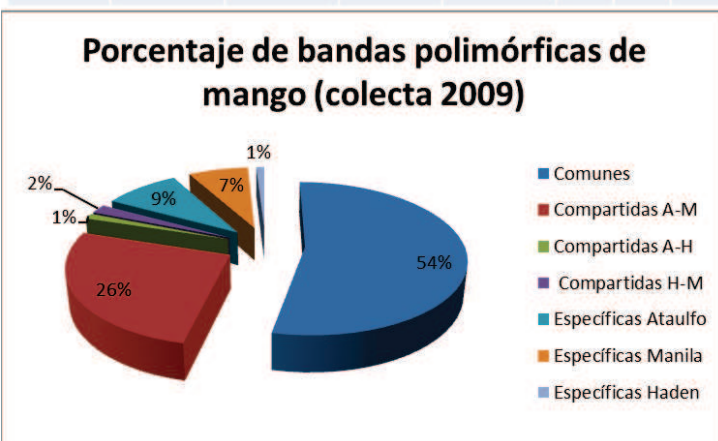


Figura 46. Número y porcentaje de bandas compartidas o comunes entre las variedades de mango 'Haden', 'Manila' y 'Ataulfo' y específicas de cada variedad. H, 'Haden'; M, 'Manila'; A, 'Ataulfo'.

obtuvieron un total de 421 bandas, de las cuales 225 (54%) son compartidas entre las tres especies

de mango; 111 bandas (26%) son comunes en las variedades poliembriónicas; 'Haden' comparte 5 bandas (1%) con 'Ataulfo' y 8 bandas (2%) con 'Manila'. La variedad 'Ataulfo' presenta 38 bandas (9%) específicas mientras que 'Manila' 30 (7%). 'Haden' sólo presenta 4 bandas específicas (1%) (Fig. 46).

El índice de similitud en los datos analizados en el año 2009 está entre 0.21 y 0.94. 'Ataulfo' es la variedad con mayor variación, 'Manila' varía entre 0.35 y 0.9. Al igual que en año 2007, 'Haden' resultó la menos variable (Fig. 47).

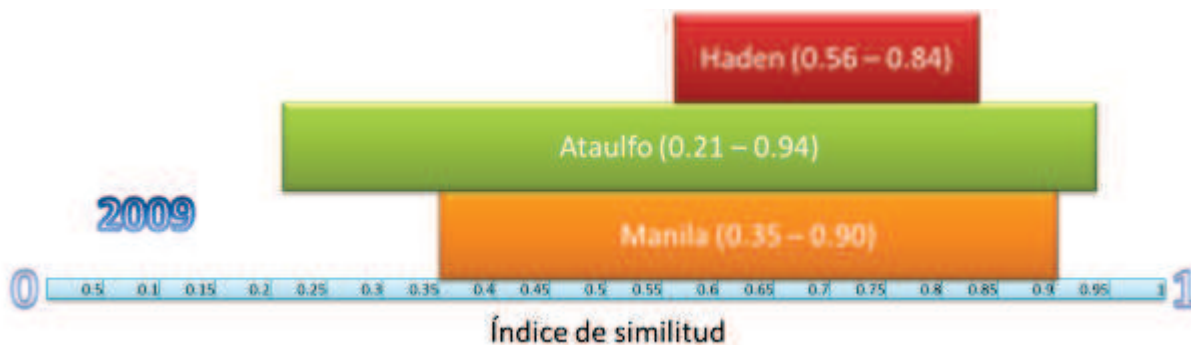


Figura 47. Límites de similitud genética (Nei y Li, 1979) para las variedades ‘Haden’, ‘Ataulfo y ‘Manila’ de la colecta 2009.

En las tres variedades de la especie *M. indica* se mantiene una buena diversidad genética, siendo la diversidad de la especie mayor que la variación en cada variedad. La variabilidad es más amplia en las variedades poliembriónicas que en la monoembriónica.

En la figura 48 se presenta el dendrograma de los 63 individuos analizados en la colecta del año 2009. Se incluyó un individuo de la variedad ‘Ataulfo’ de la colecta anterior (A7c1R), para verificar que se emparentará con otros individuos de la variedad ‘Ataulfo’, lo cual sí ocurrió. No se incluyeron plántulas madre en este análisis. Se forman claramente dos grupos en la variedad ‘Ataulfo’, un grupo en la variedad ‘Haden’ y otros dos en la variedad ‘Manila’, que incluyen individuos de ‘Ataulfo’. Un grupo más incluye individuos de las tres variedades y hay pequeños subgrupos de las variedades poliembriónicas. La similitud entre dos plántulas agrupadas en un mismo nodo va de 0.50 en ‘Ataulfo’ a 0.96 en ‘Manila’. La identificación de embriones nucelares y cigóticos tampoco está clara en este caso. Scarano y col. (2003) en cruces de *Citrus limon* reportan que la similitud estimada mediante AFLPs en híbridos va de

0.52 a 0.95, que deben corroborarse estos datos para la distinción de plántulas de origen cigótico.

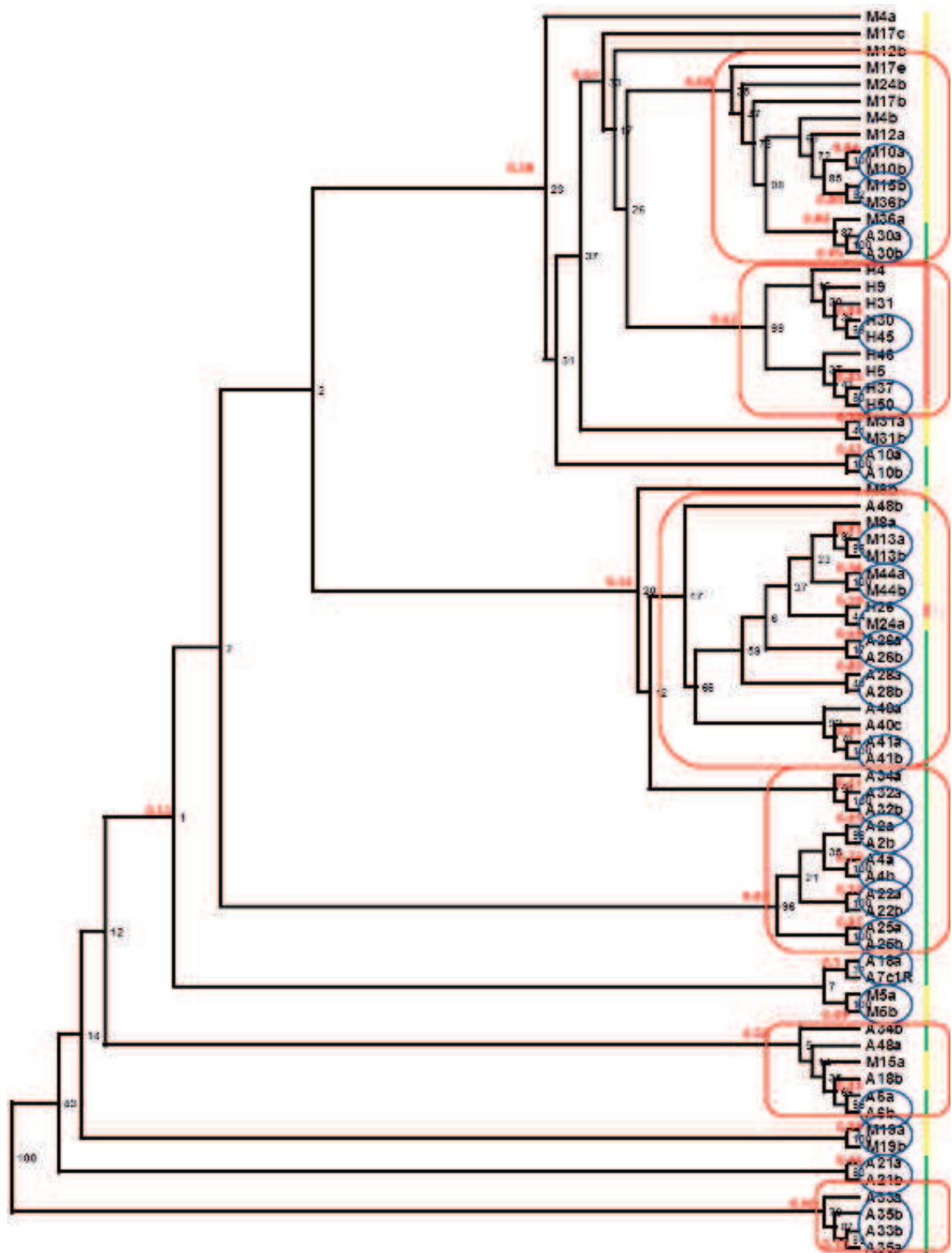
En los estudios mencionados anteriormente, a través de las técnicas basadas en sistemas isoenzimáticos y marcadores RAPD, los autores lograron distinguir embriones cigóticos de nucelares en las variedades poliembriónicas analizadas. Martínez-Ochoa (2010), utilizando marcadores moleculares RAPD y plántulas producidas mediante cultivo *in vitro* menciona que el 100% de las semillas de la variedad ‘Manila’ presentan embriones cigóticos, mientras que en ‘Ataulfo’ el 71.4% de las semillas presentan embrión cigótico. Tanto en la variedad ‘Manila’ como en la ‘Ataulfo’, Martínez-Ochoa (2010) encontró más de un embrión cigótico (incluso hasta tres) por semilla, posiblemente originados por la fisión del embrión sexual o por la presencia de dos gametofitos en un mismo óvulo. En cítricos hay reportes de la presencia de dos (‘twin’) o más embriones cigóticos por semilla. Medina-Filho y col. (1993) y Ribeiro y col. (1999), citados por Martínez-Ochoa (2010), describen a la poliembriónía en *Citrus* como dicigótica si se presentan dos embriones cigóticos por semilla. Degani y col. (1993) mediante sistemas enzimáticos, lograron identificar una plántula cigótica en 22% de las semillas de la variedad ‘13-1’, 20% de las semillas de la variedad ‘Tupertine’ y 13% en el híbrido ‘13-1’ x ‘Tupertine’. Cameron y Garber (1968) argumentan que la producción de más de un embrión cigótico en una semilla podría deberse a la gemación del embrión primario.

Como lo reportan algunas de las investigaciones anteriores, podría ocurrir que en las semillas de mango poliembriónicas se presente más de una plántula de origen cigótico y sea ésta la razón por la cual existe variabilidad genética en las plántulas de una misma semilla. Sin

embargo, para comprobar esto se deben hacer estudios a nivel morfo-histológico durante la antesis y las primeras fases de la embriogenesis.

La posibilidad de que en las variedades poliembriónicas ‘Manila’ y ‘Ataulfo’ estudiadas en este trabajo no se conserve la plántula cigótica es también una posibilidad. Puede ser que todas las plántulas analizadas tengan un origen nucelar y los factores que marcan las diferencias genéticas estén relacionados con la presencia de elementos móviles y otros mecanismos. En los resultados de los análisis AFLPs mostrados en este estudio se observa en muchos casos que las plántulas se agrupan en subgrupos independientes por variedad, pero no en el mismo nivel de similitud que la planta madre, lo cual demuestra que las plántulas hijas no son completamente idénticas a la madre (clones); este es el caso de los individuos analizados A7 y M3 en 2007 (Fig. 47). En A7 los pares de individuos agrupados en el mismo nodo presentan un índice de similitud que va de 0.86 a 0.93 entre ellos, aunque con respecto a la planta madre la similitud es de 0.70; en M3 las dos plántulas hermanas son similares con un índice de 0.9 y con respecto a la planta madre de 0.89, siendo genéticamente muy cercanas. En las plántulas M4, la plántula madre se agrupa en un subgrupo distinto al de las hijas, las plántulas hijas en un mismo nodo son similares en 0.86 a 0.89 y con respecto a la planta madre el índice es de 0.70.





Leyenda Figura 48 (pág. 159). Dendrograma de 63 individuos de la colecta 2009 (Free Tree) analizados con AFLPs. UPGMA, Nei-Li similitud (1979). La similitud genética entre los individuos está definida por la longitud de las ramas horizontales. En cada bifurcación se indican los valores de bootstrap para 1000 réplicas. Los números en rojo indican el índice de similitud. Las líneas rojas señalan las plántulas de la var. 'Haden', las amarillas, 'Manila' y las verdes, 'Ataulfo'. Los recuadros rojos indican los agrupamientos y los óvalos azules agrupan a los individuos más similares. H, M, A, 'Haden, 'Manila' y 'Ataulfo'; números,

A pesar de que las plántulas de la variedad monoembriónica 'Haden' se originan por reproducción sexual y en principio deberían tener una mayor variabilidad genotípica por recombinación, los resultados con los individuos analizados muestran que dos plántulas hijas se agrupan junto con su planta madre H4, con un índice de similitud que va de 0.77 a 0.8, y éstas se encuentran separadas de otro grupo de 'Haden' (H3b y H3c, similitud 0.72), con un índice de similitud entre los dos grupos de 0.44 (igual al que existe entre la planta madre A8 de la variedad 'Ataulfo' y las hijas procedentes de la misma semilla A8c2b y A8c3b). Las variedades poliembriónicas en general muestran mayor variabilidad genotípica que la variedad monoembriónica (Fig. 45).

En la figura 48, se aprecia un grupo formado por individuos de la variedad 'Manila' y dos miembros de 'Ataulfo': las plántulas hermanas M17 b y e se encuentran dentro del mismo grupo, con un índice de similitud de 0.68 y aunque su tercera hermana M17c se agrupa en otro nivel, la similitud con ella es de 0.67. Las plántulas de la variedad 'Ataulfo' presentan índices de similitud cercanos a los del grupo de la variedad 'Haden'. Aunque de manera general, los

análisis realizados en 2009 demuestran que la variedad monoembriónica es menos variable (Fig. 46).

Los análisis mediante marcadores moleculares AFLPs han sido utilizados exitosamente en la detección de diferencias genotípicas somaclonales. Estas diferencias genotípicas pueden deberse a la presencia de elementos transponibles (TN), los cuales son fragmentos de ADN con capacidad de insertarse en nuevas localizaciones cromosómicas, pudiendo realizar frecuentemente copias de ellos mismos en el proceso. Estos elementos no son raros en el genoma, constituyen una fracción muy importante del material genético de todos los organismos donde se han explorado. El modo replicativo de transposición hace que estos elementos móviles hayan invadido con éxito prácticamente todas las partes del genoma de las plantas, llegando a ocupar en ocasiones hasta el 80% del ADN nuclear (SanMiguel *et al.*, 1998).

Algunos elementos transponibles han evolucionado hacia una movilización dentro de zonas silenciosas del genoma, para evitar aumentar la tasa de mutación génica y no llegar a niveles letales. Así, por ejemplo los retrotransposones (RTN) pueden proliferar como secuencias repetidas dispersas contribuyendo activamente a aumentar el tamaño del genoma huésped. Hay estudios que confirman la localización de inserciones recientes del elemento *Tnt1* (RTN-LTR tipo *copia*) en regiones génicas de tabaco, mientras que las inserciones más antiguas están concentradas en zonas repetitivas que incluyen transposones. Este resultado sugiere que las nuevas inserciones de *Tnt1* se dan cerca de genes, aunque con el tiempo estos elementos van siendo excluidos de las regiones génicas y no se expresan (Quang Hien Le, 2007).

El comportamiento celular normal es el resultado de una compleja cascada de programas genéticos que son sensibles a la interrupción por estrés biótico o abiótico (Cardone *et al.*, 2010). Muchos de los RTN de plantas mejor caracterizados se transcriben activamente en respuesta a diferentes factores de estrés tanto biótico como abiótico. Muchos se expresan en cultivos celulares *in vitro* (Hirochika, 1993; Pouteau *et al.*, 1991), indicando que quizás la transposición contribuye significativamente a la variación somaclonal que aparece en plantas regeneradas a partir de cultivos celulares *in vitro* (Grandbastein, 1989). El cultivo *in vitro per se* puede ser muy estresante para las células vegetales e involucra procesos mutagénicos durante el establecimiento del explante, la inducción de callo, la formación de embriones y la regeneración de plantas (Larkin y Scowcroft (1981), e involucra cambios en las plantas regeneradas que son transmitidos a la progenie (Cardone *et al.*, 2010). Se sabe que *TnT1A* de tabaco activa su expresión en respuesta a heridas en hojas y por la adición de metiljasmonato, mientras que *TnT1B* se transcribe sólo en cultivos celulares y *TnT1C* activa su expresión en hojas tratadas con ácido salicílico y la hormona 2,4-D (Beguiristain *et al.*, 2001). También se observa la transcripción de *TnT1* en respuesta a agentes microbianos (Pouteau *et al.*, 1991).

Asimismo, la aparición *in vitro* de interacciones no específicas puede que no genere variación estable y transmitible, pero que conduzca a cambios en la expresión génica. Estos cambios, denominados epigenéticos, son considerados por algunos autores como variación somatoclonal (Cardone *et al.*, 2010). Los cambios epigenéticos se presentan de manera natural en las células y son alteraciones en la expresión de genes que surgen durante el desarrollo y la proliferación celular, por medio de procesos que no cambian la información (secuencia) contenida en el material genético, pero que modulan la expresión génica a través de

modificaciones específicas relacionadas con la remodelación de la cromatina mediada por modificaciones químicas de las histonas y del ADN; estos cambios pueden ser estables y heredarse (Crews y McLachlan, 2006). Se ha demostrado que los mecanismos epigenéticos proporcionan una protección adicional a la del control transcripcional que regula la expresión de los genes. Estos mecanismos son componentes esenciales en el desarrollo y función normal de las células (Macías-Sánchez, 2008). La condensación de la cromatina impacta en los procesos de transcripción, replicación, recombinación y reparación del ADN. La regularización dinámica de la organización de la cromatina durante el crecimiento y diferenciación es dependiente de proteínas con actividad enzimática que modifican las histonas. Estas modificaciones incluyen acetilación, metilación, fosforilación, entre otros, que pueden tener efectos sinérgicos o antagónicos que regulan la actividad transcripcional de un gen. En la metilación algunos nucleótidos de ADN son modificados por la adición de un grupo metilo (-CH<sub>3</sub>) a la base. En la acetilación las histonas tienen la adición de grupos acetilos (-CH<sub>3</sub>CHO), lo que afecta la interacción con el ADN y se asocia con una mayor expresión génica (Ooi y Wood, 2007). Este código de histonas crea subdominios funcionalmente distintos en la cromatina, que pueden definir la activación o silenciamiento transcripcional de un gen (Grewal y Moazed, 2003; Rodenhiser y Mann, 2006).

La metilación del ADN se ha asociado a la región heterocromática y a la inactividad genética en muchos eucariotas superiores, incluyendo las plantas. El análisis del ADN repetitivo (mayoritariamente RNT) presente en el genoma de plantas muestra citosinas metiladas en las secuencias 5'-CG-3' y 5'-CNG-3'. Esta metilación se asocia tanto con inactividad transcripcional del elemento como con una elevada tasa de mutaciones puntuales

por transición de C a T, que hace que los elementos degeneren en formas no funcionales más rápidamente (SanMiguel *et al.*, 1998). Los RNT pueden también inactivar otros RNT pre-existentes insertándose dentro de ellos, en una estructura anidada (*nested*) muy frecuente en las regiones intergénicas del genoma de maíz (SanMiguel *et al.*, 1996).

Además de los elementos genéticos transponibles, existen otros mecanismos que generan variación somaclonal, entre ellos se puede mencionar las alteraciones en el cariotipo, mutaciones puntuales, recombinación somática e intercambio de cromátidas hermanas, rearreglos génicos somáticos, amplificación y/o metilación del ADN. Por ello, aunque los caracteres morfológicos (como por ejemplo, el crecimiento, la morfología floral o de frutos, etc.) son fáciles de evaluar, muchos aspectos de la variación suceden sin manifestarse en cambios morfológicos evidentes. Una diferencia génica puede no alterar la actividad biológica lo suficiente como para producir un fenotipo modificado (Cardone *et al.*, 2010).

Parece ser que las diferencias que se presentan tanto en la germinación de semillas, como en el crecimiento y la sobrevivencia de las plántulas en las tres variedades de mango estudiadas está determinada mayormente por la cantidad de reservas acumuladas en las semillas y embriones (evidentemente, influye el hecho de que la variedad ‘Haden’ es monoembriónica y presenta una mayor acumulación de reservas, por lo que resulta en terminos generales más vigorosa). En el caso de las dos variedades poliembriónicas, la propuesta era ver si podía distinguirse el origen cigótico o nucelar de las plántulas más vigorosas, es decir, las que germinaron primero, presentaron un mayor crecimiento y sobrevivieron hasta el final de la evaluación (14 semanas después del establecimiento en macetas). Lo que se observa en los análisis de similitud es que las plántulas emergidas primero

de una misma semilla, con un mayor desarrollo, pueden agruparse muy cercanamente a las terceras, cuartas o quintas, como puede verse en las figuras 45 y 48 en las dos variedades poliembriónicas en la mayoría de los casos.

Naik (1948) observó variación significativa entre árboles del mismo ‘clon’ en mango, notando diferencias en la forma, color y calidad de los frutos, lo cual se atribuye a mutaciones somáticas naturales o inducidas (Young y Ledin, 1954). Gracias a esta variabilidad, Mukherjee y col. (1983), Singh y col. (1981, 1985) y Whiley y col.(1993) han logrado identificar algunos clones superiores resistentes a la mancha negra bacteriana.

Para comprobar la presencia de elementos móviles en el genoma de mango y determinar si las diferencias genotípicas encontradas se deben a éstos, se tendrían que realizar estudios que utilicen a los RTN como marcadores moleculares, como los **SSAP** (*Sequence Specific Amplified Polymorphism*), que son muy similares a la técnica AFLP, aunque se utilizan iniciadores homólogos a una secuencia específica, en este caso del RTN (Waugh *et al.*, 1997). Otro tipo de marcadores son los **IRAP** (*Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism*) son marcadores que se basan en la amplificación de la zona que se encuentra entre dos RTN situados próximos y en orientaciones opuestas en el genoma (Kalendar *et al.*, 1999). Los **REMAP** (*Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism*) detectan polimorfismos entre la zona amplificada comprendida entre un RTN y un microsatélite (SSR) (Kalendar *et al.*, 1999). Los **RBIP** (*Retrotransposon-Based Insertion Polymorphism*) utilizan como cebadores una secuencia del RTN y una secuencia del DNA flanqueante a este elemento, detectan presencia/ausencia del RTN (Flavell *et al.*, 1992). Los **RVIP** (*Retrotransposon Internal Variation Polymorphism*) utilizan como cebadores secuencias internas a los RTN, y

sirven para revelar variaciones en la estructura interna de las diferentes copias de un elemento (Vershinin y Ellis, 1999).

Otra manera de abordar el estudio de la variabilidad genética podría ser a través del cariotipo, que permite detectar cambios en el número y estructura de los cromosomas. De esta manera podrían detectarse traslocaciones, inversiones, deleciones y duplicaciones. Los cambios cariotípicos constituyen una fuente importante de variación. Además de los recuentos cromosómicos, existen algunas técnicas para estimar cariotipos como el bandeo cromosómico que permite detectar rearrreglos importantes cuando el número cromosómico es estable. La hibridación *in situ* es otra técnica que podría aportar información útil para detectar cambios genéticos estructurales (Cardone *et al.*, 2010).



## 8. CONCLUSIONES

Los frutos y semillas de la variedad monoembriónica ‘Haden’ presentan en general, valores de tamaño, PBF y firmeza mayores; con respecto a los de las variedades poliembriónicas ‘Manila’ y ‘Ataulfo’. Mientras que en °Brix las variedades poliembriónicas presentan los valores más altos. Éstos y el resto de los parámetros analizados pueden ser muy variables de acuerdo al año de producción e incluso al árbol de colecta y sitio si comparamos los resultados con los obtenidos en otros trabajos para las mismas variedades. Lo anterior puede ser debido a que las variedades estudiadas presentan plasticidad fenotípica en respuesta a cambios en el ambiente.

La capacidad de germinación en general resultó alta en las tres variedades estudiadas, (arriba del 88%) y el tiempo que tardaron en germinar las semillas, fue variable en función del PBF de la semilla. Las semillas de la variedad ‘Haden’ germinaron en menor tiempo que las de las variedades poliembriónicas. Las diferencias pueden explicarse por el hecho de que las semillas de ‘Haden’ son más grandes y por lo tanto, almacenan una mayor cantidad de reservas que promueven la emergencia de la radícula en menor tiempo.

El PBF de la semilla tiene un efecto significativo no solamente en el tiempo medio de germinación, sino también en el tamaño de las plántulas a las 14 semanas. La variedad ‘Haden’ presentó valores mayores en los parámetros de crecimiento evaluados: longitud de la plántula, área foliar y RGR. Una lenta germinación puede influir directamente sobre el crecimiento de las plántulas. La tasa de crecimiento relativo no está determinada sólo por el PBF de las semillas, ni por el tiempo de germinación, además influyen la información genética

de cada individuo y la asignación de recursos hacia todos los órganos de la planta para poder desarrollar raíces más grandes o mayor cantidad de hojas, lo cual está determinando en cierta medida por las condiciones ambientales. La sobrevivencia fue menor en las variedades 'Manila' y 'Ataulfo' durante la germinación y crecimiento que en la variedad 'Haden'.

Las semillas de las variedades poliembriónicas produjeron entre 1 y 9 plántulas por semilla; en general, el número de embriones funcionales es variable de año a año de producción en el mismo sitio de colecta, esto puede ser debido a la posición del fruto en el árbol, a la competencia que se establece entre los embriones desde su formación y que puede impedir que algunos de éstos no se desarrollen completamente o no puedan germinar por la posición dentro de la semilla. Las condiciones ambientales pueden también influir en el número de embriones formados por semilla. La poliembriónía parece ser una ventaja para la planta madre en detrimento de las plántulas hijas, las cuales compiten entre sí desde el comienzo del desarrollo de la semilla. Como mencionamos, esta competencia limita el volumen de los embriones, el tamaño de las plántulas originadas y su capacidad de sobrevivencia, pero si al menos sobreviven dos plántulas por semilla la estrategia reproductiva es ventajosa.

Las plántulas que emergen primero en las semillas poliembriónicas presentan una RGR y porcentaje de sobrevivencia mayores que el resto con las que comparten la misma semilla. La sobrevivencia, de las primeras plántulas emergidas de las variedades poliembriónicas, no depende del número de embriones que comparten la misma semilla.

A partir de los parámetros físico-químicos y morfológicos no fue posible distinguir a las plántulas de origen nucelar o cigótico en las variedades poliembriónicas, por lo que las

diferencias en la germinación, crecimiento y sobrevivencia pueden estar fuertemente influenciadas por el PBF de las semillas y por el genotipo.

En las semillas poliembriónicas puede preservarse o no el embrión cigótico; sin embargo, su presencia o ausencia no fue clara mediante los análisis AFLPs, a diferencia de los resultados encontrados en otros estudios con isoenzimas y RAPDs. Es posible que esta diferencia se deba a que la cantidad de fragmentos polimórficos generados es más bajo en los marcadores con isoenzimas y RAPDs que en los AFLPs y, por lo tanto, no se puede tener un análisis fino con estos últimos.

En los individuos analizados de las tres variedades, los AFLP demostraron que existe variabilidad genética, lo que está explicado en parte por la recombinación genética (como producto de la reproducción sexual, que implica recombinación o rearrreglo de genes durante el proceso de formación de las células reproductivas o gametos). La variabilidad producida de esta forma es sumamente importante para la evolución y supervivencia de las especies. La variedad monoembriónica 'Haden' resultó genéticamente menos variable que las poliembriónicas, debido posiblemente a que en algunas variedades monoembriónicas la fecundación se da a través de la autopolinización.

Si las plantas analizadas en las variedades poliembriónicas procedieran de embriones de tipo nucelar, la alta variabilidad encontrada puede estar dada únicamente por mecanismos que generan variabilidad somaclonal, como la presencia de elementos móviles como los transposones, variabilidad epigenética y pequeñas mutaciones puntuales que dan como resultado diferencias genéticas. Sin embargo, estas diferencias difícilmente se transmiten o se

heredan a las próximas generaciones, por lo que a pesar de que se observan diferencias genéticas en todos los individuos analizados, el pool genético heredado por la planta madre a los hijos se conserva en esencia y se transmite a las nuevas generaciones. Aunque en algunos casos estos cambios en el genoma se expresan y por ello se han podido seleccionar clones superiores que presentan algunas ventajas adaptativas.

Los resultados de los análisis morfológicos y físico-químicos, juntos con los datos generados mediante los AFLPs pueden ser útiles para hacer algunas recomendaciones prácticas en el establecimiento de huertas a partir de poratinjertos poliembriónicos. Generalmente, las huertas de variedades monoembriónicas o poliembriónicas se establecen sobre este tipo injertos, seleccionando las plántulas más vigorosas, que de acuerdo a los productores son las de origen nucelar, lo cual, permite la homogeneidad de las poblaciones en cuanto a la altura de los árboles, el tamaño de la copa del árbol, la producción y calidad de frutos, así como la resistencia a factores ambientales de estrés, como salinidad y enfermedades. Un hecho ventajoso de que las plántulas de origen nucelar presenten variabilidad genética y no sean clones idénticos entre las plántulas hermanas y con respecto a la planta madre es que podrían responder a distintos factores ambientales de estrés de distintas maneras.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Galil, H. A. 1992. Evaluation of certain techniques for germination of mango seed stones. *Assiut Journal of Agricultural Sciences* 23: 134-151.
- Adato, A., Sharon, D., Lavi, U., Hillel, J. y S. Gazit. 1995. Application of DNA fingerprints for identification and genetic analyses of mango (*Mangifera indica*) genotypes. *Journal of the American Society of Horticultural Science* 120: 259-264.
- Afzelius, K. 1928. Die Embryobildung bei *Nigritella nigra*. *Svensk Botanisk Tidskrift* 22(1-2): 82-91.
- Aguiar, I. B. DE. 1995. Conservação de Sementes. Manula Técnico de sementes florestais, I. F. *Série Registros*, São Paulo 14: 33-44.
- Agustí, M. 2003. Citricultura. 2ª. Ed. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España.
- Ahmad, I., Malik, A.U., Malik, S.A., Tabassam, N., Rahman, M. e Y. Zafar. 2008. Application of DNA fingerprinting technology to estimate genetic divergence among mango cultivars-genotypes. *Acta Horticulturae* 773: 127-132.
- Akiyama, Y., Goel S., Chen Z., Hanna W. W., y P. Ozias-Akins. 2006. *Pennisetum squamulatum*: Is the Predominant Cytotype Hexaploid or Octaploid? *Journal of Heredity* 97(5): 521-524.
- Alcántara, J. M. y P. J. Rey. 2003. Conflicting selection pressures on seed size: evolutionary ecology of fruit size in a bird-dispersed tree, *Olea europea*. *Journal of Evolutionary Biology* 16: 1168-1176.
- Alexander, H. M., Cummings, C. L., Kahn, L. y A. A. Snow. 2001. Seed size variation and predation of seeds produced by wild and crop-wild sunflowers. *American Journal of Botany* 88: 623-627.
- Alves, E. O. S., Cerqueira-Silva, C. B. M., Souza, A. M., Santos, C. A. F., Lima Neto, F. P. y R. X. Corrêa. 2012. Comparison of efficiency of distance measurement methodologies in mango (*Mangifera indica*) progenies based on physicochemical descriptors. *Genetic and Molecular Research* 11(1): 591-596.
- Ampofo, S. T., Moore, K. G. y P.H. Lovell. 1976. The role of the cotyledons in four *Acer* species and in *Fagus sylvatica* during early seedling development. *New Phytologist* 76: 31-39.
- Antúnez, I. E., Retamosa, C. y R. Villar. 2001. Relative growth rate in phylogenetically related deciduous and evergreen woody species. *Oecologia* 128: 172-180.

- Araóz, S., Del Longo, O. y Karlin, O. 2004. Germinación de semillas de *Zyzyphus mistol* Grisebach III. Correlaciones paramétricas del tamaño y peso de drupas, endocarpos y semillas con la germinación y el vigor. *Multequina* 13: 51-56.
- Aravanopoulos, F. A. 2003. Molecular identification of micropropagated plants. *Acta Horticulturae* 616: 25-47.
- Archibald, E. E. A. 1939. The Development of the Ovule and Seed Jointed Cactus *Opuntia durantiaca* Lindley. *South African Journal of Science* 39: 195–211.
- Aron, Y., Czosnek, H., Degani, C., and Gazit, S. 1997. Segregation distortion and linkage of mango isozyme *loci*. *Horticultural Science* 32: 918-920.
- Aron, Y., Czosnek, H., Gazit, S. y C. Degani. 1998. Polyembryony in mango (*Mangifera indica* L.) is controlled by a single dominant gene. *Horticultural Science* 33: 1241-1242.
- Arumuganathan, K y E. D. Earle 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter* 9: 208–218.
- Atkinson, D. 1980. The distribution and effectiveness of the roots of tree crops. *Horticultural Reviews* 2: 424-490.
- Austin, R. y L. Longden. 1967. Some effects of seed size and maturity on the yield of carrot crops. *Journal of Horticultural Science* 42: 339-353.
- Avilán, L., Leal, F. y D. Bautista. 1992. Manual de fruticultura. Editorial América. Caracas, Venezuela.
- Avilán R. L., Rodríguez, M. Ruiz, J. 1995. Germinación de algunas variedades de mango con bajo y mediano porte para ser usadas como patrones. *Agronomía Tropical* 54: 445-456.
- Azofeifa-Delgado, A. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana* 17: 221-242.
- Bajpai, A., Srivastava, N., Rajan, S. y R. Chandra. 2008. Genetic diversity and discrimination of mango accessions using RAPD and ISSR markers. *Indian Journal of Horticulture* 65(4): 377-382.
- Bally, I. S. E. 1998. Mango variety R2E2 fact sheet. Queensland Horticultural Institute, QDPI, Brisbane.
- Bally, I. S. E., Graham, y R. J. Henry. 1996. Genetic diversity of Kesington mango in Australia. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 36(2): 243-247.

- Bally, I. S. E. 2006. *Mangifera indica* (mango) Anacardiaceae (cashew family). Species Profiles for Pacific Island Agroforestry. Disponible en: <[www.traditionaltree.org](http://www.traditionaltree.org)>. Consulta: abril 20, 2009.
- Bally, I. S. E., Ping, L. y P. R. Johnson. 2009. Capítulo 2. Mango breeding. En: Jain S. M, Priyadarschan P. M. (eds.). Breeding plantation tree crops: Tropical species. Springer Science+Business Media, LLC. pp. 51-82.
- Baloch, H. A., DiTommaso, A. y A. K. Watson. 2001. Intrapopulation variation in *Abutilon theophrasti* seed mass and its relationship to seed germinability. Seed Science Research 11: 333-345.
- Barbosa, M. C. 2003. Desarrollo de frutos de mango *Mangifera indica* L. var. 'Haden' y prevención de antracnosis. Tesis de Maestría en Biología de la UAM-Iztapalapa. 124 pág.
- Bashaw, E. C. y W. W. Hanna. 1990. Apomictic reproduction. En: Chapman, G. (ed.). Reproductive versatility in the grasses. Cambridge, UK Cambridge University Press. pp. 100-130.
- Baskshi, J. C. 1963. Germination of mango stones in relation to the depth and time of sowing. Punjab Horticultural Journal 3: 199-204.
- Batygina T. B. y T. E. Freiberg. 1979. Polyembryony in *Poa pratensis* L. (Poaceae). Bot. Zh. 64 (6): 793–804.
- Batygina T. B. y G. Y. Vinogradova. 2007. Phenomenon of polyembryony. Genetic heterogeneity of seeds. Russian Journal of Developmental Biology 38(3): 126–151.
- Becerril-R., A. E., Beech, M. G. y J. D. Quinlan. 1995. Carbohydrate distribution in the strawberry plant. Revista Chapingo Serie Horticultura 1(4):7-20.
- Beguiristain, T., Grandbastien, M. A., Puigdomenech, P. y J. M. Casacuberta. 2001. Three *Tnt1* subfamilies show different stress-associated patterns of expression in tobacco. Consequences for retrotransposon control and evolution in plants. Plant Physiology 127: 212–221.
- Begum, H., Reddy, M. T., Malathi, S., Reddy, B. P., Arcahk, S., Nagaraju, J. y E. A. Siddiq. 2012. Molecular analysis for genetic distinctiveness and relationships of indigenous landraces with popular cultivars of mango (*Mangifera indica* L.) in Andhra Pradesh, India. The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology 6(1): 24-37.
- Beveridge, J. y C. P. Wilse. 1959. Influence of depth of planting, seed size, and variety on emergence and seedling vigor in alfalfa. Agronomy Journal 51:731-734.

- Bhargava, R. y R. Khorwal. 2011. Molecular characterization of *Mangifera indica* by using RAPD marker. Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences 1(1):47-49. Disponible en: <<http://www.cibtech.or/jls.htm>>. Consulta: febrero 19, 2012.
- Bhattacharjee, A. K., Mitra, B. N. y P. C. Mitra. 2000. Seed agronomy of jute. I. production and quality of *Corchorus ollitorius* seeds as influenced by seed size used at planting. Seed Science and Thecnology 28: 129-139.
- Bicknell, R. A. y A. M. Koltunow. 2004. Understanding apomixis: Recent advances and remaining conundrums. The Plant Cell 16:S228-S245.
- Bila, M. C. R. 2010. Morphological and genetic characterization of mango (*Mangifera indica* L.) varieties in Mozambique. Tesis de maestría University of the Free State Bloemfontein, South Africa. 143pág.
- Bila, M. C. R., Van Biljon, A. y L. Herselman. 2012. Morfhological and genetic characterization of mango (*Mangifera indica* L) varieties in Mozambique. Congreso Internacional Saber Tropical em Moçambique: História, Memória e Ciência. IICT-JBT, Palácio dos Condes da Calheta, Lisboa, 24-26 de Outubro de 2012.
- Blackman, V. H. 1919. The compound interés law and plant growth. Annals of Botany 33: 353-360.
- Bompard, J. M. 1993. The genus *Mangifera* re-discovered: the potential of wild species to mango cultivation. Acta Horticulturae 341: 69-77.
- Bompard, J. M. y R. Schnell. 1997. Chapter 2. Taxonomy and Sistemetics. En: R.E. Litz (Ed.). The Mango, Botany, Production and Uses. CAB International. Wallingford. Oxon, UK. pp. 21-48.
- Bonfil, C. 1998. The effect of seed size, cotyledon reserves, and hervibory on seedling survival and growth in *Quercus rugosa* and *Q. laurina* (Fagaceae). American Journal of Botany 85: 79-87.
- Borges, C. A. M., Lopes De Siqueira, D., Dias, D. C. F. D. S. y A. A. Cardoso. 2003. Effect of seed mass and storage on germination and seedling growth of the mango ‘Espada’. Pesquisa Agropecuaria Brasileira 38: 999-1004.
- Bose, T. K. 1985. Mango. In: Bose TK (ed) Fruits of India: Tropical and Sub-tropical. Naya Prokash, Calcutta, India, pp 69–123.
- Bouman, F. y F. D. Boesewinkel. 1969. On a case of polyembryony in *Pterocarya fraxinifolia* (Junglandaceae) and on polyembryony in general, Acta Botanica Neerlandica 18(1): 50–57.



- Brettell, R. I. S., Johnson, P. R., Kulkarni, V. J., Muller, W. y I. S. E., Bally. 2004. Inheritance of fruit characters in hybrid mangoes produced through controlled pollination. *Acta Horticulturae* 645: 319-326.
- Brown, S. M., Hopkins, M. S., Mitchell, S. E., Senior M. L., Wang, T. Y., Duncan, R. R., Gonzalez-Candelas, F. y S. Kresovich. 1996. Multiple method for the identification of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in sorghum (*Sorghum bicolor* L.) Moench). *Theoretical and Applied Genetics* 93: 190-198.
- Cameron, J. W. y M. J. Garber. 1968. Identical-twin hybrids of Citrus x Poncirus from strictly sexual seed parents. *American Journal of Botany* 55(2): 199-205.
- Campbell, R. J. 1992. Mangos: A guide to Mangos in Florida. Fairchild Tropical Garden Publ. Miami 200 pág.
- Capote, M., Becker, D., Cueto, J. y W. Rohde. 2003. Development and application of various DNA marker types for characterization of genetic diversity within comercial mango varieties in Cuba. *Journal of Genetics and Breeding* 57: 175-184.
- Cardone, S., Olmos, S. y V. Echenique. 2010. III. Métodos para generar variabilidad. Variación somaclonal. En: Echenique, V., Rubinstein, C. y L. Mroginski (eds.). *Bioteconología y mejoramiento vegetal. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Bioteconología. Argentina.* pp. 81-96.
- Cavers, P. B. y M. G. Steel. 1984. Pattermns of change in seed weight over time on individual plants. *American Naturalist* 124: 324-335.
- Chadha, K. L. y R. L., Pal. 1986. *Mangifera indica*. En: Halevy, H. A. (ed.). *CRC Handbook of flowering. Vol. 5 CRC Press, Boca Raton, Fla, Estados Unidos* pp. 111-130.
- Chandra, N. 1980. Some physiological changes accompanying loss viability of the seeds of *Mangifera indica*. *Plant Biochemical Journal* 7: 105-109.
- Chauran, O. R., Manica, I., Pinheiro, R. V. R., Conde, A. R. y J. R. P. Chaves. 1979. The effect of storage time, seed treatment, and fungicides on seed germination and growth of mango seedlings. *Revista Ceres*. 26: 1-12.
- Chávez, C. X., Vega, A. P., Tapia, L. M. y Miranda, S. 2001. Mango, su manejo y producción en el trópico seco de México. INIFAP. Morelia, México. pp. 17-25.
- Chunwongse, J. Babprasert, C., Kaewthung, J., Boonreungrawd, R., Chunwongse, C. y C. Phumichai. 1999a. Some characteristics of DNA markers studied in mango cultivars

‘Alphonso’ and ‘Palmer’ and their segregating population. Proceedings of the Six International Mango Symposium. Working abstracts and Program (ISH). Tailandia pp. 172.

- Chunwongse, J., Jintanavong, S., Kaewthung, J., Sukonthasuk, S. y C. Phumichai. 1999b. Identification of Indochinese typo mango gametic seedlings from the cross between cultivar ‘Betti’ and ‘Nang Klang Wan’. Proceedings of the Six International Mango Symposium. Working abstracts and Program (ISH). Tailandia pp. 168.
- Chunwongse, J., Phumichai, C., Chunwongse, C., Sukonsawan, S., Boonreungrawd, R. y C. Babprasert. 2000. Molecular mapping of mango cultivars ‘Alphonso’ and ‘Palmer’. *Acta Horticulturae* 509: 193-205.
- Cilliers, B., Human, C. F., Snyman, J. C. y K. Carstens. 1997. Strategies, progress and result from the South African mango breeding programme. *Acta Horticulturae* 455: 241-244.
- Cook, R. E. 1975. The photoinductive control of seed weight in *Chenopodium reubrumk* L. *American Journal of Botany* 62: 427-431.
- Cooper, D. C. 1943. Haploid-diploid twin embryos in *Lilium* and *Nicotiana*. *American Journal of Botany* 30: 408-13.
- Copeland, O. L. y M .B. McDonald. 1995. *Seed Science and Technology*. Third Edn., Chapman and Hall. New York.
- Corbineau, F., Knate, M. y D. Come. 1987. Seed germination and seedling development in mango. *Fruits* 42: 113-120.
- Corbineau, F. 1988. Germination des grains et developement des plantules de manguier (*Mangifera indica* L.). *Fruits* 42(2): 113-120.
- Cornelissen, J. H. C., Castro-Diez, P. y R. Hunt. 1996. Seedling growth, allocation and leaf attributes in a wide range of woody plant species and types. *Journal of Ecology* 84: 755-765.
- Coroza, C. A. 2004. Genetic characterization of mango (*Mnagifera indica* L.) cultivars through isozyme analysis. Thesis Ms in Genetics. 95 pág.
- Coroza-Almontero, C. y R. R. C. Espino. 2010. Genetic characterization of mango (*Mangifera indica* L.) cultivars through isozyme analysis. *Philippine Agricultural Scientist* 93(2): 238-244.
- Costa, M. E., Sampaio, D. S., Paoli, A. A. S. y S. C. A. L. Leite. 2004. Poliembrionia e aspectos de embriogênese em *Tobebuia ochracea* (Chamisso) Standley (Bignoniaceae). *Revista Brasileira de Botanica* 27: 395-406.

- Crane, C. F. 2001. Classification of apomictic mechanisms. En: Savidan, Y., Carman, J. G. y T. Dresselhaus (eds.). The flowering of apomixis: from mechanisms to genetic engineering. México, D. F: CIMMYT, IRD, European Comission DG VI (FAIR) pp.24-43.
- Crane, J. H. 1998. Cultural practices of mango under subtropical and tropical conditions. Foro Internacional de Mango y otras Frutas Tropicales. Mazatlán, Sinaloa. México. 16-17 de febrero de 1998. Banco de México-FIRA.
- Crane, J. H., Bally, I. S. E. y R. Mosqueda-Vazquez. 1997. Crop production En: R.E. Litz (Ed.). The Mango, Botany, Production and Uses. CAB International. Wallingford. Oxon, UK. 225 pág.
- Crane, J. H., Bally, I. S. E., Mosqueda-Vazquez, R. V. y E. Tomer. 2009. Crop production: management. En: Litz, R. E. (ed.). The mango. Botany, production and uses. 2ª ed. CABI, USA. 435 pág.
- Crews, D. y J. A. McLanchlan. 2006. Epigenetics, evolution, endocrine disruption, helath, and disease. *Endocrinology* 147(6): 4-10.
- Cruz Hernández, A. y R. E. Litz. 1997. Transformation of mango somatic embryos. *Acta Horticulturae* 455:92-298.
- Cumare, J. A. S. y L. A. R. Avilán. 1994a . Descripción y caracterización de nueve variedades de mango a ser usadas como patrones: I. Descripción. *Agonomía Tropical* 44(3):73-391.
- Cumare, J. A. S. y L. A. R. Avilán. 1994b. Descripción y caracterización de nueve variedades de mango a ser usadas como patrones. III: estudio fenológico. *Agonomía Tropical* 44(3):17-439.
- Dag, A., Eisenstein, D., Gazit, S. El-Bastri, R. y C. Degani. 1998. Effect of pollenizer distance and selective fruitlet abscission on outcrossing rate yield in ‘Tommy Atkins’ mango. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 123(4): 618-622.
- Dag, A., Degani, C. y S. Gazit. 2009. Gene flow in mango orchards and its impact on yield. *Acta Horticulturae* 820: 347-350.
- Damodaran, T., Kannan, R., Ahmed, I., Srivastava, R. C., Rai, R. B. y S. Umamaheshwari. 2012. Assessing genetic relationships among mango (*Mangifera indica* L.) accessions of Andaman Islands using simple sequence repeat markers. *New Zeland Journal of Crop and Horticultural Science*. iFirst.
- De Souza, V. A. B. y P. S. C. Lima. 2004. Genetic variability in mango genotypes detected by RAPD markers. *Acta Horticulturae* 645: 303-310.

- Degani, C., El-Batsri, R. y S. Gazit. 1990. Enzyme polymorphism in mango. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 115: 844-847.
- Degani, C., Cohen, M., El-Batsri, R. y S. Gazit. 1992. PGI isoenzyme diversity and its genetic control in mango. *HortScience* 27: 252-254.
- Degani, C. M., Cohen, M., Reuveni, O., El-Batsri, R. y S. Gazit. 1993. Frequency and characterization of zygotic seedlings from polyembryonic mango cultivars, determined using isoenzymes as genetic markers. *Acta Horticulturae* 341: 78-81.
- Deng-Jiu-Sheng., Lai-Zi-Chang y Bai-Zhi-Ying. 1999. RAPD analysis of mango cultivars. *Journal of Fruit Science* 16 (2): 156.
- Deqiu, S. 1997. Fingerprinting trifoliolate orange germplasm accesions with isozymes, RFLPs and inter-simple sequence repeat markers. *Theoretical and Applied Genetics*, Abstract 95(1/2): 211-219.
- Díaz-Matallana, M., Schuler-García, I., Ruíz-García, M. y E. Hodson de Jaramillo. 2009. Analysis of diversity among of six populations of Colombian mango (*Mangifera indica* L. cvar. Hilacha using RAPDs marker. *Electronic Journal of Biotechnology* 12(3): 1-8.
- Doijode, S. D. 1989. Loss viability and membrane damage during storage of mango seeds. *Proc. Natl. Sem Mango Lucknow* 1: 24.
- Doijode, S. D. 2001. Seed storage of horticultural crops: Seed storage in fruit crops. *Food Products Press*. pp. 41-46.
- Dos Santos-Ribeiro, I. C., Lima-Neto, F. P. y C. A. Santos. 2012. Allelic database and accession divergence of a Brazilian mango collection based on microsatellite markers. *Genetics and Molecular Research*. Oct 9;11 (AOP). [Epub ahead of print]. Disponible en: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23096906>>. Consulta: octubre 29, 2012.
- Duval, M. F. 2006. Genetic diversity of Caribbean mangoes (*Mangifera indica* L.) using microsatellite markers. En: 8<sup>th</sup> International Mango Symposium. Febrero 5-10. Sun City, South Africa.
- Duval, M. F., Bunel, J., Sitbon, C. y A. M. Risterucci. 2005. Development of microsatellite markers for mango (*Mangifera indica* L.). *Molecular Ecology Notes* 5(4): 824-826.
- Echeverría-Machado, I., Sánchez-Cach, L. A., Hernández-Zepeda, C., Rivera-Madrid, R. and Moreno-Valenzuela, O. 2005. A simple and efficient method for isolation of DNA in high mucilaginous plant tissues. *Molecular Biotechnology* 31: 129-135.

- Eiadthong, W., Yonemoni, K., Sugiura, A. Utsunomiya, N. y S. Subhadrabandhu. 1998. Isozyme polymorphism of mango cultivars in Thailand. *Thai Journal of Agricultural Science* 31(4): 555-568.
- Eiadthong, W., Yonemoni, K., Sugiura, A. Utsunomiya, N. y S. Subhadrabandhu. 1999a. Analysis of phylogenetic relationships in *Mangifera* by restriction site analysis of an amplified region of cpDNA. *Scientia Horticulturae* 80: 145-155.
- Eiadthong, W., Yonemoni, K., Sugiura, A., Utsunomiya, N. y S. Subhadrabandhu. 1999b. Identification of mango cultivars of Thailand and evaluation of their genetic variation using the amplified fragments by simple sequence repeat-(SSR) anchored primers. *Scientia Horticulturae* 82: 57-66.
- Eiadthong, W. Yonemoni, K., Kanzaki, S., Sugiura, A. Utsunomiya, N. y S. Subhadrabandhu. 1999c. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis for studing the genetic relationship among *Mangifera* species in Thailand. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 125: 160-164.
- Eiadthong, W., Yonemori, K., Kanzaki, S., Sugiura, A., Utsunomiya, N. y S. Subhadrabandhu. 2000. Amplified fragment length polymorphism for studing genetic relationships among *Mangifera* species in Thailand. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 125: 160-164.
- Ekdahl, I., 1941. The development of embryo sac and embryo in *U glabra* Huds. *Svensk Botanisk Tidskrift* 35: 143-56.
- El Tahir, B. A. 1995. The effects of capsule size, soil media and light intensity on germination and seedling growth of Mahogany *Khaya senegalensis* (Desr. A. Juss). En: K. Olensen (Ed.) *Innovations in tropical tree seed technology. Proceedings of the IUFRO of the Project Group P-2.04.00. Arusha. Tanzania. Septiembre 7-10, 1995. Danida Forest Seed Centre, Denmark.*
- Ellis, R. A. y E. H. Roberts. 1981. The quantification of ageing and survival in orthodox seeds. *Seed Science and Technology* 9: 373-409.
- Esen, A. y R. K. Soost. 1977. Adventice embryogenesis in *Citrus* and its relation to pollinitation and fertilization. *American Journal of Botany*. 64: 607- 614.
- Espinosa-Osornio, G. y E. M. Engleman. 1998. Breve recopilación de anatomía de semillas. Colegio de Posgraduados. Edo. de México, México. 45 pág.

- Espinoza, F., Pessino, S. C., Quiarin, C. L. y E. M. Valle. 2002. Effect of pollination timing on the rate of apomorphic reproduction revealed by RAPD markers in *Paspalum notatum*. *Annals of Botany* 89: 165-170.
- Evans, E. 2008. Tendencias recientes en la producción, comercio y consumo de mango en el mundo y en los Estados Unidos. Food and Resource Economics, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences. University of Florida. United States of America. 24 pág.
- Fang, J. G., Liu, D. J., Zhnag, Z., Hillel, J. y U. Lavi. 1999. The construction of the fingerprinting of two mango cultivars using AFLP. *Journal of Nanjing Agricultural University* 22(2): 25-27.
- Fang, J. G., Zhang, Z., ZW, Ma, Liu, D. J., Wang, S. H. y U. Lavi. 2000. The polymorphisms and segregation patterns in the F1 progenies from the cross of two mango cultivars. *Scientia Agricola Sin.* 33(3): 19-24.
- Fang, J. G., Qiao, Y. S., y Z. Zhang. 2001. Application of AFLP in the cultivar identification of mango. *Guihaia* 3.
- FAO, 2008. Statistics on mango production. FAOSTAT Database. Disponible en: <<http://faostat.fao.org>> Consulta: febrero 21, 2008.
- FAO, 2009. Statistics on mango production. FAOSTAT Database. Disponible en: <<http://faostat.fao.org>> Consulta: marzo 14, 2009.
- FAO, 2010. Statistics on mango production. FAOSTAT Database. Disponible en: <<http://faostat.fao.org>> Consulta: octubre 10, 2010.
- FAO, 2012. Statistics on mango production. FAOSTAT Database. Disponible en: <<http://faostat.fao.org>> Consulta: septiembre 6, 2012.
- Farrell, R. E. 1988. RNA methodologies: A laboratory guide for isolation and characterization. Academic Press. 531 pág.
- Flavell, A. J., Dunbar, E., Anderson, R., Pearce, S. R., Heartley, R. y A. Kumar. 1992. Ty1-copia group retrotransposons are ubiquitous and heterogeneous in higher plants. *Nucleic Acids Research* 20: 3639-3644. Doi:10.1093/nar/20.14.3639. PMID: 1379359.
- Fenner, M. y K. Thompson. 2005. The ecology of seeds. Cambridge University Press. USA. Flores-Campaña, L. M., Arzola-González, J. F., Ramírez-Soto, M. y A. Osorio-Pérez.

2012. Repercusiones del cambio climástico global en el estado de Sinaloa, México. Cuadernos de Geografía. Revista Colombiana de Geografía 21(1): 115-129.
- Feret, P.P. y F. Bergmann. 1976. Gel electrophoresis of proteins and enzymes. En: J. P. Miksche (ed.). Modern methods in forest genetics. Springer-Verlag, Berlin. pp. 49–77.
  - Fernandes-Santos, C. A., Lima-Neto, F. P., Amorim-Rodrigues, M. y J. Gomes-Da Costa. 2008. Similaridade genética de acessos de mangueira de diferentes origens geográficas avaliadas por marcadores AFLP. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal – SP 30(3): 733-740.
  - Fernandes-Santos, C. A. y F. P. Lima-Neto. 2011. Outcrossing rate between ‘Haden’ and ‘Tommy Atkins’ mangoes estimated using microsatellite and AFLP markers. Pesquisa Agropecuária Brasileira 46(8): 899-904.
  - Fitmawati, I., Hartana, A. y B. S. Purwoko. 2010. Diversity of Indonesian mango (*Mangifera indica*) cultivars basei on morphological and RAPD markers. SABRAO Journal of Breeding and Genetics 42(2): 84-95.
  - Flores-Campaña, L. M., Arzola-González, J. F. y A. Osorio-Pérez. 2012. Repercusiones del cambio climático global en el estado de Sinaloa, México. Cuadernos de Geografía. Revista Colombiana de Geografía 21(1): 115-119.
  - Flores J., Jurado, E., Chapa-Vargas, L., Ceroni-Stuve, A., Davila-Aranda, P., Galíndez, G., Gurvich, D., León-Lobos, P., Ordoñez, C., Ortega-Báez, P., Ramírez-Bullón, N., Sandoval, A., Seal, C.E., Ullian, T. y H. W. Pritchard. 2011. Seeds photoblastism and its relationship with some plant traits in 136 cacti taxa. Environmental and Experimental Botany 71: 79-88.
  - Gajera, H. P., Tomar, R. S., Patel, S. V., Viradia, R. R. y B. A. Golakiya. 2011. Comparison of RAPD and ISSR markers for genetic diversity analysis among different endangered *Mangifera indica* genotypes of Indian Gir forest region. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology 20(2): 217-223.
  - Galán, S. V. y D. G. Fernández. 1984. Incidence of Soft-Nose on mangoes in Canary Islands. Proceedings of Florida State Horticultural Society 97: 358-360.
  - Galán, S. V., Acuña, B. F., Socorro Monzón, A. R., Herrera, R. L. y G. D. Fernández. 1989. Tolerancia de distintos patrones de mango (*Mangifera indica* L.) a la salinidad. Actas de Horticultura. III Congreso de la SECH 1: 83-89.
  - Galán, S. V. 1990. Los frutales tropicales en los subtrópicos. I Aguacate – Mango- Litchi y Logan. Mundi-Prensa. Madrid, España. 133 pág

- Galán, S. V. 1999. El cultivo de mango. Mundi Prensa, Madrid, España. 298 pág.
- Galán, S. V., Coello, T. A., Gramal, M. M. J., Juárez, J., Navarro, L. y G. D. Fernández. 1999. A case study of a tetraploid mango. Working Abstracts and Program. The sixth Internacional Mango Symposium. Pattaya, Tailandia, 6-9 de abril de 1999. pp. 161.
- Galán, S. V., Coello, T. A., Grajal, M. M. J., Juárez, J., Navarro, L. y G. D. Fernández. 2001. Occurrence of spontaneous tetraploid nucellar mango plants. Horticultural Science 36(4): 755-757.
- Gálvez-López, D., Adriano-Anaya, M. L., Villareal-Treviño, C., Mayek-Pérez, N. y M. Salvador-Figueroa. 2007a. Diversidad isoenzimática de mangos criollos de Chiapas, México. Revista Chapingo. Serie Horticultura 13(1): 71-76.
- Gálvez-López, D., Salvador-Figueroa, M. y N. Mayek-Pérez. 2007b. Diversidad morfológica del fruto en germoplasma nativo de mango *Mangifera indica* L. (Anacardiaceae) nativo de Chiapas, México. En: Galante, P. E. (ed.). Cuadernos de Biodiversidad No. 24. Centro Iberoamericano de la Biodiversidad (CIBIO). España. pp. 10-19.
- Gálvez-López, D., Hernández-Delgado, S., González-Paz, M., Becerra-Leor, E. N. y M. Salvador-Figueroa. 2009. Genetic analysis of mango landraces from Mexico based on molecular markers. Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization 1:8. doi:10.1017/S147926210932434X
- Gálvez-López, D., Salvador-Figueroa, M., Becerra-Leor, E. N., González-Paz, M., Hernández-Delgado, S. y N. Mayek-Pérez. 2010. Molecular diversity and genetic relationships of mango germoplasm from Chiapas, México. Agrociencia 44: 907-915.
- Gan, Y. y E. H. Stobbe. 1996. Seedling vigor and grain yield of "Roblin" wheat affected seed size. Agronomy Journal 88: 456-460.
- Gan, Y. Y., Zaini, S. y A. Idris. 1981. Genetic variation in the grafted vegetatively propagated mango (*Mangifera indica*). Pertanika 4: 53-62.
- García, E. 1973. Modificación al sistema de clasificación de Köeppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana). Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Garner, R. J. y S. A. Chaudhri. 1976. *Mangifera indica* mango. En: The propagation of Tropical Fruit Trees. Food and Agriculture Organization of the United Nations and the Common wealth Agricultural Bureau, Wallingford, Oxon. pp. 403-474.
- Gazit, S. y A. Kadman. 1980. Mango rootstock selection. Horticultural Science 15: 69.



- Gazit, S. y A. Kadman. 1983. Selection of mango rootstocks for calcareous soils and saline irrigation water in the Arava. En: Institute of Horticulture. Scientific Activities. 1977-1981. Special publication, 222. The Volcani Center. 93.
- Gazit, S. y R. J. Knight. 1989. Asexual embryogenesis in the mango. BARD Project Rep I: 255-280. United States-Israel Binational Agricultural Research and Development Fund.
- George, P. V. y T. N. Nair. 1969. On the performance of mono- and polyembryonic roots-tocks in mango graft. Agriculture Research Journal Karald 7: 7-9.
- Geritz, S. A. H. 1995. Evolutionary stable seed polymorphism and small-scale spatial variation in seedling density. The American Naturalists 146: 685-707.
- Ghasemi, M. 2005. Using of RAPD markers for identification of nucellar and zygotic progenies in citrus rootstocks breeding program. XVII International Botanical Congress. Viena, Austria, 17 – 23 de julio de 2005. Abstract pp. 241.
- Giri, A. y M. Y. Chuadhary. 1966. Relation of mango stone's weight to its germination and seedling vigor. Pakistan Journal of Science 18: 148-150.
- Goguey, T. 1995. Approche architecturale des mecanismes de la croissance aerienne et de la floraison du manguier. Doctorat These. Université Montpellier II. Sciences et Techniques de Languedoc. Francia. 205 pág. y anexos.
- Gomes, C., Dales, G. R. B. y H. A. Oxford. 1998. The application of RAPD markers in stock discrimination of the four-wing flyngfish, *Hirundichthys alunis* in The Central Western Atlantic. Molecular Ecology 7: 1519-1527.
- Gómez, J. M. 2004. Bigger is not always better: conflicting selective pressures on seed size in *Quercus ilex*. Evolution 58: 71-80.
- González, A., Coulson, M. y R. Bretell. 2002. Development of DNA markers (ISSRs) in mango. Acta Horticulturae 575: 139-143.
- Gordon, A. D., Lattier, L. D., Silbiger, N. R., Torsella, J., Wolff, O. J. y K. M. Smith. 1998. Determination of genetic diversity and paternity in the Gray-Tailed vole (*Microtus canicaudus*) by RAPD-PCR. Journal of Mammology 79: 604-611.
- Grandbastien, M. A., Spielmann, A. y M. Caboche. 1989. *Tnt1*, a mobile retroviral-like transposable element of tobacco isolated by plant cell genetics. Nature (London): 337: 376-380. doi: 10.1038/337376a0. PMID: 2536143.
- Gray, A. J. 1997. The genetic basis of conservation biology. En: F. Spellerberg (Ed.). Conservation Biology. Longman Singapore Publishers (Pte.) Ltd. pp. 107-121.

- Gray, P. 1964. Handbook of basic microtechnique. McGraw-Hill Book Company. 3<sup>a</sup> ed. New York. 302 pág.
- Grewal, S. I. S. y D. Moazed. 2003. Heterochromatin in epigenetic control of gene expression. *Science* 301(5634): 798-802.
- Guianoli, E. 2004. Plasticidad fenotípica adaptativa en plantas. En: H. M. Cabrera (ed.). *Fisiología Ecológica en Plantas. Mecanismos y Respuestas a Estrés en los Ecosistemas*. pp. 13-15.
- Guignard, L. 1901. La Double Fécondation dans le *Naias major*. *J. Botanique* 15: 205–213.
- Gutterman, Y. 1992. Maternal effects on sedes during development. En: Fenner, M. (ed.). *Seeds: the ecology of regeneration in natural plant communities*. pp. 27-60. CAB International. Wallingford.
- Guzmán, E. C. 1998. Situación actual de la cadena productiva del Mango en México. Foro Internacional de Mango y otras frutas tropicales. FIRA-México. CIANO, INIFAP; Mazatlán, Sinaloa. México. 75 pág.
- Guzman, E. C., Ireta, O. A., y M. J. R. Acuña. 1993. Guía para cultivar mango en el sur de Sinaloa. Folleto para productores Núm. 7. Campo Experimental Sur de Sinaloa. CIRMO, INIFAP, SARH. 33 pág.
- Halos, S. C. y A. C. M. Ferreon. 1998. Assessment of genetic variation in Philippine mangoes using RAPD markers. *Philippine Journal of Crop Science* 23:73.
- Harper, J. L. y M. Obeid. 1967. Influence of seed size and depth of sowing on the establishment and growth of varieties of fiber and oil seed flax. *Crop Science* 7: 527-532.
- Harper, J. L., Lovell, P. H. y K. G. Moore. 1970. The shapes and sizes of seeds. *Annual Review of Ecology and Systematics* 1: 327-356.
- Hartmann, H. y D. Kester. 1987. *Propagación de plantas. Principios y prácticas*. Editorial Continental. México.
- Hautea, D. M., Parlan, C. P. Rabara, R. P. y R. F. Coronel. 2001. Molecular characterization of Philippine ‘Carabao’ mango using RAPD and AFLP markers. *Asian Agriculture Congress*. Abril 24 – 27, 2001. Abstract pp. 309.
- Hayes, W. B. 1957. *Fruit growing in India*. Kitabistan, Allahabad, India.
- He, X. H., Li, Y. R., Guo, Y. Z., Tang, Z. y R. B. Li. 2005. Genetic analysis of 23 mango cultivar collection in Guangxi province revealed by ISSR. *Molecular Plant Breeding* 3(6):829-834.

- He, X. H., Li, Y. R., Guo, Y. Z., Ou, S. J. y R. B. Li. 2007a. Identification of closely related mango cultivars by ISSR. Guihaia 1.
- He, X. H., Guo, Y. Z., Li, Y. M. y S. J. Ou. 2007b. Assessment of the genetic relationship and diversity of mango and its relatives by cpISSR marker. Agricultural Science in China 6(2):137-142.
- Hellum, A. K. 2000. Grading seed by weight in white spruce. En: K. Olesen (Ed.). Guide to Handling of Tropical and Subtropical Forest Seed. Danida Forest Seed Centre. Denmark. pp. 307-328.
- Hereford, J. y K. S. Mirouchi. 2005. Variation among populations of *Diosdia teres* (Rubiaceae) in environmental maternal effects. Journal of Evolutionary Biology 18: 124-131.
- Herrera, C. M., Jordano, P., López-Soria, L. y J. A. Amat. 1994. Recruitment of a mast-fruited, bird-dispersed tree: bridging frugivore activity and seedling establishment. Ecological Monographs 64: 315-344.
- Herrera, J. Alizaga, R., Guevara, E. y V. Jiménez. 2006. Germinación y crecimiento de la planta. Vol. 4. Fisiología de la producción de los cultivos tropicales. Villalobos, R. E. (ed.). Editorial Universidad de Costa Rica. pp. 6-43.
- Hirano, R. Oo, T. H y K. N. Watanabe. 2010. Myanmar mango landraces reveal genetic uniqueness over common cultivars from Florida, India, and Southeast Asia. Genome 53:321-330.
- Hirochika, H. y R. Hirochika. 1993. *Ty1-copia* group retrotransposons as ubiquitous components of plant genomes. The Japanese Journal of Genetics 68: 35-46.
- Hoffmann, W. A. y H. Poorter. 2002. Avoiding bias in calculations of relative growth rate. Annals of Botany 90: 37-42.
- Homsy, S. 1997. The mango industry in Israel –an overview. Acta Horticulturae 455:7-14.
- Honsho, C., Nishiyama, K., Eiadthong, S. y K. Yonemori. 2005. Isolation and characterization of new microsatellite markers in mango (*Mangifera indica* L.). Molecular Ecology Notes 5:152-154.
- Huang, G. D., Luo, C., He, X. H., Ou, S. J. y J. A., Zhou. 2008. Analysis on the genetic relationship of Gui Re mango (*Mangifera indica* L.) cultivars or lines. Journal of Tropical and Subtropical Botany 6.
- Huerta-Paniagua, R. y D. A. Rodríguez-Trejo. 2011. Efecto del tamaño de semilla y la temperatura en la germinación de *Quercus rugosa* Née. Revista Chapingo 17(2): 179-187.

- Huff, D. R., Quinn, J. A., Higgins, B. y A. J. Palazzo. 1998. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) variation among native little bluestem (*Schizachyrium scoparium* (Michx.) Nash)) populations from sites of high and low fertility in forest and grassland biomes. *Molecular Ecology* 7:1591-1597.
- Hulme, A. C. 1971. The mango: the biochemistry of fruits and their products. Academic Press, London. pp. 233-253.
- Hunt, R. 1982. Plant Growth Curves. The functional approach to plant growth analysis. Edward Arnold, Londres, Reino Unido. 248 pág.
- Hunt, R. 1990. Basic Growth Analysis. Unwin Hyman. Londres, Reino Unido. 112 pág.
- Hunt, R, Causton, D. R., Shipley, B. y A. P. Askew. 2002. A moder tool for classical plant growth analysis. *Annals of Botany* 90(4): 485-488.
- Iannelli, D., Cottone, C., Viscardi, M., D' Apice, L., Capparelli, R. y M. Boselli. 1998. Identification of genotypes of lemon by flow cytometry and RAPD markers. *International Journal of Plant Sciences* 159: 864-869.
- Illipront, Jr. R. A., Langerak, C. J. y W. J. M., Lommen. 1999. Variation in physical seed attributes relates to variation in growth of soybean seedlings within a seed lot. *Seed Science and Technology* 27:339-357.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). 2011a. Mapa de climas de Sinaloa, México. Disponible en: <http://mapserver.inegi.org.mx/geografia/espanol/estados/sin/clim.cfm?c=444&e=05> Consulta: octubre 10, 2011.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). 2011b. Mapa de temperatura media anual de Sinaloa, México. Disponible en: <http://mapserver.inegi.org.mx/geografia/espanol/estados/sin/temperat.cfm?c=444&e=25>. Consulta: octubre 10, 2011.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). 2011c. Mapa de precipitación promedio anual de Sinaloa, México. Disponible en: <http://mapserver.inegi.org.mx/geografia/espanol/estados/sin/precipit.cfm?c=444&e=06>. Consulta: octubre 10, 2011.
- IPRGI. 1989. Descriptors for mango (*Mangifera indica* L.) International Plant Genetic Resources Institute. Rome, Italy.

- IPRGI. 2006. Descriptors for mango (*Mangifera indica* L.) International Plant Genetic Resources Institute. Rome, Italy.
- Ireta, O. A. 1988. Cultivo de mango y aguacate en el Valle de Culiacán. SARH-INIFAP-CIFAP-CAEVAC. Folleto para productores. Núm. 24.
- Iyer, C. P. A. y C. Degani. 1997. Classical Breeding and Genetics. En: R. E. Litz (Ed.). The Mango, Botany, Production and Uses. CAB International. Wallingford. Oxon, UK. pp. 49-68.
- Iyer, C. P. A. y M. R. Dinesh. 1997. Advances in classical breeding and genetics in Mango. *Acta Horticulturae* 455:252-267.
- Jakobsson A. y O. Eriksson. 2000. A comparative study of seed number, seed size, seedling size and recruitment in grassland plants. *Oikos* 88: 494-502.
- Janzen, D. H. 1977. What are dandelions and aphids? *American Naturalists* 111: 586-589.
- Janzen, D. H. 1978. Seedling patterns of tropical trees. En: Tomlinson, P. B. y M. H. Zimmermann (eds.). *Tropical trees as living systems*. Cambridge University Press. Cambridge. pp. 83-128.
- Janzen, D. H. 1982. Removal of seeds from horse dung tropical rodents: influence of hábitat and amount of dung. *Ecology* 63: 1887-1900.
- Jayasankar, S., Litz, R. E., Schnell, R. J. y A. C. Hernández. 1998. Embryogenic mango cultures select for resistance to *Colletotrichum gloeosporioides* culture filtrate show variation in random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 34:112-116.
- Jena, R. C., Samal, K. C., Chand, P. K. y B. K. Das. 2010. Molecular characterization of 12 mango germoplasm using RAPD markers. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 20(1):91-99.
- Jintanawongse, S. y S. Changtragoon. 2000. Identification of cultivars and certification of hybrids in mango (*Mangifera indica* Linn.) by isoenzyme gene markers. *Acta Horticulturae* 509:177-184.
- Johansen, D. A. 1950. *Plant Embryology*. Waltham, USA: Chronica Botan. Comp.
- Johri, B. M. y D. Kak. 1954. The embryology of *Tamarix* Linn. *Phytomorphology* 4(1-2): 230-247.
- Johri, B. M. y B. Tiagi. 1952. Floral morphology and seed formation in *Cuscuta reflexa* Roxb., *Phytomorphology* 2(2-3): 162-180.

- Johri, B. M. y K. B. Ambegaokar. 1984. Embryology: Then and now. Embryology of angiosperms, Johri, B.M., Ed., Berlin: Springer, pp. 1–52.
- Jordano, P. 1993. Pollination biology of *Promus mahaleb* L.: deferred consequences of garder variation for fecundity and seed size. Biological Journal of the Linnean Society 50: 65-84.
- Juliano, J. B. 1934. Origin of embryos in the strawberry mango. Philippine Journal of Science 54:553-563.
- Juliano, J. B. y N. L. Cuevas. 1932. Floral morphology of the mango (*Mnagifera indica* L.) with special reference to the Pico variety from the Philippines. Philippine Agriculturist 21:449-472.
- Juliano, J. B. 1937. Embryos of Carabao mango (*Mangifera indica* L.). Philippine Agriculturist 25: 749-760.
- Jurado, E., Westoby, M. y D. Nelson. 1991. Diaspore weight, dispersal, growth form and perennality of central Australian plants. Journal of Ecology 79: 811-830.
- Kainer, K. A., De Matos Malavasi, M., Duryea, M. L. y E. Rodrigues Da Silva. 1999. Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) seed characteristics, preimbibition and germination. Seed Science and Technology 27:731-745.
- Kalendar, R., Grob, T., Regina, M., Suoniemi, A. y A. Schulman. 1999. IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. Theoretical and Applied Genetics 98: 704-711.
- Karibasappa, G. S. 1995, Morpho-phenological, fruit physico-chemical and isozymes characterization of (*Mangifera indica* L) germplasm, using principal component analysis. *M.Sc. (Agri.)*, Univ. Agri. Sci., Dharwad, Karnataka, India.
- Karihaloo, J. L., Dwivedi, Y. K., Sunil-Archak, y A. B. Gaikwad. 2003. Analysis of genetic diversity of Indian mango cultivars using RAPD markers. Journal of Horticultural Science and Biothecnology 78(3):285-289.
- Karp, A. y J. E. Keith. 1997. DNA marker: a global overview. En: Caetano-Anolles, G. y P. M. Gressloff (eds.). DNA markers, protocols, applications and overviews. University of Tennessee. Wyley-VCII. pp. 1-13.
- Karp, A., Kresovich, S., Bhat, K., Ayad, W. y T. Hodgkin. 1997. Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI). Roma Italia. 47 pág.

- Kashkush, K., Jinggui, F., Tomer, E., Hillel, J. y U. Lavi. 2001. Cultivar identification and genetic map of mango (*Mangifera indica*). *Euphytica* 122:129-136.
- Kearsey M. J. y H. S. Pooni. 1996. *The Genetical Analysis of Quantitative Traits*. Chapman and Hall, London, UK. 381 pág.
- Khan, M. L. Putul-Bhuyan, Umashankar, Todaria-N. P., Bhuyan-P y Shankar-U. 1999. Seed germination and seedling fitness in *Messua ferrea* L. in relation to fruit size and seed number per fruit. *Acta Oecologica* 20(6): 599-606.
- Kidson, R. y M. Westoby. 2000. Seed mass and seedling dimensions in relation to seedling establishment. *Oecologia* 125: 11-17.
- Kimberling, N. D., Ferreira, A. R., Shuster, S. M. y P. Keim. 1996. RAPD marker stimulation of genetic structure among isolated northern leopard frog population in the South-western USA. *Molecular Ecology* 5:522-529.
- Knight, R. J. R. 1980. Origin and world importance of tropical and subtropical fruit crop. En: Nagy S., Shaw, P. E. (eds). *Tropical and Subtropical Fruits*. AVI, Westport, Ct, USA.
- Knight, R. J. y R. J. Schnell. 1993. Mango (*Mangifera indica* L.) Introduction and evaluation in Florida and its impact in the world industry. *Acta Horticulturae* 341:125-135.
- Knight, R. J. y R. J. Schnell. 1994. Plant introduction and the 'Haden' cultivar's significance to the modern mango industry. *Economic Botany* 48(2):139-145.
- Kolesnikov, V. 1971. *The root system of fruit plants*, Moscow, MIR Publishers, p. 269.
- Koltunow, A. M., Bicknell, R. A. y A. M. Chaudhury. 1995. Apomixis: Molecular strategies for the generation of genetically identical sedes without fertilization. *Plant Physiology* 108: 1345-1352.
- Koltunow, A. M., Hidaka, T. y S. P. Robinson. 1996. Polyembryony in citrus. Accumulation of seed storage proteins in sedes and in embryos cultured *in vitro*. *Plant Physiol.* 110:599-609.
- Kostermans, A. J. G. H. y J. M. Bompard. 1993. *The mangoes, their botany, nomenclature, horticulture and utilization*. Academic Press. Londres. 233 pág.
- Kostia, S., Palo, J. y S. Varvio. 1996. DNA sequences of RAPD fragments in artiodactyls. *Genome* 39: 456-458.
- Kumar, N. V. H., Narayanaswamy, P. y Prasad, .D. T. Mukunda, G. K. y S. N. Sondur. 2001. Estimation of genetic diversity of commercial mango (*Mangifera indica* L.) cultivars using RAPD markers. *The Journal of Horticultural Science and Biothecnology* 76: 529-533.

- Kundan, K., Monika, N., Rinchen, D., Boniface, L. y B. Pandey. 2012. Polyembryony and seedling emergence traits in apomictic citrus. *Scientia Horticulturae* 138: 101-107.
- Lafond, G. P. y R. J. Baker. 1986. Effects of genotype and seed size on speed of emergence and seedling vigor in nine springs wheat cultivars. *Crop Science* 26: 341-346.
- Lakshminarayana, S. 1980. Mango. En: Nagy, S. y Shaw, P. E. (eds.). *Tropical and subtropical fruits*. AVI, Westport, CT, Estados Unidos. pp. 184-257.
- Lambers, H. y H. Poorter. 1992. Inherent variation in growth rate between higher plants: A search for physiological causes and ecological consequences. *Advances in Ecological Research* 23: 187-261.
- Lambers, H., Chapin III, S. F. y T. L. Pons. 2008. *Plant Physiological Ecology*. 2a ed. Springer. USA. 604 pág.
- Larkin, P. y W. Scowcroft. 1981. Somaclonal variation –a novel source of variability from cells culture form plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics* 60: 197-214.
- Lavi, U., Kaufman, D., Sharon, D., Adato, A., Tomer, E., Gazit, S. y J. Hillel. 1997. Mango breeding and genetics- Review. *Acta Horticulturae* 455: 268-276.
- Lavi, U., Kashkush, K., Sa'ada, D., Shats, H., Ravid, U. y E. Tomer. 2004. Mango breeding and the potential of modern biology. *Acta Horticulturae* 645: 51-59.
- Lebègue, A. 1948. Embryologie des Crucifères: Polyembryonie chez l'Arabis lyallii S. Wats. *Bulletin de la Société Botanique de France* 95(7-9): 250-252.
- Lebègue, A. 1949. Embryologie des Saxifragacées. Polyembryonie chez le *Bergenia delavayi* Engl. *Bulletin de la Société Botanique de France* 96(1-3): 38-39.
- Ledin, R. B. y G. D. Ruehle. 1954. Mango selection, propagation and cultura. *Annual Report of Florida Agricultural Experimental Station*. University of Florida, Gainesville, Florida. pp. 291-292.
- Leishman, M. R. y M. Westoby. 1993. Hypotheses of seed size: test using the semiarid flora of Western New South Wales, Australia. *The American Naturalist* 143:890-906.
- Leishman, M. R. y M. Westoby. 1994. The role of large seed size in shaded conditions: experimental evidence. *Functional Ecology* 8:205-214.
- Leishman, M. R., Westoby, M. y E. Jurado. 1995. Correlates of seed size variation –a comparison among 5 temperate floras. *Journal of Ecology* 83: 517-529.
- Leishman, M. R., Masters, G. J., Clarke, I. P. y V. K. Brown. 2000. Seed bank dynamics: the rol of the fungal pathogens and climate change. *Functional Ecology* 14: 293-299.



- Leishman, M., Wrigth, I. J. Moles, A. T. y M. Westoby. 2002. The evolutionary ecology of seed size. En: Fenner, M. (ed.). Seed- The ecology of regeneration in plant communities, 2a ed. CAB International, Wallingford, UK, pp. 31-57.
- León, J. 2000. Fundamentos botánicos de los cultivos tropicales. 3ªed. Textos y materiales de enseñanza No. 18. IICA. Lima, Perú.
- Levi, A. y L. J. Rowland. 1997. Identifying blueberry cultivars and evaluating their genetic relationships using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and simple sequence repeat- (SSR-) anchored primers. J. Am. Soc Hort Sci 122(1):74-78.
- Litz, R.E. 1997. The mango: Botany, Production, and Uses. CAB International, Homestead, USA. 587 p.
- Litz, R. E. 1998. Advances and perspectives on world mango research. Foro Internacional de Mango y otras Frutas Tropicales. Mazatlán, Sinaloa. México. 16-17 de febrero de 1998. Banco de México-FIRA.
- Litz, R. E. y M. A. Gómez-Lim. 2005. *Mangifera indica* Mango. En: Litz, R. E. (ed.). Biotechnology of fruit and nuts crops. CABI Publishing, CAB International. Wallingford, UK. pp. 40-61.
- López-Valenzuela, J. A., Martínez, O. y O. Paredes-López, 1997. Geographic differentiation and embryo type identification in *Mangifera indica* L. cultivars using RAPD markers. Horticultural Science 32:1105-1108.
- Loubet, O. R. 2000. Estudio de factibilidad de desarrollo del mango en la Costa Grande de Guerrero. Secretaria de Desarrollo Rural, Gobierno del Estado de Guerrero, Dirección Forestal, Fundación Produce de Guerrero, A.C. 132 pág.
- Luna, E. G., Arévalo, G. M. L. Anaya, R. S. Villegas, M. A. Acosta, R. M y R. G. Leyva. 2006. Calidad de mango 'Ataulfo' sometido a tratamiento hidrotérmico. Revista Fitotecnia Mexicana 29(2):123-128.
- Ma, W. H., Xie, J. H., Wu, H.X.y S. B. Wang. 2006. Evaluating criteria of some fruit quantitative characteristics of mango (*Mangifera indica*) germplasm resources. Journal of Fruit Science.
- Macías-Sánchez, K. L., Zazueta-Novoa, V., Mendoza-Macías, C. L., Rangel-Serrano, Á. y F. Padilla-Vaca. 2008. Epigenética, más allá de la genética. Acta Universitaria 18(1): 50-56.
- Maheshwari Devi H. y T. Pullaiah, 1976. Embryological investigation in the Melampodinae. 1. *Melampodium divaricatum*. Phytomorphology 26 (1): 77-86.

- Maheshwari, P., Devi H. y T. Pullaiah. 1977. Embryological abnormalities in *Carthamus tinctorius* Linn. Acta Botanica Indica 77(5): 8–15.
- Maheshwari, P., Sachar, R. C. y R. N. Chopra. 1955. Embryological studies in mango (*Mangifera indica* L.). Proceedings of the 42nd Indian Scientific Congress, Baroda. pp. 233.
- Majunder, D. A. N., Hassan, L. y M. A. Kabir. 2011. Genetic diversity of mango (*Mangifera indica* L.) detected by RAPD markers. International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology 4(1): 45-51.
- Majunder, P. K. y D. K. Sharma. 1985. Mango. En: T. K. Bose y S. K. Mitra (eds.). Fruits: Tropical and Subtropical. Naya Prokash. Calcuta. pp. 1-62.
- Malo, S. A. y C. W. Campbell. 1982. Studies of mango fruti breakdown in Florida. Proceedings of the Tropical Region of American Society for Horticultural Science 22:1-15.
- Manchekar, M. D. 2008. Clonal variability studies in ‘Alphonso’ mango (*Mangifera indica* L.) by phenotypic characters and molecular markers. Tesis de Maestría en Horticultura. 65 pág.
- Manchekar, M. D., Mokashi, A. N., Hedge, R. V., Venugopal, C. K., y A. S. Byadgi. 2011. Clonal variability studies in alphonso mango (*Mangifera indica* L.) by genetic divergence ( $D^2$ ) analysis. Karnataka Journal of Agricultural Science 24(4): 490-492.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. y J. Sambrook. 1982. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 127 pág.
- Martínez-Ochoa, E. C. 2010. Poliembriónia e identificación de embriones cigóticos y nucleares de mango (*Mangifera indica* L) cvs. Manila y Ataulfo. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados, México. 146 pág.
- Mata, B. I. y V. R. Mosqueda, 1995. Cosecha y poscosecha. En: La producción del mango en México. Editorial Limusa, México. pp. 135-147.
- Mathews, H. y R. E. Litz. 1992. Mango. En: Biotechnology of perennial fruit crops. F. A. Hammerschlog y R. E. Litz (eds.). CAB International UK. pp. 422-448.
- Mathews, H., Litz, R. E., Wilde, D. H., Merkel, S. y H. W. Wetzstein. 1992. Stable integration and expression of  $\beta$ -glucuronidase and NTP II genes in mango somatic embryos. In Vitro Cell Development Biology 28: 172-178.
- Mathews H., Litz, R. E., Wilde, D. H., Merkel, S., y H. W. Wetzstein. 1993. Genetic transformation in mango. Acta Horticulturæ 341: 93-97.
- Medina, J. P. 1977. ‘Rosica’ – a new mango variety selected in Ica, Perú. Fruit Varieties Journal 31: 88-89.

- Medina, C., Paredes, A., Rodríguez, M. E., Moreno, M., Belén-Camacho, D., García, D. y C. Ojeda. 2010. Evaluación de dos métodos de extracción de almidón a partir de cotiledones de mango. *Bioagro* 22(1): 67-74.
- Medina-Filho, H. P., Bordignon, R., Ballve, R. M. L. y J. S. Siqueira. 1993. Genetic proof of the occurrence of mono and dizygotic hybrid twins in citrus rootstocks. *Revista Brasileira de Genética* 16: 703-711.
- Méndez, M. 1997. Sources of variation in seed mass in *Arum italicum*. *International Journal of Plant Science* 158: 298-305.
- Mercadante, A. Z., Rodríguez-Amaya, D. B. y G. Britton. 1997. HPLC and mass spectrometric analysis of carotenoids from mango. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45(1): 120-123.
- Mhameed, S., Sharon, D., Hillel, J., Lahav, E., Kaufman, D. y U. Lavi. 1996. Level of heterozygosity and mode of inheritance of variable number of tandem repeat loci in avocado. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 121(5): 778-782.
- Michaels, H. J., Brenner, B., Hartgerink, A. P., Lee, T. D., Rice, S., Willson, M. F. y R. I. Bertin. 1988. Seed size variation: magnitude, distribution, and ecological correlates. *Evolutionary Ecology* 2: 157-166.
- Milberg, P., Andersson, L., Elverson, C. y S. Regnér. 1996. Germination characteristics of seeds differing in mass. *Seed Science Research* 6: 191-197.
- Mosqueda, V. R., De los Santos D. F., Becerra, L., Cabrera, M. H., Ortega, Z. D. A. y P. A. Lid del Angel. 1996. Manual para cultivar Mango en la Planicie Costera del Golfo de México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Veracruz, Ver., México. 130 pág.
- Mukherjee, S. K. 1949a. The mango and its relatives. *Science and Culture* 15:5-19.
- Mukherjee, S. K. 1949b. D, Sc. Tesis submitida por la Universidad de Culcutta, Culcutta, India.
- Mukherjee, S. K. 1950. Mango: its allopolyploid nature. *Nature* 166:196-197.
- Mukherjee, S. K. 1953a. Origen, distribution and phylogenetics affinities of the species of *Mangifera*. *The Journal of the Linnean Society of London (Botany)* 55: 65-83.
- Mukherjee, S. K. 1953b. The mango, its botany, cultivation, uses and future improvement. *Economic Botany* 7(2): 130-162.

- Mukherjee, S. K., Singh, R. N., Majunder, P. K. y D. K. Sharma. 1968. Present position regarding breeding of mango (*Mangifera indica* L.) in India. *Euphytica* 17: 462-467.
- Mukherjee, S. K., Chakraborty, S., Sadhukhan, S. K. y P. Saha. 1983. Survey of mangoes of West Bengal. *Indian Journal of Agriculturae* 40: 7-13.
- Mukherjee, S. K. 1997. Chapter I. Introduction, Botany and Importance. En: R.E. Litz (Ed.). *The Mango, Botany, Production and Uses*. CAB Internacional. Wallingford. Oxon, UK. pp. 1-20.
- Nageswara, R. M., Soneji, J. R., Chen, C., Young, A. C., Huang, S., y F. G. Gmitter. 2005. Identification of zygotic and nucellar seedlings from Citrus rootstock candidates using RAPD. *International Symposium on Biotechnology of Temperate Fruit Crops and Tropical Species*. Octubre de 2005. Abstract pp. 130.
- Naik, K. C. 1941. Studies on the propagation of the mango. *Mangifera indica* L. *Indian Journal of Agriculture Science* 11: 736-768.
- Naik, K. C. 1948. Improvement of the mango (*Mangifera indica* L.) by selection and hybridization. *Induan Journal of Agricultural Science* 18: 35-41.
- Naik, K. C. 1949. *South Indian fruits and their culture*. P. Varadachary and Company, Madras, India.
- Naumova, T. N. 1992. *Apomixis in angiosperms. Nucellar and integumentary embryony*, London: Boca Raton Ann. Arbor.
- Naumova T. N. y M. T. M. Villemse. 1983. Ultrastructural aspects of nucellar polyembryony in *Sarsosossa humilis* (Vuxaseae). Divisions of Initial cell and nucellar proembryos, *Bot. Zh.* 68(9): 1184–1195.
- Nei, M. y W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76: 5269–5273.
- Ooi, L. e I. C. Wood. 2007. Chromatin crosstalk in development and disease: lessons from rest. *Review* 8: 544-554.
- Olano, T. C., Schenell, R. J., Quintanilla, W. E. y R. J. Campbell. 2005. Pedigree analysis of Florida mango cultivars. *Proceedings Florida State Horticultural Society* 118:192-197.
- Oppenheimer, C. 1956. Study tour report on subtropical fruit growing and research in India and Ceylon. *Special Bulletin N° 3 State of Israel Ministry of Agriculture*. Agricultural Research Station. Rehovot. Octubre, 1956.

- Ornelas-Paz, J. J., Yahia, E. M. y A. A. Gardea-Bejar. 2007. Identification and quantification of xanthophyll esters, carotenes, and tocopherols in the fruit of seven mexican mango cultivars by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-time-of-flight mass spectrometry [LC-(APCl<sup>+</sup>)-MS]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(16): 6628-6635.
- Ornelas-Paz, J. J., Yahia, E. M. y A. A. Gardea. 2008. Changes in the external and internal color during posharvest ripening of 'Manila' and 'Ataulfo' mango fruit and relationship with carotenoid content determined by liquid chromatography-SPCl<sup>+</sup>-time-of-flight mass spectrometry. *Postharvest Biology and Technology* 50(2-3): 145-152.
- Osawa, I. 1912. Cytological and experimental studies in Citrus. *Journal of the College of Agricultural, Imperial University of Tokyo* 4:83-116.
- Osunkoya O. O., Ash, J. E., Hopkins, M. S. y A. W. Graham. 1994. Influence of seed size and seedling ecological attributes on shade-tolerance of rain-forest tree species in northern Queensland. *Journal of Ecology* 82: 149- 163.
- Pandey, S. N., Dubey, A.K., Charanjeet, K., Singh, O. P. y N. M. Singh. 2006. Identification of superior clones and elite seedlings of mango from Uttar Pradesh. *Indian Journal of Horticulturae* 63(1): 15-17.
- Pandit, S. S., Mitra, S. Giri, A. P., Pujari, K.H., Patil, B. P. Jambhale, N. D. y V. S., Gupta. 2007. Genetic diversity analysis of mango cultivars using inter simple sequence repeat markers. *Current Science* 93(8):1135-1141.
- Paniagua, G. R. y M. N. Martín de Serrano. 2003. Síntesis y degradación de macromoléculas – Ribosoma- En: *Biología Celular*. España. MacGraw-Hill Interamericana. pp. 107-119.
- Parisot, E. 1988. Etude de croissance rythmique chez de jeunes manguiers (*Mangifera indica* L) Première partie. Description germination et conservation de graines polyembryonnées de manguiers. *Fruits* 43(2):97-105.
- Pascua, G. S., Espino, R. R. C., Namuco; L. D., Sangalang, J. B. y T. J. Rimando. 1996. Diversity in mango accesions base on isozyme analysis and some morphological characters. *Phillipine Journal of Crop Science* 21(1):10.
- Paul, W. R. C. y S. C. Guneratnam. 1938. Mango stocks. *Tropical Agriculturist* 90: 34-35.
- Paull, R. E. y O. Duarte. 2011. *Tropical Fruits*. Capítulo 10: Mango. 2<sup>a</sup> ed. CAB International Vol. 1. 400 págs.

- Paz, H. y M. Martínez-Ramos. 2003. Seed mass and seedling performance withing eight species of *Psychotria* (Rubiaceae). *Ecology* 84: 439-450.
- Pérez, P. E., Quintero, C., Sandoval, S. y Z. Vilorio. 1998. Germinación y características morfológicas de plántulas de mango (*Mangifera indica* L.) c.v. Pico de Loro, tolerante a salinidad. *Revista de la Facultad de Agronomía LUZ* 15: 526-533.
- Picca, A., Helguera, M., Salomón, N. y A. Carrera. 2004. Marcadores moleculares. En: Echenique, V. Rubinstein, C., Mroginski, L. (eds.). *Biología y mejoramiento vegetal*. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biología. Argentina. Ediciones INTA. pp. 61-68.
- Pimienta-Barrios, E., Zañudo-Hernández, J., Nobel, P. S. y J. García-Galindo 2005. Respuesta fisiológica a factores ambientales del agave azul (*Agave tequilana* Weber). *Revista Científica Scientia CUCBA* 7(2):85-98.
- Ponce de León, G. L. 2003. Chapter 11. Crop Management and Postharvest Handling of Horticultural Products. En: D. Ramdane, R. Niskanen, y S. M. Jain (Eds.). Volume II: Fruits and Vegetables. Development, Physiology and Postharvest Technology of Mango. Science Publishers, Inc. Enfield, USA. pp. 291-328.
- Poorter, H. y E. Granier. 1996. Planta growth analysis: an evaluation of experimental desing and computational methods. *Journal of Experimental Botany* 47: 1343-1351.
- Poorter, H. y O. Nagel. 2000. The role of biomass allocation in the growth response of plants to different levels of light, CO<sub>2</sub>, nutrients and water: a quantitative review. *Australian Journal of Plant Physiology* 27: 595-607.
- Pope, W. T. 1929. Mango culture in Hawaii. Hawaii Agricultural Experiment Station. Bulletin. pp. 58.
- Popenoe, W. 1920. Manual of tropical and subtropical. Hafner Press. Nueva York (Facsímil de la edición de 1920): 474 pág.
- Pouteau, S., Huttner, E., Grandbastien, M. A. y M. Caboche. 1991. Specific expression of the tobacco Tnt1 retrotransposon in protoplasts. *The EMBO Journal* 10(7): 1911-1918.
- Prieto, M. J. J., Covarrubias, A. J. E., Romero, C. A. y V. J. Figueroa. 2006. Paquete tecnológico del cultivo de mango en Colima. Cesavecol, INIFAP, FCBy A, SAGARPA. México, 56 pág.

- Quang, H. L., Melayah, D., Bonnivard, E., Petit, M. y M. A. Grandbastien. 2007. Distribution dynamics of the Tnt1 retrotransposon in tobacco. *Molecular Genetics and Genomics* 278: 639-651.
- Quero-Carrillo, A. R., Enríquez-Quiroz, J. F., Morales-Nieto, C. R. y L. Miranda-Jiménez. 2010. Apomixis y su importancia en la selección y mejoramiento de gramíneas forrajeras tropicales. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 1(1):25-42.
- Rahman, M. L., Rabbani, M. G., Siddique, M. N. A., Rahman, M. A., Garvey, E. J. y E. H. M. S. Rahaman. 2007. Molecular characterization of 28 mango germplasm using RAPD. *Plant Tissue Cult. & Biotech.* 17(1): 71-77.
- Rajwana, I. A., Tabbasam, N., Malik, A. U., Malik, S. A., Rahman, M. e Y. Zafar. 2008. Assessment of genetic diversity among mango (*Mangifera indica* L.) genotypes using RAPD markers. *Scientia Horticulturae* 117:297-301.
- Rajwana, I. A., Khan, I. A. Malik, A. U., Saleem, B. A., Khan, A. S., Ziaf, K., Anwar, R. y M. Amin. 2011. Morphological and biochemical markers for varietal characterization and quality assessment of potential indigenous mango (*Mangifera indica*) germplasm. *International Journal of Agriculture & Biology* 13(2): 151-158.
- Ram, S. 1997. Cap. 11. Propagation. En: R.E. Litz (Ed.). *The Mango, Botany, Production and Uses*. CAB International. Wallingford. Oxon, UK. pp. 363-400.
- Ramessur, A.D. and V.M. Ranghoo-Sanmukhiya, 2011. RAPD Marker-assisted identification of genetic diversity among mango (*Mangifera indica*) varieties in Mauritius. *International Journal of Agriculture and Biology* 13: 167–173.
- Ravishankar, K. V., An, L. y M. R. Dinesh. 2000. Assessment of genetic among mango cultivars of India using RAPD markers. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 75:198-201.
- Ravishankar, K. V., Chandrashekara, P., Sreedhara, S. A., Denish, M. R., Lalitha Anand y G. V. S. Saiprasad. 2004. Diverse genetic bases of Indian polyembryonic and monoembryonic mango (*Mangifera indica* L.) cultivars. *Current Science* 87(7): 870-871.
- Ravishankar, K. V., Hanumantha-Reddy, M. B., Anand, L. y M. R., Dinesh. 2011. Development of new microsatellite markers from mango (*Mangifera indica*) and cross-species amplification. *American Journal of Botany* 98(4): 96-99.

- Reddy, Y. T. N., Kohli, R. R., Singh, G. y B. S. Bhargava. 1989. Effects of rootstock on growth, yield and leaf nutrient composition of mango (*Mangifera indica* L.). *Fruits* 44:409-413.
- Reddy, B. M. C. 1998. Propagation techniques for tropical fruits. En: Arora, R. K. y V. R. Rao. (eds.). *Tropical Fruits in Asia, Diversity, Maintenance and Use*. IPGRI – South Asia, New Delhi, India. pp. 103-112.
- Richards, A. J. 1986. *Plant Breeding System*. George Allen & Unwin. London.
- Richards, A. J. 2003. Apomixis in flowering plants: an overview. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 358(1434): 1085-1093.
- Ribeiro, V. G., Pascual, M., Darlan, J. R., Bearzoti, E. y S. N. D'Angelo. 1999. Estádios de desenvolvimento embrionário e localização do embrião zigótico em sementes de citros. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 34: 1327-1333.
- Robinson, J. y S. A. Harris. 2000. A plastid DNA phylogeny of the genus *Acacia* Miller (Acaciae, Leguminosae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 132: 195-222.
- Rocha, A., Chamhum Salomão, L. C., Fernandes Salomo, T. M., Cruz, C. D. y D. Lopes de Siqueira. 2011. Genetic diversity of 'Uba' mango tree using ISSR markers. *Molecular Biotechnology* 50(2):108-113.
- Rocha-Cordeiro, M. C., Queiróz-Pinto, A. C., Vargas-Ramos, V. H., Gelape-Faleiro, F. y L. M. Santos Fraga. 2006. Identificação da origem genética de plântulas em sementes poliembriônicas de mangueira (*Mangifera indica* L.) cv. Rosinha por meio de marcadores RAPD. *Revista Brasileira de Fruticultura* 28:454-457.
- Rodenhiser, D. y M. Mann. 2006. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *Canadian Medical Association Journal* 174(3): 341-348.
- Rodríguez-Plegazuelo, C. R., Drán-Zuazo, V. H., Muriel-Fernández, J. L. y D. Franco-Tarifa. 2012. Physico-chemical quality parameters of mango (*mangifera indica* L.) fruits grown in a mediterranean subtropical climate (SE Spain). *Journal of Agricultural Science and Technology* 14: 365-374.
- Rogers, W. S. y G. A. Booth. 1959. The roots of fruit trees. *Scientia Horticulturae* 14: 27-34.
- Rogler, G. 1954. Seed size and seedling vigor in crested wheatgrass. *Agronomy Journal* 46:216-220.



- Rojas, M. R. y M. E. Zavaleta. 2004. Curso teórico – práctico: “Diagnóstico molecular y manejo de enfermedades causadas por virus y fitoplasmas. Práctica No. 3. Extracción de ácidos nucleicos. Colegio de Posgraduados.
- Rosseto, C. J., Ribeiro, I. J. A., Gallo, P. B., Soares, N. B., Sabino, J. C., Martins, A. L. M., Bortoletto, N. y E. M. Paulo. 1997. Mango breeding for resistance to diseases and pests. *Acta Horticulturae* 455:299-304.
- Roy, S. K. 1953. Embryology of *Eugenia jambos* L. *Current Science* 8: 249-250.
- Roy, S. K. y R. Sahai. 1962. The Embryo Sac and Embryo of *Syzygium caryophyllifolium* D.C. *Journal of the Indian Botanical Society* 41(1): 45–51.
- Ruehle, D. y R. Ledin. 1955. Mango growing in Florida. Gainesville. University of Florida. Bulletin 574. 90 pág.
- Sachar, R. C. 1955. The Embryology of *Argemone mexicana* L.—a reinvestigation, *Phytomorphology* 5(2–3): 200–218.
- Sachar, R. C. y R. N. Chopra. 1957. A study of the eEndosperm and embryo in *Mangifera* L. *Indian Journal of Agricultural Science* 27(2): 219–228.
- SAGARPA. 2005. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Disponible en: <[www.sagarpa.org.mx](http://www.sagarpa.org.mx)>. Consulta: marzo 28, 2006.
- Sakai, S. y A. Sakai. 1996. Why is there variation in mean seed size among plants within single populations? Test of the fertilization efficiency hypothesis. *American Journal of Botany* 83: 1454-1457.
- Samal, K. C., Jena, R. C., Swain, S. S., Das, B. K y P. K. Chand. 2012. Evaluation of genetic diversity among comercial cultivars, hybrids and local mango (*Mangifera indica* L.) genotypes of India using cumulative RAPD and ISSR markers. *Euphytica* 185(2): 195-213.
- Samant, D., Singh, A. K., Srivastav, M. y N. K. Singh. 2010. Assessment of genetic diversity in mango using inter-simple sequence repeat markers. *Indian Journal Horticultural* 67:1:8.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez, D., Avitia, J. J. E., Castillo, A. M., Villegas, M. y T. T. Corona. 2006. Estudio anatómico de la poliembrionía en tres portainjertos de cítricos. *Revista Chapingo. Serie Horticultura* 12:145-152.

- Sánchez, M. S., Becerril-R., A. E., Tijerina, C. L. y R. J. A. Santizo. 2001. Crecimiento y desarrollo de vainilla en tres sistemas de producción en Papantla, Veracruz'. Revista Fitotecnia Mexicana 24(1): 49-56.
- Sánchez, Q. E. 2003. Cap. 13. El ribosoma: Estructura y función. En: Gaona, F. L (ed.). Biología Celular y Molecular. México. Pearson Educación de México, S. A. de C. V. pp. 395-409.
- Sánchez-Chiang, N. y V. M. Jiménez. 2009. Técnicas moleculares para la detección de variantes somaclonales. Agronomía Mesoamericana 20(1): 135-151.
- Sánchez-Teyer, L. F., Moreno-Slazar, S., Esqueda, M., Barraza, A. y M. L. Robert. 2009. Genetic variability of wild *Agave angustifolia* population base on AFLP: A basic study for conservation. Journal of Arid Enviroments 73:611.616.
- Sánchez-Teyer, L. F., Quiroz-Figueroa, F., Loyola-Vargas, V. y D. Infante. 2003. Culture-induced variation in plants of *Coffea arabica* cv. Caturra rojo, regenerated by direct and indirect somatic embryogenesis. Molecular Biotechnology 23: 07-115.
- Sankar, J., Rosaiah, G., Ravi-Kumar, K. y P. Rajasekhar. 2011. Molecular identification of mango, *Mangifera indica* L. var. Totupura. Bioinformation 5(10): 405-409.
- SanMiguel, P., Gaut, B. S., Tikhonov, A., Nakajima, Y. y J. L. Benetzen. 1998. The paleontology of intergene retrotransposons of maize. Nature genetics 20: 43-45.
- SanMiguel, P., Tikhonov, A., Jin, Y. K., Motchoulskaia, N., Zakharov, D., Melake-Berhan, A., Springer, P. S., Edwards, K. J., Lee, M., Avramova, Z. y J. L. Benetzen. 1996. Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. Science 274: 765-768.
- Scarano, M. T., Tusa, N., Abbate, L., Lucretti, S., Nardi, L. y S. Ferrante. 2003. Flow cytometry, SSR and modified AFLP markers for the identification of zygotic plantles in backcrosses between 'Femminelo' lemon cybrids (2n and 4n) and a diploid clone of 'Femminello' lemon 8*Citrus limon* L. Burm. F.) tolerant to *mal secco* disease. Plant Science 164: 1009-1017.
- Schaal, B. A. 1980. Reproductive capacity and seed size in *Lupinus texensis*. American Journal of Botany 67: 703-709.
- Schnell R. J. y R. J. Knight Jr. 1991. Are polyembryonic mangos dependable sources of nucellar seedlings for rootstocks? Proceedings of the Florida State Horticultural Society 104: 44-47.

- Schnell R. J. y R. J. Knight Jr. 1992. Frequency of zygotic seedlings from five polyembryonic mango rootstocks. *Horticultural Science* 27: 174-176.
- Schnell R. J. y R. J. Knight Jr. 1993. Genetic relationships among *Mangifera* spp. based on RAPD markers. *Acta Horticulturae* 341: 86-92.
- Schnell R. J., Knight, R. J. y D. M. Harkins. 1994. Eliminating zygotic seedlings in 'Tupertine' mango rootstock population by visual rouging. *HortScience* 29(4):319-320.
- Schnell, R. J., Ronning, C. M. y R. J. Knight, Jr. 1995. Identification of cultivars and validation of genetic relationships in *Mangifera indica* L. using RAPD markers. *Theoretical Applied Genetic* 90: 269-274.
- Schnell, R. J., Olano, C. T., Quintanilla, W. E. y A. W. Meerow. 2005. Isolation and characterization of 15 microsatellite loci from mango (*Mangifera indica* L.) and cross-species amplification in closely related taxa. *Molecular Ecology Notes* 5: 626-627.
- Scholötterer, C. 2001. Cap. 14. Ribosomal DNA probes and primers. En: Karp, A., Isaac, P. G., y D. S. Ingram (eds.). *Molecular Tools for Screening Biodiversity: Plants and Animals*. Eapaña. MacGraw-Hill Interamericana. pp. 265-276.
- Sen, P. y P. Mallik. 1940. Embryo of the Indian mangoes (*Mangifera indica* L.). *The Indian Journal of Agricultural Science* 10(5): 750-760.
- Sergent, E. 1999. El cultivo del mango (*Mangifera indica* L.): Botánica, manejo y comercialización. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, Colección Monografías, 72. 308 pág.
- Shant, P. S. y B. I. Saproo. 1974. Effects of various stages of fruit maturity and different levels of pulp extraction on the germination of mango stones. *Bangladesh Horticulture* 2: 49-50.
- Sharma, D. K. y P. K. Majunder. 1988. Induction of variability in mango through physical and chemical mutagens. *Acta Horticulturae* 231:112-116.
- Sharma, B. G., Albert, S. y H. K. Dhaduk. 2012. Petiolar anatomy as an aid to the identification of *Mnagifera indica* L. varieties. *Notulae Scientia Biologicae* 4(1): 44-47.
- Shattuck, C. H. 1905. A morphological study of *Ulmus Americana*. *Botanical Gazette*. 40: 209-223.
- Shipley, B. y H. Peters. 1990. The allometry of seed weight and seedling relative growth rate. *Functional Ecology* 4: 523-529.
- SIAP - Servicio de Información y estadística Agroalimentaria y Pesquera. Anuario estadístico de la producción agrícola de los Estados Unidos Mexicanos. México: Secretaría de

Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, 2011. Disponible en: <<http://www.siap.gob.mx>>. Consulta: septiembre 6, 2012.

- Siddiqui, S. H. 1985. Induced somatic mutation in mango, *Mangifera indica* L. cv. Langra. Pakistan Journal of Botany 17: 75-79.
- Siddiqui, S. H., Mujeeb, K. A. y S. M. Vasti. 1966. Evolution of new varieties of mango (*Mangifera indica* L.) through induced somatic mutation by ionizing radiations. Proceedings of 1° Agricultural Symposium. Atomic Energy Commission, Dacca. pp. 34-37.
- Silvertown, J. W. Seed size, life span, and germination date as coadapted features of plant life history. The American Naturalist 118: 860-864.
- Simao, S. 1960. Seeds of green mangoes for rootstock production. Review Agriculture Piracicaba 35: 183-188.
- Simpson, J. 1997. Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP's). Boletín de la Sociedad Botánica de México 60: 119-122.
- Sinnadurai, S. 1975. The effect of decortications of seeds on germination and the number of nucellar seedlings of some mango cultivars in Ghana. Acta Horticulturae 49: 95-97.
- Sindhe, A. N. R., Swamy, B. G. L. y D. A. Govindappa. 1980. Synergid Embryo in *Penisetum squamulatum*. Current Science 49: 914-915.
- Singh, H. y K. L. Chadka. 1981. Improvement of Dashehari by clonal selection. National Symposium of Tropical and Subtropical Fruit Crops. Horticultural Society of India Bangalore. pp. 5.
- Singh, L. 1960. The mango. London. Leonard\_Hill. 438 pág.
- Singh, R. N., Gorakh, S., Rao, O. P., y J. S. Mishra. 1985. Improvement of Banarsi Langra through clonal selection. Progressive Horticulture 17: 273-277.
- Singh, R. N., Majumder, P. K y D. K. Sharma. 1966. Sex-expression in mango (*Mangifera indica* L.) with reference to prevailing temperature. Proceedings of the American Society for Horticultural Science 89: 228-229.
- Singh, S. y K. V., Bhat. 2009. Molecular characterization and analysis of geographical differentiation of Indian mango (*Mangifera indica* L.) germplasm. Acta Horticulturae 839: 599-606.
- Singh, S., Gaikwad, A. B. y J. L., Karihaloo. 2009. Morphological and molecular analysis of intracultivar variation in Indian mango (*Mangifera indica* L.) Cultivars. Acta Horticulturae 829: 205-212.

- Singh, U. R. y A. P. Singh. 1976. Rootstock studies in mango (*Mangifera indica* L.). Progressive Horticulture 8: 13-19.
- Smirnov, A. G. y L. Sh. Grakhantseva. 1982. Some features of embryology of *Fritillaria meleagroides* (Liliaceae). Bot. Zh. 67(4): 491–499.
- Smith, M. W., Hoult, M. D., Bright, J. D., McAlister, S. y G. Foord. 1997. Rootstock research: opportunities for the Australian mango industry. Acta Horticulturae 455: 383-390.
- Solntseva, M.P. 1973. Types of embryo sac development and morphology of the embryo of *Rudbeckia laciniata* L., Embriologiya pokrytosemennykh rastenii (Embryology of Angiospermous Plants), Kovarskii, A.I. et al., Eds., Chisinau: Shtiintsa. pp. 47–57.
- Solntseva, M. P. 1999. Problemy apogameti. Bot. Zh. 84(8): 1–23.
- Soltis, D. E y P. S. Soltis. 1999. 1. Choosing an Approach and a Appropriate Gene for Phylogenetic Analysis. En: Molecular Systematics of Plants II: DNA sequencing. USA. Klumer Academic Publishers. 574 pág.
- Sorensen, F. C. y R. K. Campbell. 2000. Seed weight-seedling size correlation in coastal Douglas-fir: genetic and environmental components. En: K. Olsen (Ed.). Guide to Handling of Tropical and Subtropical Forest Seed, Danida Forest Seed. Centre. Denmark. pp. 307-328.
- Soto, E., Avilán, L., E. Unai, Rodríguez, M y J. Ruíz. 2004. Comportamiento y características de algunos cultivares promisorios de mango. Agronomía Tropical 54(2): 179-201.
- Srivastava, A. P., Chandra, R. y S. A. Ranade. 2004. Applicability of peR based molecular markers for parentage analysis of mango (*Mangifera indica* L.) hybrids. The Indian Journal of Genetics and Plant Breeding 64(4): 275-280.
- Srivastava, N., Bajpai, A., Chandra, R., Rajan, S., Muthukumar, M. y M. K. Srivastava. 2012. Comparison of PCR based marker systems for genetic analysis in different cultivars of mango. Journal of Environmental Biology 33: 159-166.
- Stanton, M. L. 1984. Development and genetic sources of seed weight variation in *Raphanus raphanistrum* L. (Brassicaceae). American Journal of Botany 71: 1090-1098.
- Steinbach, S. H., Benech-Arnold, R. L., Kristof, G., Sánchez, R. A. y S. Marcucci-Poltri. 1995. Physiological basis of pre-harvest sprouting resistance in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. ABA levels and sensitivity in developing embryos of sprouting -resistant and- susceptible varieties. Journal of Experimental Botany 46: 701-709.
- Stöckling, J. y P. Favre. 1994. Effects of plant size and morphological constraints on variation in reproductive components in two related species of *Epilobium*. Journal Ecology 82: 735-746.

- Stouthamer, R. 2007. Herramientas para el control biológico clásico. Herramientas moleculares. En: Van Driesche, R. G., Hoddle, M. S. y T. D. Center. Control de plagas y malezas por enemigos naturales. USA. USDA. The Forest Health Technology Enterprise Team (FHTET). pp. 255-276.
- Striem, M. J., Ben-Hayyim, G. y P. Spiegel-Roy. 1996. Identifying molecular genetic markers associated with seedlessness in grape. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 121: 758-763.
- Strurrock, T. T. 1967. Nucellar embryos of the mango. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 80 :350-354.
- Sturio, J. A. 1990. Influencia da procedencia e do tamanho de sementes de *Mimosa scabrella* Benth. Na sobrevivencia e crescimento de mudas no viveiro e após o plantío. *Floresta* 20(1/2): 25-26.
- Susko, D. J. y L. Lovett-Doust. 2000. Patterns of seed mass variation and their effects on seedling trait in *Alliaria petiolata* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* 87: 56-66.
- Swamy, B.G.L., 1946. The Embryology of *Zeuxine sulcata* Lindl, *New Phytologist* 45(1): 132–136.
- Swamy, B.G.L., 1948. Agamospermy in *Spiranthes cernua*. *Lloydia* 11(3): 149–162.
- Swamy, G. S., Rao, E. V. R. y D. S. Raju. 1972. Polyembryonic rootstocks for mango. *Acta Horticultrae* 24: 110-113.
- Taylor, F. J. 1970. Some aspects of the development of mango (*Mangifera indica* L.) leaves. I. Leaf area, dry weight and water content. *New Phytologist* 69(2): 377-394.
- Teatota, S. S., Batí, D. R. y K. P. S. Phogat. 1970. Use of tree vigor as criteria for yield in mango variety Dashehari. *Progressive Horticulture* 2: 5-12.
- Temme, D. H. 1986. Seed size variability: a consequence of variable genetic quality among offspring? *Evolution* 40 :414-417.
- Tenhku Ab. Malik, T. M. 1996. Screening for mango rootstock with high calcium uptake. *Proceedings of the International Conference on Tropical Fruits*. Kuala Lumpur, Malasia. 23-26 de Julio de 1996. Vol. III:189-196.
- Teo, L. L., Kiew, R., Set, O., Lee, K., y Y. Y. Gan. 2002. Hybrid status of kuwini, *Mangifera odorata* Griff. (Anacardiaceae) verified by amplified fragment length polymorphism. *Molecular Ecology* 11: 1465-1469.

- Tholen, D, Voeselek, A. C. y H. Poorter. 2004. Ethylene insensibility does not increase leaf area of relative growth rate in Arabidopsis, *Nicotiana tabacum*, and *Petunia x hybrida*. *Plant Physiology* 134: 1803-1812.
- Thompson, J. N. 1984. Variation among individual seed masses in *Lomatium gravi* (Umbelliferae) under controlled conditions: magnitude and partitioning of the variance. *Ecology* 65: 626-631.
- Thongplave, B., Silayoi, B., Vangnai, V., y T. Tulyathorn. 1983. Studies on the ontogeny of polyembryony in mango (*Mangifera indica* L.) cv. Okrong Thong. En: Proceedings of the 22<sup>nd</sup> National Conference, Kessart Univ., Bangkok, Thailand. Disponible en: <<http://kucon.lib.ku.ac.th/Fulltext/KC2201069.pdf>> Consulta: mayo 15, 2011.
- Tomar, E., Gajera, H. P., Viadiya, R. R., Patel, S. V. y B. A. Golakiya. 2011. Phylogenetic relationship among mango (*Mangifera indica* L.) landraces of Saurashtra based on DNA fingerprinting. *Journal of Horticulture and Forestry* 3(13): 379-385.
- Tomer, E. Gazit, S., Lavi, U., Shoker, S., Ripa, M., Zipori, I., y D. Sáada. 1997. Mango breeding in Israel – Principles and difficulties. *Acta Horticulturae* 455: 245-251.
- Torres de los Santos, R. Salvador-Figueroa, M. y L. Adriano-Anaya. 2005. Variabilidad genética entre árboles padre de *Mangifera indica* Linn var. ‘Ataulfo’. En: Memoria del XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. 18-23 de septiembre. Merida, Yucatán, México.
- Townsend, C. E. 1972. Influence of seed size and depth of planting on seedling emergence of two Milkvetch species. *Agronomy Journal* 64: 627-630.
- Trocme, S. y R. Gras. 1966. Suelo y fertilización en fruticultura. Trad. I. De la Vega, Madrid. Mundi-Prensa. pp. 364.
- Truscott, M. Human, C. y G. J. Visser. 1993. Frecuency of zygotic seedlings from polyembryonic mango rootstocks. *Journal of the South African Society for Horticultural Science* 2: 106-107.
- USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 25. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. 2012. Nutrient Data Laboratory Home Page. Disponible en: <<http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>>. Consulta: octubre 15, 2012.
- Valadez, M. C. y G. Kahl. 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas (Teoría y protocolos de laboratorio). Mundi Prensa, S. A., Universidad Autónoma de Chapingo. México. 147 pág.

- Vasanthaiah, H. K. N., Ravishankar y G. K. Mukunda. 2007. Capítulo 16: Mango. En: Kole, C. (ed.). Genome mapping and Molecular breeding in Plants. Volumen 4. Fruits and nuts. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. pp. 303-323.
- Vaughton, G. y M. Ramsey. 1997. Seed mass variation in the shrub *Banksia spinulosa* (Proteaceae): resource constraints and pollen source effects. *International Journal of Plant Sciences* 158: 424-431.
- Vaughton, G. y M. Ramsey. 1998. Sources and consequences of seed mass variation in *Banksia marginata* (Proteaceae). *Journal of Ecology* 86: 563-573.
- Vershinin, A. V. y T. H. N. Ellis. 1999. Heterogeneity of the internal structure of PDR1, a family of *Ty1/copia*-like retrotransposons in pea. *Molecular and General Genetics* 262: 703–713.
- Villar, R., Ruiz-Robledo, J., Quero, J. L., Poorter, H., Valladares, F. y T. Marañón. 2004. Capítulo 7. Tasas de crecimiento en especies leñosas: aspectos funcionales e implicaciones ecológicas. En: Valladares, F. (ed.). *Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante*. Ministerio de Medio Ambiente, Madrid. pp. 191-227.
- Villegas, M. A. y M. R. Andrade. 2008. poliembrionía, ventajas y oportunidades para la propagación vegetativa. En: J. G. Cruz y P. A. Torres (eds.). *Enfoques Tecnológicos en la Fruticultura*. Universidad Autónoma de Chapingo. México. Pp. 149-167.
- Villegas, M. A. y A. A. Mora. 2011. Avances de la fruticultura en México. *Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal - SP, Volumen Especial*, E: 179-186.
- Viruel, M. A., Escribano, P., Barbieri, M. Ferri, M. y J. J. Hormaza. 2005. Fingerprinting, embryo type and geographic differentiation in mango (*Mangifera indica* L., Anacardiaceae) with microsatellites. *Molecular Breeding* 15:383-393.
- Vos, P. Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van De Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., y M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Research* 23: 4407-4414.
- Wahdan, M. T., Abdelsalam, A. Z., El-Naggar, A. A. y M. A. Hussein. 2011. Preliminary horticultural studies to describe and identify of two egyptian mango strains using DNA fingerprint. *Journal of American Science* 7(2): 641-650.
- Wainwright, H. y M. B. Burbage. 1989. Physiological disorders in mango (*Mangifera indica* L.) fruit. *Journal of Horticultural Science* 64: 125-135.



- Wakana, A. y S. Eumoto. 1987. Adventice embryogenesis in *Citrus* I. The occurrence of adventives embryos without pollination or fertilization. *American Journal of Botany* 74: 517-530.
- Wallace, D. M. 1987. General methods for isolation and characterizing nuclei acids. En: Berger, S. L. y A. R. Kimmel (eds). *Guide to Molecular cloning techniques*. Academic Press. pp. 33-48.
- Waller, D. M. 1982. Factors influencing seed weight in *Impatiens capensis* (Balsaminaceae). *American Journal of Botany* 69: 1470-1475.
- Wang, J. B., Wang, L. X. Du, Z. J. Lei, X. T, Cne, Y. Y. y B. Y., Xu. 2007. Analysis on the genetic relationship of some mango (*Mangifera indica* L.) germoplasms by ISSR markers. *Acta Horticulturae Sinica*: 1.
- Waugt, R., Mclean, K., Flavell, A. J., Pearce, S. R., Kumar, A. y B. B. T. Thomas. 1997. Genetic distribution of Bare-1-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplication polymorphism (S-SAP). *Mol. Gen. Genet.*253: 687-694. doi:10.1007/s004380050372. PMID:9079879.
- Welsh, J. y M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18: 7213-7218.
- Wen X., Ye X., Li Y. Q., Chen Z. y Xu S. 1998. Embryological Studies on Apomixis in *Pennisetum squamulatum*. *Journal of Integrative Plant Biology* 40(7): 598-604.
- Westoby, M., Jurado, E. y M. Leishman. 1992. Comparative evolutionary ecology of seed size. *Trends in Ecology and Evolution* 7: 368-372.
- Westoby, M., Leishman, M. y J. Lord. 1996. Comparative ecology of seed size and dispersal. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 351: 1309-1318.
- Wetzal, C. T. 1985. Some effects of seeds size on performance of soybeans (*Glycine max* L. Memll.). En: *Fisiologia da semente*. Brasilia D. F. 2a ed. pp. 157-247.
- Whiley, A. W., Mayers, P. E., Saranah, J. y J. P. Bartley. 1993. Breeding mangoes for Australian conditions. *Acta Horticulturae* 341: 136-145.
- Wilcox, D. R. 1984. The effect of seed size and maternal source on individual size in population of *Ludwigia leptocarpa* (Onagraceae). *American Journal of Botany* 71: 1302-1307.
- Wilfinger, W. W., Mackey, K y P. Chomczynsky. 1997. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric. *Assessment of Nucleic Acid Purity: BioTechniques* 22: 474-481.

- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R. Livak, K.J., Rafalski, J. A. y S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.
- Willson, M. F. 1983. *Plant Reproductive Ecology*. Wiley, New York.
- Wolfe, L. M. 1995. The genetics and ecology of seed size variation in a biennial plant, *Hydrophyllum appendiculatum* (Hydrophyllaceae). *Oecologia* 101: 343-352.
- Xie, J. H., Liu, C. M, Ma, W. H. y X. T., Lei. 2005. Analysis of genetic relationship among mango germoplasm by RAPD markers. *Journal of Fruit Science*: 6.
- Xie, J. H., Ma, W. H. y C.M., Liu. 2007. Analysis of genetic relationships among mango germplasm using ISSR marker. *Acta Horticulturae* 763: 185-190.
- Yahia, E. M., Ornelas-Paz. J. J. y A. Gardea. 2006. Extraction, separation and partial identification of ‘Ataulfo’ mango fruit carotenoids. *Acta Horticulturae* 712: 333-338.
- Yakovlev, M. S. 1967. Polyembryony in higher plants and principles of its classification. *Phytomorphology* 17(1-4): 278–282.
- Yakovlev, M. S. y M. P. Solntseva. 1965. Some problems of flower morphology and embryology of Feather-Grasses. *Morfologiya tsvetka i reproductivnyi protsess u pokrytosemennykh rastenii (Flower Morphology and Reproductive Process in Angiospermous Plants)*, Leningrad: Nauka. pp. 61–73.
- Yamanaka, N. Hasran, M. Xu, D. H., Tsunematsu, H., Idris, S., y T. Ban. 2003. Genetic relationship and diversity of four *Mangifera* species revealed by AFLP analysis. *JIRCAS Research Highlights* pp. 14-15.
- Yamanaka, N., Hasran, M. Xu, D. H., Tsunematsu, H., Idris, S., y T. Ban. 2005. Genetic relationship and diversity between and within *Mangifera* species revealed by AFLP analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53(5):949-954. Springer: DOI 10.1007/10722-004-6695-7.
- Yonemori, K., Honsho, C., Kanzaki, S., Eiadthong, W. y A. Sugiura. 2002. Phylogenetic relationships of *Magifera* species revealed by ITS sequences of nuclear ribosomal DNA and a possibility of their hybrid origin. *Plant Systematics and Evolution* 231: 59-75.
- Young, T. W. 1957. “Soft nose”, a physiological disorder in mango fruits. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 70: 280-283.
- Young, T. W. y R. B. Ledin. 1954. Mango breeding. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 67: 241-244.

- Yu, X, M. y C. X. Ai. 2007. Genetic diversity of wild *Mangifera indica* populations detected by ISSR. *Journal of Fruit Science* 3.
- Yuan, W. 2009. Construction of AFLP molecular marking system in *Mangifera indica* L. *Agricultural Science and Technology* 10(5): 72-75.
- Yu-Chung, C., Chi-Mou, T., Yu-Kuang, H. C., Sheue-Ru, L., Chih-Hsiung, C., Yu-Shium, L. y T. Chi-Chu. 2012. Development and characterization of 20 new polymorphic microsatellite markers from *Mangifera indica* (Anacardiaceae). *American Journal of Botany* 99(3): 117-119.

## **10. ANEXOS**

### 10.1 ANEXO A. Técnica histológica

La técnica histológica para el procesamiento de tejidos de mango (y en general vegetales) comprende nueve pasos principales: 1) Obtención del tejido; 2) fijación; 3) deshidratación; 4) infiltración; 5) inclusión; 6) corte; 7) desparafinación y aclaramiento; 8) tinción de contraste; 9) montaje.

1. Los fragmentos de tejido de aproximadamente 1 cm, se obtuvieron a partir de semillas maduras de mango de las tres variedades.
2. La fijación se realizó durante tres a cuatro semanas con FAA (Formaldehído - ácido acético – alcohol etílico) (Cuadro 34).

Cuadro 34. Preparación de 100 mL de FAA

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
<b>Formaldehído al 40%</b>	7 mL
<b>Acido acético</b>	3 g
<b>Alcohol etílico al 70%</b>	90 mL

3. El proceso de deshidratación se llevó a cabo colocando los tejidos en ocho cambios de mezclas de alcohol etílico, alcohol terbutílico y agua destilada a diferentes concentraciones (Cuadro 35). Los cambios se realizaron en intervalos de entre cinco y ocho horas.
4. La infiltración se realizó colocando las muestras de tejido en parafina histológica (Merck) fundida en una estufa a 60 °C, con dos cambios de 24 h cada uno.
5. Durante el proceso de inclusión, se colocó el tejido, orientándolo, en moldes de aluminio y/o papel bond. Los bloques se polimerizaron durante al menos tres horas a temperatura ambiente y se desmoldaron tallando pirámides en la superficie del bloque próxima al tejido con la finalidad de disminuir el área de corte.
6. En un micrótopo rotatorio (American Optical), se obtuvieron cortes de 10 a 12  $\mu\text{m}$  de espesor. Las tiras de cortes se extendieron en un baño de flotación con agua destilada y agar bacteriológico a 50-55 °C y se montaron en portaobjetos limpios. Los portaobjetos se etiquetaron con un lápiz de punta metálica.
7. Los cortes se desparafinaron con xileno absoluto y alcohol etílico en diferentes concentraciones, con cambios de cinco minutos cada uno (Cuadro 36).
8. Se realizó una tinción de contraste para vegetales: safranina-verde rápido (verde fijo), simultáneamente los cortes se deshidrataron con alcohol etílico en concentraciones crecientes (Cuadro 37). Los colorantes safranina “O” y verde rápido y la solución de aceite de clavo se prepararon como se muestra en los cuadros 38 y 39.

Cuadro 35. Tren de deshidratación de tejidos

<b>Mezcla</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Concentración</b>
<b>1</b>	agua alcohol etílico alcohol terbutílico	50% 40% 10%
<b>2</b>	agua alcohol etílico alcohol terbutílico	30% 50% 20%
<b>3</b>	agua alcohol etílico alcohol terbutílico	15% 50% 35%
<b>4</b>	agua alcohol etílico alcohol terbutílico	5% 40% 55%
<b>5</b>	alcohol etílico alcohol terbutílico	25% 75%
<b>6</b>	alcohol terbutílico	100%
<b>7</b>	alcohol terbutílico	100%
<b>8</b>	alcohol terbutílico	100%

Cuadro 36. Tren de desparafinación de tejidos vegetales.

<b>Cambio</b>	<b>Reactivo</b>
<b>1</b>	Xileno al 100%
<b>2</b>	Xileno al 100%
<b>3</b>	Xileno al 100%
<b>4</b>	Alcohol absoluto
<b>5</b>	Alcohol absoluto
<b>6</b>	Alcohol absoluto
<b>7</b>	Alcohol al 90%
<b>8</b>	Alcohol al 70%
<b>9</b>	3 enjuagues con agua destilada

Cuadro 37. Tinción de cortes finos de tejidos vegetales.

<b>Reactivo</b>	<b>Tiempo</b>
<b>Safranina “O”</b>	12 a 24 h
<b>Lavado con agua corriente</b>	15 a 20 min
<b>Alcohol al 50%</b>	3 min
<b>Alcohol al 60%</b>	3 min
<b>Alcohol al 70%</b>	3 min
<b>Alcohol al 80%</b>	3 min
<b>Verde rápido</b>	1 a 3 seg
<b>Alcohol absoluto</b>	3 min
<b>Alcohol absoluto</b>	3 min
<b>Alcohol absoluto</b>	3 min
<b>Solución especial de aceite de clavo</b>	10 min
<b>Xileno al 100%</b>	10 min
<b>Xileno al 100%</b>	10 min

Cuadro 38. Preparación de safranina “O”:

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
<b>Methyl Cellosolve</b>	50 mL
<b>Alcohol al 95%</b>	25 mL
<b>Agua</b>	25 mL
<b>Acetato de sodio</b>	1 g
<b>Formaldehído al 40%</b>	2 mL
<b>Safranina</b>	0.1 g

**Preparación Verde rápido** (se prepara con tres meses de anticipación, ya que debe madurar): en 100 mL de alcohol al 90%, agregar 0.1% de solución verde rápido.

Cuadro 39. Solución de aceite de clavo

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad (mL)</b>
<b>Aceite de clavo</b>	30
<b>Xileno</b>	30
<b>Alcohol absoluto</b>	30

## 10.2. ANEXO B. Marcadores moleculares en el estudio del mango

Cuadro 40. Trabajos de investigación con marcadores genéticos: morfoanatómicos y físico-químicos, bioquímicos y moleculares en mango.

Marcador	Título de la investigación	Temática	Referencia
Morfo-anatómicos	Diversidad morfológica del fruto en germoplasma nativo de mango <i>Mangifera indica</i> L. (Anacardiaceae) nativo de Chiapas, México.	Estudio de la diversidad de 28 características morfológicas del fruto y la semilla de 36 variedades de mango nativos de Chiapas, México. Se observó amplia diversidad en las características del fruto, particularmente en color, peso del fruto y grosor del mesocarpio. Este trabajo puede aportar información importante para la conservación de mango.	Gálvez-López <i>et al.</i> , 2007b.
	Petiole anatomy as an aid to the identification of <i>Mangifera indica</i> L. varieties.	Evaluación de la anatomía del peciolo de ocho variedades de mango de Gujarat, India. Los caracteres analizados (forma y área del peciolo, arco vascular, venación, número y diámetro de vasos y canales resiníferos, grosor de cutícula, tamaño de células epidérmicas y capas de células hipodérmicas) resultaron útiles para diferenciar las variedades.	Sharma <i>et al.</i> , 2012.
Físico-químicos	Identification of superior clones and elite seedlings of mango from Uttar Pradesh.	Identificación de cinco clones de variedades de mango de Uttar Pradesh, India, mediante la evaluación de parámetros físico-químicos (tamaño de fruto, grosor de cáscara, contenido de pulpa y de jugo, contenido de vitamina C, aromas y acidez). Se encontraron diferencias entre los clones.	Pandey <i>et al.</i> , 2006.
	Evaluating criteria of some fruit quantitative characteristics of mango ( <i>Mangifera indica</i> ) germplasm resources.	Evaluación de cinco caracteres cuantitativos del fruto y la semilla (peso del fruto y de la semilla, contenido de sólidos solubles, acidez titulable y vitamina C) en 57 variedades de mango de la Colección de SSCRI en Zhanjiang, China. Los resultados pueden establecer bases para la estandarización de los descriptores de mango.	Ma <i>et al.</i> , 2006.
	Clonal variability studies in Alphonso mango ( <i>Mangifera indica</i> L.) by genetic divergence ( $D^2$ ) analysis.	Determinación de la divergencia genética de nueve clones de mango variedad 'Alphonso' de la India, utilizando el análisis estadístico de distancias de Mahalanobis ( $D^2$ ) sobre parámetros físico-químicos en frutos (longitud y peso del fruto y de la semilla, porcentaje y peso de pulpa y vida de anaquel; sólidos solubles totales, ácido ascórbico y	Manchekar <i>et al.</i> , 2011.



	azúcares totales). Los clones se agruparon en dos grupos, sin encontrar relación entre el origen geográfico y la diversidad genética.	
Morphological and biochemical markers for varietal characterization and quality assessment of potential indigenous mango ( <i>Mangifera indica</i> ) germplasm.	Identificar, caracterizar y recomendar nuevas variedades de mango en Pakistán a través del análisis de características bioquímicas del árbol, hojas, inflorescencias, frutos: hueso y pulpa. De los 17 genotipos estudiados, sólo cinco muestran caracteres con potencial comercial.	Rajwana <i>et al.</i> , 2011.
Comparison of efficiency of distance measurement methodologies in mango ( <i>Mangifera indica</i> ) progenies based on physicochemical descriptors.	Observación de seis descriptores físicoquímicos en frutos de 25 genotipos de mango (peso, diámetro ecuatorial y longitudinal del fruto, sólidos solubles totales en °Brix, acidez titulable y pH). Las comparaciones se realizaron mediante análisis multivariado (distancia, proyección y agrupamiento). Los resultados son contundentes para demostrar diferencias entre genotipos.	Alves <i>et al.</i> , 2012
Physico-chemical quality parameters of mango ( <i>mangifera indica</i> L.) fruits grown in a mediterranean subtropical climate (SE Spain).	Estudio de parámetros físicoquímicos de 25 variedades de ocho regiones de Florida y una de Australia que crecen en clima subtropical mediterráneo de España para encontrar variedades de alta calidad de frutos recomendables por su rendimiento y productividad sustentable en ese tipo de ambiente. Las variedades 'Osteen' y 'Tommy Artkins' resultaron las de mejor calidad.	Rodríguez-Plegazuelo <i>et al.</i> , 2012.

### Moleculares

#### Bioquímicos Isoenzimas

Genetic variation in the grafted vegetatively propagated mango ( <i>Mangifera indica</i> ).	Relaciones genéticas entre variedades de mango.	Gan <i>et al.</i> , 1981.
Asexual embryogenesis in the mango.	Detección de plantas cigóticas entre poblaciones de plántulas de variedades poliembriónicas de mango utilizando un sistema enzimático.	Gazit y Knight, 1989.
Enzyme polymorphism in mango.	Caracterización de 41 variedades de mango derivadas de autopolinización y polinización abierta.	Degani <i>et al.</i> , 1990.
PGI isoenzyme diversity and its genetic control in mango.	Demostración de dos zonas separadas de actividad de PGI (fosfoglucoisomerasa): PGI-1 y PGI-2; se sugiere que PGI-2 es controlada por cuatro alelos.	Degani <i>et al.</i> , 1992.
Frecuency and characterization of zygotic seedlings from polyembryonic mango cultivars, determined using isoenzymes as	Análisis de plántulas poliembriónicas de mango para determinar el porcentaje de embriones cigóticos mediante cuatro sistemas isoenzimáticos.	Degani <i>et al.</i> , 1993.

genetic markers.		
Frequency of zygotic seedlings from five polyembryonic mango rootstocks.	Diferenciación entre plántulas cigóticas y nucelares en poblaciones poliembriónicas de mango derivadas de polinización abierta utilizando cinco sistemas isoenzimáticos.	Schnell y Knight, 1991.
Are polyembryonic mangos dependable sources of nucellar seedlings for rootstocks?	Detección de plántulas cigóticas en cinco variedades poliembriónicas de mango mediante la utilización de cinco sistemas isoenzimáticos.	Schnell y Knight, 1992.
Frequency of zygotic seedlings from polyembryonic mango rootstocks.	Identificación de plántulas de origen cigótico en cinco variedades de mango mediante cinco sistemas isoenzimáticos.	Truscott <i>et al.</i> , 1993.
Eliminating zygotic seedlings in 'Tupertine' mango rootstock population by visual rouging.	Identificación de plántulas cigóticas a través de cinco sistemas isoenzimáticos y otros métodos para la eliminación de las plántulas cigóticas.	Schnell <i>et al.</i> , 1994.
Morpho-phenological, fruit physico-chemical and isozymes characterization of mango ( <i>Mangifera indica</i> L) germplasm, using principal component analysis.	Utilización de tres sistemas enzimáticos para la identificación de plántulas cigóticas en 67 variedades poliembriónicas de mango.	Karibasappa 1995.
Diversity in mango accessions based on isozyme analysis and some morphological characters.	Determinación de la variabilidad genética de poblaciones de mango 'Carabao' y otras doce variedades de Filipinas	Pascua <i>et al.</i> , 1996.
Segregation distortion and linkage of mango isozyme <i>loci</i> .	Estudio de la progenie de cuatro variedades de mango utilizando cinco sistemas enzimáticos.	Aron <i>et al.</i> , 1997.
Isozyme polymorphism of mango cultivars in Thailand.	Análisis de 58 variedades poliembriónicas de mango de Tailandia mediante tres sistemas enzimáticos.	Eiadthong <i>et al.</i> , 1998.
Effect of pollenizer distance and selective fruitlet abscission on outcrossing rate yield in 'Tommy Atkins' mango.	Determinación de tasas de entrecruzamiento y producción de frutos de la variedad 'Tommy Atkins' para evaluar incompatibilidad postcigótica.	Dag <i>et al.</i> , 1998.
Identification of cultivars and certification of hybrids in mango ( <i>Mangifera indica</i> Linn.) by isoenzyme gene markers.	Identificación de híbridos de cuatro variedades de mango y progenies de 20 cruces controlados utilizando 11 sistemas enzimáticos.	Jintanawongse y Changtragoon, 2000.
Genetic characterization of mango ( <i>Mangifera indica</i> L.) cultivars	Caracterización genética de 34 variedades de mango a través de nueve sistemas isoenzimáticos.	Coroza, 2004.

	through isozyme analysis.		
	Diversidad isoenzimática de mangos criollos de Chiapas, México.	Diversidad de mangos criollos de 16 colectas y cinco variedades comerciales cultivadas en la región del Soconusco, con base en siete sistemas isoenzimáticos.	Gálvez-López <i>et al.</i> , 2007a.
	Gene flow in mango orchards and its impact on yield.	Análisis isoenzimático para determinar el origen del polen en huertas comerciales de mango de la India.	Dag <i>et al.</i> , 2009.
	Genetic characterization of mango ( <i>Mangifera indica</i> L.) cultivars through isozyme analysis.	Caracterización genética de 34 variedades de mango de Filipinas con nueve sistemas enzimáticos. Los dos sistemas más útiles para la identificación de las variedades fueron PGI y PGM.	Coroza-Almontero y Espino, 2010.
<b>RFLP (Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción)</b>	Analysis of phylogenetic relationships in <i>Mangifera</i> by restriction site analysis of an amplified region of cpDNA.	Confirmación de relaciones filogenéticas y distribución geográfica de 13 especies de <i>Mangifera</i> colectadas en Tailandia.	Eiadthong <i>et al.</i> , 1999a.
	Development and application of various DNA marker types for characterization of genetic diversity within commercial mango varieties in Cuba.	Estudio de 30 variedades comerciales de mango de Cuba mediante marcadores de ADN para evaluar las secuencias polimórficas mediante RFLP.	Capote <i>et al.</i> , 2003.
<b>Marcadores de ADN RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar)</b>	Genetic relationships among <i>Mangifera</i> spp. based on RAPD markers.	Determinación de relaciones filogenéticas de mango. Los RAPDs generaron grupos que no habían sido agregados en la clasificación taxonómica de mango.	Schnell y Knigh Jr., 1993.
	Identification of cultivars and validation of genetic relationships in <i>Mangifera indica</i> L. using RAPD markers.	Identificación de 25 variedades de mango y validación de sus relaciones genéticas.	Schnell <i>et al.</i> , 1995.
	Genetic diversity of Kesington mango in Australia	Evaluación de la diversidad genética de mango variedad 'Kesington'. Existe poca variación genética dentro de esta variedad.	Bally <i>et al.</i> , 1996.
	Geographic differentiation and embryo type identification in <i>Mangifera indica</i> L. cultivars using RAPD markers.	Análisis de 50 variedades de mango de México, Filipinas y Florida. La variedad 'Manila' de México es idéntica a la 'Carabao' de Filipinas.	López-Valenzuela <i>et al.</i> , 1997.
	Embryogenic mango cultures select for resistance to <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> culture filtrate show variation in	Descripción del uso de marcadores moleculares RAPDs para detectar la variación de cultivos embriogénicos de mango después de la selección con cultivos de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .	Jayasankar <i>et al.</i> , 1998.

random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers.		
Assessment of genetic variation in Philippine mangoes using RAPD markers.	Evaluación genética de la variedad de mango 'Carabao' de Filipinas.	Halos y Ferron, 1998.
RAPD analysis of mango cultivars.	Análisis de las diferencias genóticas de las variedades de mango 'Hongmang y 'Kuixiangmang' y la selección 'Hongpingmang'.	Deng-Jiu-Sheng <i>et al.</i> , 1999.
Assessment of genetic among mango cultivars of India using RAPD markers.	Estudio de las relaciones genéticas de variedades de mango de la India producidos a escala comercial. Las variedades de una región geográfica particular están estrechamente relacionadas.	Ravishankar <i>et al.</i> , 2000.
Estimation of genetic diversity of commercial mango ( <i>Mangifera indica</i> L.) cultivars using RAPD markers	Estimación de relaciones genéticas entre algunas variedades de mango comerciales poli y monoembriónicos. Existe un alto grado de variación entre las variedades con respecto a la variedad 'Mulgoa'	Kumar <i>et al.</i> , 2001.
Molecular characterization of Philippine 'Carabao' mango using RAPD and AFLP markers.	Evaluación de la diversidad genética de frutos de mango 'Carabao' de Filipinas provenientes de varias localidades utilizando 32 marcadores RAPDs y 31 AFLPs. La técnica de AFLPs es más discriminante que los RAPDs.	Hautea <i>et al.</i> , 2001.
Analysis of genetic diversity of Indian mango cultivars using RAPD markers	Análisis de la diversidad genética en 29 variedades de mango hindús. Las variedades de las regiones Norte y Este de la India se agrupan y se encuentran separados de las variedades del Sur y el Oeste.	Karihaloo <i>et al.</i> , 2003.
Diverse genetic bases of Indian polyembryonic and monoembryonic mango ( <i>Mangifera indica</i> L.) cultivars.	Detección de las bases genéticas de variedades de mangos mono y poliembriónicos. Aunque los tipos de embrionía son intercruzables, los grupos de tipo poliembriónico indican que existe una base de diversidad genética que los separa de los de tipo monoembriónico.	Ravishankar <i>et al.</i> , 2004.
Genetic variability in mango genotypes detected by RAPD markers.	Agrupamiento de variedades con base en sus similitudes y divergencias.	De Souza y Lima, 2004.
Variabilidad genética entre árboles padre de <i>Mangifera indica</i> L. var. 'Ataulfo'.	Determinación de la variación molecular entre árboles padre de mango 'Ataulfo'. Existe una variación genética mínima entre los individuos estudiados.	Torres de los Santos <i>et al.</i> , 2005.
Analysis of genetic relationship among mango germoplasm by RAPD markers.	Análisis de 38 variedades de mango y una especie silvestre ( <i>M. perssiciformis</i> ). Las 38 variedades se dividieron en tres grupos de acuerdo al tipo de embrión y color de	Xie <i>et al.</i> , 2005.

	la cáscara.	
Identificação da origem genética de plântulas em sementes poliembrionicas de mangueira ( <i>Mangifera indica</i> L.) cv. Rosinha por meio de marcadores RAPD.	Identificación del origen genético de semillas poliembrionicas de la variedad 'Rosinha'. Las plântulas presentan alta similitud con respecto a la planta madre.	Rocha-Cordeiro <i>et al.</i> , 2006.
Molecular characterization of 28 mango germplasm using RAPD.	Análisis de la variación genética de 28 variedades de mango. 'Mallika' y 'Amrapali' son genéticamente muy similares mientras que 'Sukul' y 'Meghnath' son las dos variedades menos similares.	Rahman <i>et al.</i> , 2007.
Genetic diversity and discrimination of mango accessions using RAPD and ISSR markers.	Diversidad genética de 46 variedades de mango utilizando marcadores RAPDs e ISSR. El árbol UPGMA a partir de RAPDs ordeno las variedades en tres grupos, uno contenía a la mayoría de las variedades del Norte de la India, otro a las del Este y el tercero comprendía variedades de ambas regiones. ISSR no permitió ordenar las variedades de acuerdo a la región geográfica.	Bajpai <i>et al.</i> , 2008.
Application of DNA fingerprinting technology to estimate genetic divergence among mango cultivars-genotypes.	Relaciones genéticas de 15 genotipos de mango de Pakistán.	Ahmad <i>et al.</i> , 2008.
Clonal variability studies in 'Alphonso' mango ( <i>Mangifera indica</i> L.) by phenotypic characters and molecular markers.	Variabilidad genética y morfológica en árboles de mango variedad 'Alphonso' originados a partir de un mismo clon. La variabilidad se debe a la acumulación de mutaciones.	Manchekar, 2008.
Assessment of genetic diversity among mango ( <i>Mangifera indica</i> L.) genotypes using RAPD markers.	Diversidad genética de 25 genotipos de mango. Los genotipos se organizaron en tres grupos de acuerdo a la región de origen.	Rajwana <i>et al.</i> , 2008.
Analysis of diversity among of six populations of Colombian mango ( <i>Mangifera indica</i> L. cvar. Hilacha using RAPDs marker.	Diversidad genética entre seis poblaciones de mango de la variedad Hilacha en Colombia.	Díaz-Matallana <i>et al.</i> , 2009.
Poliembrionía e identificación de embriones cigóticos y nucleares de mango ( <i>Mangifera indica</i> L)	Identificación con marcadores moleculares RAPD del origen cigótico o nuclear de embriones de semillas poliembrionicas de mango de los cultivares 'Manila' y 'Ataulfo' obtenidos	Martínez-Ochoa, 2010.

cvs. Manila y Ataulfo	mediante cultivo <i>in vitro</i> . Se logro identificar el origen cigótico o nucelar y uno a tres embriones cigóticos en algunas semillas.	
Diversity of Indonesian mango ( <i>Mangifera indica</i> ) cultivars based on morphological and RAPD markers.	Estimación de la diversidad morfológica y genética de 208 variedades nativas de Indonesia. Los datos morfológicos y moleculares no organizan de la misma manera a las variedades de mango estudiados.	Fitmawati <i>et al.</i> , 2010.
Molecular characterization of 12 mango germoplasm using RAPD markers.	Variabilidad genética de 12 germoplasmas de mango de la India.	Jena <i>et al.</i> , 2010.
Molecular characterization of <i>Mangifera indica</i> by using RAPD marker.	Caracterización molecular de dos germoplasmas de mango originados a partir de entrecruzamientos en la India. La variabilidad genética entre las dos variedades es muy baja.	Bhargava y Khorwal, 2011.
RAPD Marker-assisted identification of genetic diversity among mango ( <i>Mangifera indica</i> ) varieties in Mauritius.	Identificación de la diversidad genética en 12 variedades de mango cultivadas en la República de Mauricio (Mauritius). Se formaron dos grupos principales que consistieron en la mezcla de variedades introducidas y nativas, sin que se observara una clara distinción entre ellas.	Ramessur y Ranghoo-Sanmukhiya, 2011.
Comparison of RAPD and ISSR markers for genetic diversity analysis among different endangered <i>Mangifera indica</i> genotypes of Indian Gir forest region.	Estudio de la variabilidad y relaciones genéticas de 20 genotipos de mango: 15 amenazadas y 5 variedades cultivadas mediante marcadores moleculares RAPD e ISSR. Los marcadores RAPD fueron más eficientes para la detección de polimorfismos. Los patrones de agrupamiento con ambas técnicas no resultaron similares.	Gajera <i>et al.</i> , 2011.
Genetic diversity of mango ( <i>Mangifera indica</i> L.) detected by RAPD markers.	Evaluación de la diversidad genética y relaciones de 60 variedades de mango de Bangladesh mediante marcadores RAPD. Los resultados pueden ser útiles para conservar el germoplasma y maximizar la utilidad de los recursos genéticos.	Majunder <i>et al.</i> , 2011.
Evaluation of genetic diversity among commercial cultivars, hybrids and local mango ( <i>Mangifera indica</i> L.) genotypes of India using cumulative RAPD and ISSR markers.	Estudios de diversidad genética de 65 genotipos de mango de la India por medio de RAPD y SRR. Ambos métodos muestran un alto grado de similitud en los genotipos, con base en su origen parental.	Samal <i>et al.</i> , 2012.
Comparison of PCR based marker systems for genetic analysis in different cultivars of	Determinación de la variabilidad genética de mango con el objetivo de establecer el origen y la evolución de variedades de mango del Este y Norte de la India con	Srivastava <i>et al.</i> , 2012

	mango.	fines de conservación. Utilizaron tres marcadores basados en PCR: RAPD, ISSR y DAMD.	
<b>SSR (Secuencias simples repetidas) o Microsatélites o VNTR (Secuencias adyacentes que se repiten en número variable o Minisatélites)</b>	Application of DNA fingerprints for identification and genetic analyses of mango ( <i>Mangifera indica</i> ) genotypes.	Análisis de los patrones de huellas genéticas de ADN de 25 variedades de mango y 14 portainjertos de mango a partir de minisatélites VNTR.	Adato <i>et al.</i> , 1995.
	Identification of mango cultivars of Thailand and evaluation of their genetic variation using the amplified fragments by simple sequence repeat-(SSR) anchored primers.	Identificación y validación de la variabilidad genética entre variedades de mango de Tailandia. No pudieron separar las variedades de acuerdo a sus tipos embriogénicos.	Eiadthong <i>et al.</i> , 1999b.
	Fingerprinting, embryo type and geographic differentiation in mango ( <i>Mangifera indica</i> L., Anacardiaceae) whit microsatellites.	Reporte de la secuencia y parámetros de variabilidad en 16 pares de iniciadores de dos librerías genómicas y evaluación del polimorfismo en una colección de 28 variedades de mango de diferente origen, monoembriónico y poliembriónico.	Viruel <i>et al.</i> , 2005.
	Development of microsatellite markers for mango ( <i>Mangifera indica</i> L.).	Evaluación de la diversidad de 15 variedades de mango y dos variedades de especies relacionadas.	Duval <i>et al.</i> , 2005.
	Isolation and characterization of new microsatellite markers in mango ( <i>Mangifera indica</i> L.).	Análisis de 36 variedades de Tailandia. Los resultados agruparon las variedades en dos genotipos, de acuerdo a sus similitudes.	Honsho <i>et al.</i> , 2005.
	Pedigree analysis of Florida mango cultivars.	Análisis de 63 variedades de Florida, India, Asia y otras regiones. Los genotipos de Florida están más estrechamente relacionados con los de la India que con los de Asia	Olano <i>et al.</i> , 2005.
	Isolation and characterization of 15 microsatellite loci from mango ( <i>Mangifera indica</i> L.) and cross-species amplification in closely related taxa.	Desarrollo y caracterización de 15 loci microsatélites aislados de <i>Mangifera indica</i> . Los marcadores permitieron evaluar 59 variedades de Florida y cuatro de especies relacionadas de la colección de germoplasma de mango de la USDA. Estos loci pueden utilizarse en la investigación de la variabilidad genética de mango y especies relacionadas.	Schnell <i>et al.</i> , 2005.
	Genetic diversity of Caribbean mangoes ( <i>Mangifera indica</i> L.) using microsatellite markers.	Análisis de 307 variedades de mango provenientes de la India, Asia, Florida, Africa y el Caribe. Se encontró una alta variabilidad en algunas variedades.	Duval, 2006.
	Molecular characterization and	Análisis de 241 variedades de mango de 15 regiones de la India. Existe un	Singh y Bhat, 2009.

	analysis of geographical differentiation of Indian mango ( <i>Mangifera indica</i> L.) germplasm.	substancial flujo de genes entre las variedades de las diferentes regiones, debido probablemente a la introgresión de genes por entrecruzamiento y selección.	
	Myanmar mango landraces reveal genetic uniqueness over common cultivars from Florida, India, and Southeast Asia.	Comparación de la estructura genética de variedades de mango de Myanmar con otros de Florida, la India y Asia. Las variedades de Myanmar se distinguieron de los de las otras regiones.	Hirano <i>et al.</i> , 2010.
	Preliminary horticultural studies to describe and identify two Egyptian mango strains using DNA fingerprint.	Estudio de la variabilidad morfológica y genética de dos variedades de mango de Egipto, 'Hania' y 'Aml'.	Wahdan <i>et al.</i> , 2011.
	Outcrossing rate between 'Haden' and 'Tommy Atkins' mangoes estimated using microsatellite and AFLP markers.	Estimación de la tasa de entrecruzamientos entre las variedades de mango 'Haden' 'Tommy Atkins' utilizando microsatélites y AFLP. Tres de los microsatélites encontrados pueden ser utilizados para elucidar el origen de las plántulas de las dos variedades.	Fernandes-Santos y Lima-Neto, 2011.
	Development of new microsatellite markers from mango ( <i>Mangifera indica</i> ) and cross-species amplification.	Evaluación genética de 30 variedades de mango y cinco especies relacionadas mediante el desarrollo de 36 microsatélites SSR. Los cebadores SSR resultaron exitosos.	Ravishankar <i>et al.</i> , 2011.
	Development and characterization of 20 new polymorphic microsatellite markers from <i>Mangifera indica</i> (Anacardiaceae).	Evaluación de la diversidad genética e identificación de 22 variedades comerciales de mango del Este de Asia mediante 20 microsatélites, los cuales pueden ser utilizados en futuros estudios para la identificación de variedades de mango.	Yu-Chung <i>et al.</i> , 2012.
	Molecular analysis for genetic distinctiveness and relationships of indigenous landraces with popular cultivars of mango ( <i>Mangifera indica</i> L.) in Andhra Pradesh, India.	Identificación de nuevas variedades de mango de alta calidad, a través de la caracterización morfo-fisiológica y molecular (marcadores SSR) de 20 variedades indígenas. Se reconocieron seis variedades genéticamente diferentes y con características hortícolas superiores.	Begum <i>et al.</i> , 2012.
	Allelic database and accession divergence of a Brazilian mango collection based on microsatellite markers.	Evaluación genética con 12 marcadores microsatélites de una colección de 103 variedades de mango de Brasil y extranjeros para desarrollar una base de datos para la protección de las variedades y programas de mejoramiento. Los 12 marcadores necesitan ser validados para la identificación de variedades de mango.	Dos Santos-Ribeiro <i>et al.</i> , 2012.
<b>ISSR (Inter secuencias simples repetidas)</b>	Development of DNA markers (ISSRs) in mango.	Estudio del polimorfismo de variedades de mango de Australia para validar parentescos, estimar la variabilidad	González <i>et al.</i> , 2002.



	genética dentro de las poblaciones y caracterizar portainjertos.	
Applicability of PCR based molecular markers for parentage analysis of mango ( <i>Mangifera indica</i> L.) hybrids.	Análisis de parentesco de variedades de mangos híbridos comerciales por medio de cuatro tipos de marcadores moleculares: ISSR, SPAR, RAPD y DAMD.	Srivastava <i>et al.</i> , 2004.
Genetic analysis of 23 mango cultivar collection in Guangxi province revealed by ISSR.	Estudio de 23 variedades de mango de Guangxi, y otros 15 de EUA, Burma, Tailandia, Filipinas, Pakistán y Sir Lanka, además de dos especies relacionadas: <i>M. himalis</i> y <i>M. persiciformis</i> . Se encontró amplia variabilidad genética en las diferentes regiones, mientras que las variedades de Guangxi están estrechamente relacionadas.	He <i>et al.</i> , 2005.
Identification of closely related mango cultivars by ISSR.	Examen de siete líneas de mango 'Carabao'. Se encontró una amplia diversidad genética entre las siete líneas.	He <i>et al.</i> , 2007a.
Assessment of the genetic relationship and diversity of mango and its relatives by cpISSR marker.	Análisis de la diversidad y relaciones genéticas de 36 variedades de mango de la Academia de Ciencias Agrícolas de Guangxi, China, mediante ISSR en cloroplasto. Todas las variedades fueron identificadas y mostraron amplia diversidad genética.	He <i>et al.</i> , 2007b.
Genetic diversity analysis of mango cultivars using inter simple sequence repeat markers.	Diversidad genética de 70 variedades de mango de las regiones Norte y Sur de la India y otras regiones fuera de la India. Las variedades de otras regiones de la India fueron genéticamente distintos a los de la India y no se encontraron diferencias entre las dos regiones dentro de la India.	Pandit <i>et al.</i> , 2007.
Analysis on the genetic relationship of some mango ( <i>Mangifera indica</i> L.) germplasms by ISSR markers.	Estudio de las relaciones genéticas de 38 variedades de mango, formándose cinco grupos.	Wang <i>et al.</i> , 2007.
Analysis of genetic relationships among mango germplasm using ISSR marker.	Análisis de 32 variedades de mango de China, EUA, India, Australia, Indonesia, Tailandia y Filipinas. Las variedades se agruparon en cinco clases, de acuerdo al origen geográfico, tipo de embrión y color de la piel.	Xie <i>et al.</i> , 2007.
Genetic diversity of wild <i>Mangifera indica</i> populations detected by ISSR.	Estudio de la diversidad genética de 265 individuos de 12 poblaciones mediante marcadores ISSR. Algunas poblaciones se agrupan de forma combinada y otras como grupos separados.	Yu y Ai, 2007.
Analysis on the genetic relationship of Gui Re mango ( <i>Mangifera indica</i> L.) cultivars or	Análisis de las relaciones genéticas de 16 variedades de mango. Las variedades se organizaron en tres grupos distintos.	Huang <i>et al.</i> , 2008.

	lines.		
	Morphological and molecular analysis of intracultivar variation in Indian mango ( <i>Mangifera indica</i> L.) cultivars.	Estudio morfológico y de la diversidad genética de cinco variedades comerciales de mango de la India ('Banganapalli', 'Dashehri', 'Langra', 'Amrapali' y 'Malika').	Singh <i>et al.</i> , 2009.
	Assessments of genetic diversity in mango using inter-simple sequence repeat markers.	Investigación acerca de la diversidad genética de 63 genotipos de mango de las regiones Norte, Este y Oeste de la India, así como de Brasil y Florida. Se organizaron 55 de las 63 variedades de mango en seis grupos, que se corresponden con el origen geográfico y el tipo de embrión (mono o poliembriónico).	Samant <i>et al.</i> , 2010.
	Genetic diversity of 'Uba' mango tree using ISSR markers.	Estudio de la diversidad genética de árboles de mango de la variedad 'Uba' de diferentes regiones de la zona de Mata de Minas Gerais, Brasil.	Rocha <i>et al.</i> , 2011.
	Phylogenetic relationship among mango ( <i>Mangifera indica</i> L.) landraces of Saurashtra based on DNA fingerprinting.	Examen genotípico de 20 variedades de mango de la región de Gir, Saurashtra. Todas las variedades, excepto dos, mostraron amplia diversidad genética, indicando que los ISSR son un método efectivo para la identificación de mango.	Tomar <i>et al.</i> , 2011.
	Assessing genetic relationships among mango ( <i>Mangifera indica</i> L.) accessions of Andaman Islands using simple sequence repeat markers.	Análisis de la similitud genética de 29 variedades poliembriónicas y monoembriónicas de mango y cuatro especies relacionadas de las islas Andaman, utilizando 335 marcadores ISSR. El análisis separó los genotipos poliembriónicos de los monoembriónicos.	Damodaran <i>et al.</i> , 2012.
<b>AFLP de longitud fragmentos amplificados)</b>	Some characteristics of DNA markers studied in mango cultivars 'Alphonso' and 'Palmer' and their segregating population.	Análisis de 31 plantas a partir de cruces entre las variedades de mango 'Alphonso' y 'Palmer', además se creó una librería genómica de ADN de la variedad local 'Nang Klang Wan' y se utilizó para analizar la segregación de la población mediante marcadores AFLP y RFLP.	Chunwongse <i>et al.</i> , 1999a.
	Identification of Indochinese type mango gametic seedlings from the cross between cultivar 'Betti' and 'Nang Klang Wan'.	Los marcadores AFLP fueron utilizados para identificar las plántulas derivadas de cruces entre las variedades de mango 'Betti' y 'Nang Klang Wan'. Se identificaron 27 plántulas gaméticas de un total de 147.	Chunwongse <i>et al.</i> , 1999b.
	The construction of the fingerprinting of two mango cultivars using AFLP.	Aplicación de marcadores AFLP en la discriminación de dos variedades de mango.	Fang <i>et al.</i> , 1999.
	Amplified fragment length polymorphism for studying genetic	Estudio de relaciones filogenéticas entre 14 especies de mango de Tailandia, incluyendo tres de importancia	Eiadthong <i>et al.</i> , 2000.

relationships among <i>Mangifera</i> species in Thailand.	económica.	
The polymorphisms and segregation patterns in the F1 progenies from the cross of two mango cultivars.	Revisión del polimorfismo y segregación de patrones de marcadores AFLP en las progenies F1 derivadas de cruzamiento de las variedades de mango 'Keitt' y 'Tommy'.	Fang <i>et al.</i> , 2000.
Application of AFLP in the cultivar identification of mango.	Estudio de los patrones de bandas mediante marcadores AFLP para evaluar la variabilidad genética en portainjertos de mango en China.	Fang <i>et al.</i> , 2001.
Hybrid status of kuwini, <i>Mangifera odorata</i> Griff. (Anacardiaceae) verified by amplified fragment length polymorphism.	Estudio del origen híbrido de <i>Mangifera odorata</i> , generada a través de cruces entre <i>M. indica</i> y <i>M. foetida</i> . <i>M. odorata</i> es más parecida genéticamente a <i>M. foetida</i> . El análisis mediante AFLP permitió verificar el status híbrido de <i>M. odorata</i> .	Teo <i>et al.</i> , 2002.
Genetic relationship and diversity between and withing <i>Mangifera</i> species revealed by AFLP analysis.	Identificación de variedades de <i>Mangifera</i> y exploración de las relaciones y diversidad genética dentro y entre cuatro especies de <i>Mangifera</i> .	Yamanaka <i>et al.</i> , 2003.
Genetic relationship and diversity of four <i>Mangifera</i> species revealed through AFLP analysis.	Evaluación de las relaciones y diversidad genéticas entre cuatro especies de <i>Mangifera</i> : <i>M. indica</i> , <i>M. odorata</i> , <i>M. foetida</i> y <i>M. caesia</i> mediante AFLPs. Las variedades estudiadas se clasificaron en cuatro grupos de acuerdo a cada una de las especies, estos resultados confirman los métodos clásicos de clasificación.	Yamanaka <i>et al.</i> , 2005.
Similaridade genética de acessos de mangueira de diferentes origens geográficas avaliadas por marcadores AFLP.	Estimación de las relaciones genéticas de 105 accesiones de mango de diferente origen geográfico de la colección de germoplasma de Embrapa, Brasil. Se observaron cinco grupos. Las variedades estudiadas presentaron una tasa de similitud mayor al 51%, lo que sugiere alta variabilidad genética en la colección de germoplasma.	Fernandes-Santos <i>et al.</i> 2008.
Genetic analysis of mango landraces from Mexico based on molecular markers.	Evaluación de la diversidad y relaciones genéticas de 112 variedades nativas de mango de 16 estados de México y cuatro controles: 'Ataulfo', 'Manila' y 'Tommy Atkins' y un cultivar de <i>M. odorata</i> mediante marcadores AFLP y SSR. Ambos tipos de marcadores muestran altas tasas de similitud entre las poblaciones de mango, organizándolas en dos grupos: las del Golfo de México y las del Océano Pacífico. El análisis con AFLP fue más robusto que con SSR para determinar las relaciones genéticas entre	Gálvez-López <i>et al.</i> , 2009.

		las razas de mango.	
	Construction of AFLP molecular marking system in <i>Mangifera indica</i> L.	Análisis de 31 variedades de mango para detectar su variabilidad genética. Los AFLP resultaron útiles para la detección de polimorfismos de <i>M. indica</i> .	Yuan, 2009.
	Molecular diversity and genetic relationships of mango germoplasm from Chiapas, México.	Comparación de 41 variedades de mango del estado de Chiapas, México con otras 19 variedades mediante AFLP. El análisis mostró dos grupos. Las diferencias genéticas entre las variedades se asocian con su origen geográfico e indica nueva diversidad genética de los mangos de Chiapas.	Gálvez-López <i>et al.</i> , 2010.
	Morphological and genetic characterization of mango ( <i>Mangifera indica</i> L.) varieties in Mozambique	Describir y evaluar características morfológicas de 30 variedades de mango de Mozambique y determinar la relación genética mediante marcadores moleculares AFLP. La agrupación de las variedades se realizó en función a su origen.	Bila, 2010.
	Morphological and genetic characterization of mango ( <i>Mangifera indica</i> L.) varieties in Mozambique	Caracterización mediante marcadores morfológicos y moleculares AFLP de 30 variedades de mango de Mozambique. La combinación de los dos tipos de marcadores fue más exacta para agrupar las variedades en función de su origen geográfico.	Bila <i>et al.</i> , 2012.
ITS (espaciadores internos transcritos)	Phylogenetic relationships of <i>Mangifera</i> species revealed by ITS sequences of nuclear ribosomal DNA and a possibility of their hybrid origin.	Análisis de 14 especies de <i>Mangifera</i> de Tailandia comparando las secuencias de espaciadores internos transcritos (ITS) de la región ribosomal nuclear de ADN (nrDNA). Los análisis revelaron que <i>M. indica</i> se relaciona estrechamente con <i>M. laurina</i> , <i>M. sylvatica</i> , <i>M. oblongifolia</i> y <i>M. odorata</i> . Los resultados sugieren un origen híbrido para las especies de <i>Mangifera</i> .	Yonemori <i>et al.</i> , 2002.
	Molecular identification of mango, <i>Mangifera indica</i> L. var. Totupura.	Amplificación y secuenciación de la región del cloroplasto <i>trnL-F</i> . La secuencia de la banda dominante DGGE fue depositada en NCBI con el número de acceso GQ927757.	Sankar <i>et al.</i> , 2011.
Mapeo de linajes y QTL	Molecular mapping of mango cultivars 'Alphonso' and 'Palmer'.	Construcción de un mapa molecular a partir de cruzamientos entre las variedades 'Alphonso' y 'Palmer' mediante RFLP y AFLP.	Chunwongse <i>et al.</i> , 2000.
	Cultivar identification and genetic map of mango ( <i>Mangifera indica</i> ).	Utilizando la técnica de AFLP, se realizó el estudio de las relaciones genéticas de 16 variedades de mango y siete portainjertos y la construcción de un mapa genético de QTLs en mango basado en la progenie de cruces entre las variedades 'Tommy Atkins' y 'Keitt'. Los	Kashkush <i>et al.</i> , 2001.

	AFLP son útiles en la identificación de variedades, estimación de las relaciones y genéticas y construcción de mapas QTLs.	
Mango breeding and the potential of modern biology.	Aplicación de marcadores AFLP para el estudio de las relaciones genéticas de 16 variedades de mango y 7 portainjertos y para la construcción de un mapa genético.	Lavi <i>et al.</i> , 2004

### ***10.3 ANEXO C.***

Artículo de investigación generado de una parte del trabajo de tesis.

# Comparative Relative Growth Rate of Seedlings of *Mangifera indica* L. var. 'Haden' and 'Manila': Preliminary Data

C. Barbosa, C. Rios, D. Flores, L. Perez-Flores, F.J. Fernández and L. Ponce de León<sup>a</sup>  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa  
Av. San Rafael Atlixco 186, C.P. 09340 D.F.  
Mexico

**Keywords:** seedlings survival, resource competition, seed size, maternal resource allocation

## Abstract

There are not many relative growth rate studies in mango, in this study the aim is to contribute to a better knowledge of *Mangifera indica* seedlings growth and development during the first 12 weeks after epicotyl emergence. To obtain seedlings, mango fruits of 'Haden' and 'Manila' varieties were collected in Sinaloa, Mexico during years 2003 and 2004. Seed germination occurs in 16 days. After epicotyl emergence, seedlings were transplanted in plastic bags containing 2.5 kg of soil at  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  with photoperiod 12/12h. Seedlings weight was recorded before they were transplanted. For 'Manila' all seedlings of the same seed were transplanted together. The growth analysis takes in account: the increase of biomass per unit mass per day (relative growth rate) [RGR]. RGR is affecting by three factors: the leaf area per unit leaf dry mass or specific leaf area (SLA); the allocation of mass to leaves (light capture per unit plant mass) [LMF]; the increase in biomass per unit leaf per day (unit leaf rate) [URL]. These parameters were determined in 119 days to 'Haden' and 124 to 'Manila' seedlings.

## INTRODUCTION

In Mexico, 'Haden' and 'Manila' are the two main cultivated mango (*Mangifera indica* L.) varieties. 'Manila' is polyembryonic, with one zygotic embryo and several nucellar embryos present in the same seed, while, 'Haden' is monoembryonic with just a single zygotic embryo in each seed. There are not many studies on the relative growth rate of germinating mango seeds and the aim of this study is to analyze the growth and development of seedlings during the first 14 weeks after the emergence of the epicotyl. Here we report some preliminary results that indicate that there is a weak positive correlation between seed size and relative growth rate in two varieties of *Mangifera indica* L.

## MATERIALS AND METHODS

One hundred fruits of each variety were collected from the same orchard in Sinaloa, Mexico during June 2003 and July 2004. After fresh weight and size were determined, the seeds were immersed in commercial bleach (5% sodium hypochlorite) for 10 minutes, rinsed twice with sterile distilled water and sown in plastic trays with vermiculite saturated with water. The trays were incubated in a growth room at  $25 \pm 3^\circ\text{C}$  under a 12/12h photoperiod.

The seeds were separated in three groups according to their weight (Table 1) in 'Haden' group 1 included seeds weighing 12.5-16.9 g, group 2: 17.0-21.5 g and group 3: 22.6-26.9 g. For 'Manila', group 1 comprised seeds weighing 4.5-9.9 g, group 2: 10 -13.9 g and 3 14-17.9 g. It was considered that the seeds germinated when at least one radicle protruded the teguments (Evenari, 1961; Côme, 1980). The protrusion of the radicle was quantified every day and the germination capacity (percentage) and rate were determined (Côme, 1980).

Seed germination occurs in 16 days. After epicotyl emergence, seedlings were

---

<sup>a</sup> lplg@xanum.uam.mx

weighed and transplanted to plastic bags containing 2.5 kg of soil and incubated at  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  with a 12/12h. photoperiod. Polyembryonic 'Manila' seedlings from the same seed were transplanted together because their radicles are imbricate and damage can be done trying to separate them.

Relative growth rate (RGR) was determined according to Hunt (1982) and Tholen et al. (2004) as an irreversible biomass increase per week:  $\text{RGR} = \text{SLA} \times \text{LMF} \times \text{ULR}$ , where SLA is the leaf area divided by the leaf mass; LMF is the leaf mass divided by the plant mass and the ULR is the plant mass and leaf area at two different points. These parameters were determined over 119 days for 'Haden' and 124 for 'Manila' seedlings.

A hundred seeds of each variety were used to obtain a histogram of fresh mass data for all size categories. The analysis of seedling development for 'Manila' seeds can be done considering the growth of each seedling separately, or pooling all the seedlings from one seed.

## RESULTS AND DISCUSSION

The effect of seed size on seedling growth has received considerable attention. In many species, a negative correlation has been reported between seed biomass and the potential relative growth rate (RGR) of the derived seedlings growing under favourable conditions (Foster, 1986; Mazer, 1989; Westoby et al., 1992; Bonfil, 1998). Although it is not clear why a larger seed would produce a slow growing seedling, a large seed mass appears to be part of a traits syndrome also involving sturdy tissue construction (Reich et al., 1998; Wright and Westoby, 1999) and low rates of tissue turnover. Leishman et al., (2000) suggest that under unfavourable growth conditions the RGR of large and small-seeds may be similar, and that species with large seeds more robust leaf and root tissues may survive longer than smaller ones. Here we report some preliminary results that indicate that there is a weak positive correlation between seed size and relative growth rate in two varieties of *Mangifera indica* L.

The mean seed biomass (Table 1) and seedling growth (Table 2) of the two varieties differed significantly; the range of variation was bigger in 'Haden' for both: seed weight and seedling weight.

Germination, registered after the emergence of at least one radicle, occurred 3 days earlier in 'Haden' (with 90% Germination Capacity) than in 'Manila' where only 54% of the seeds germinated, producing as many as five radicles per seed from zygotic and nucellar embryos. Figure 1 represents the number of germinated embryos per seed in one hundred 'Manila' seeds. In nearly 30 percent of them, the allocation of reserves in the seed makes the growth of more than one seedling possible.

There were not significant differences in the number of emerged radicles by weight categories. In some cases more than one embryo germinated but just one presented epicotyl emergence and growth, and was transplanted alone. When several seedlings emerged from one seed they were transplanted together in the same soil-bag where they competed for space, nutrients and light. These seedlings, particularly the ones that emerged later were smaller, and frequently, their survival was reduced (Figs. 2 and 3). In spite of the fact that the RGR values for the three 'Manila' groups are very different, there is no direct correlation with the weight of the seeds.

Table 2 shows that SLA and RGR are larger for 'Haden' than for 'Manila' seedlings while LMF is larger for 'Manila' than for 'Haden' seedlings 14 weeks old. In 'Haden', seedling growth was significantly higher in heavier seeds. The same Table 2 shows that SLA was significantly higher in the three groups of 'Haden' than in the three groups of 'Manila' where the differences were not significant within the groups. The leaf area is not a good indicator of growth since abscission occurs in both, young expanding leaves and senescent leaves. Tholen et al. (2004) reported that a high SLA value can be due to the fact that leaves are thinner or present at lower density.

The biomass allocated to the leaves (LMF) was higher in the three groups of 'Manila' than in those of 'Haden' and this means that the seedlings of the former assigned a larger amount of resources to the leaves in spite of being much smaller and have a



smaller number of leaves than 'Haden'.

The growth rate per leaf area unit (URL) was significantly larger in 'Haden'. Similar results were observed for the RGR where 'Haden' presented a higher biomass increase per day than 'Manila'.

The differences in the growth parameters between groups were not significant and this indicates that the difference in seed size within one variety does not affect the RGR. In , however a tendency can be observed within group 1 to show a smaller RGR than group 2 and this one is in turn smaller than group 3.

There is a positive correlation between the height of the seedlings and the leaf area in both varieties ( $r^2 = 0.87$  and  $0.89$  for 'Haden' and 'Manila' respectively). After fourteen weeks, 'Haden' presented a higher average increase in foliar area ( $245 \text{ cm}^2$ ) than 'Manila' ( $68.6 \text{ cm}^2$ ) as well as a higher increase in seedling height (18 cm) than 'Manila' (9.84 cm), though this last parameter varies with time and environmental conditions.

The weight of the seeds presents a weak positive correlation ( $r^2 = 0.43$ ) in the RGR between both varieties.

The increases in the distance between nodes, the number of leaves per node and the total number of leaves varied with time and from one group to the next. The growth between nodes presented different rates and velocity.

In Table 2 we can also see a higher biomass increase for 'Haden' than for 'Manila', when there is only one seedling per seed. This could be due in part to the larger size and weight of 'Haden' seeds. In the case of functional polyembryony the analysis is more complex, and the biomasses increase must consider the pool of seedlings from one seed. As shown in Table 3, SLA could then be very high for 'Manila' and since the URL is consistently high, then, in some cases, RGR is higher for 'Manila' than for 'Haden' (see groups 1 and 3).

Competition by space and light resources could be a cause for the reduced survival probability of the seedlings that emerged late (Fig. 3). Bonfil (1998), found that, in *Quercus rugosa* and *Q. lauriana* the RGR increases with the size of the seed, something that is not clearly observed in this study, at least for 'Manila' (Table 2). Leishman et al. (2002) also found that the differences in the size of the seeds can affect the size of the adult plants in several species. On the other hand, Wilcox (1984) and Borges et al. (2003) reported that in *Ludwigia leptocarpa* and in mango var. 'Espada' respectively, the growth of the seedlings does not differ significantly with respect to the size of the seed.

Bonfil (1998), Leisman (2000) and Tholen et al. (2004) found a positive correlation in some species of plants. In animals, however, Shipley and Peters (1990 a, b) reported a weak negative correlation in 204 plant species and that in animals and unicellular organisms there is a negative correlation between RGR and body weight. In the case of plants, this correlation is not only affected by seed size but by other factors such as environmental stress and perturbation of the natural communities as well as the availability of resources for the different parts of the plant.

There are several factors that are involved in determining the total biomass of a plant at different times. First, the weight of the seeds has a significant effect on the size of seedlings at 14 weeks as shown by the different performance of the two varieties studied here. A slow germinating capacity can directly influence the growth of the seedlings: 'Haden' presented a faster velocity of germination than 'Manila' and the survival of its seedlings was higher.

Under controlled green house conditions the survival strategies deployed in natural conditions can be underestimated, nevertheless, those are the strategies that could explain the survival success of a genotype that fulfill a reproductive task.

To confirm these preliminary results this study we are processing data from plants collected in 2005 and we are using RAPD-PCR and AFLP to try to distinguish between zygotic and nucellar embryos and be able to compare their vigor and survival.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks to Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) of México for financial assistance.

## Literature Cited

- Bonfil, C. 1998. The effect of seed size, cotyledon reserves and herbivory on seedling survival and growth in *Quercus rugosa* and *Q. laurina* (Fagaceae) Amer. J. of Botany 85(81):79-87.
- Côme, D. 1980. Problems of embryonal dormancy as exemplified by apple embryo. Israel J. of Botany 29:145-156.
- Evenary, M. 1961. A survey of the work done in seed physiology by the department of Botany. Hebrew University of Jerusalem. In: Proc. Intern. of Seed Test. Ass. 26:597-658.
- Foste, S.A. 1986. On the adaptative value of large seeds for tropical moist forest trees: a review and synthesis. Botanical Review 52:260-299.
- Leishman, M.R., Wirright, I.J., Moles, A.T. and Westoby, M. 2000. The evolutionary ecology of seed size. p. 31-57. In: M. Fenner (ed.), Seeds: The ecology of regeneration in plant communities.
- Mazer, S.J. 1989. Ecological, taxonomic and life history correlates of seed mass among Indiana dune angiosperms. Ecological Monographs 59:153-175.
- Reich, P.B., Tjoelker, M.G., Walters, M.B., Vanderkelin, D.W. and Bushena, C. 1998. Close association of relative growth rate, leaf and root morphology, seed mass and shade tolerance in seedlings of nine boreal tree species grown in high and low light. Functional Ecology 12:327-338.
- Shipley, B. and Peters, R.H. 1990a. A test of the Tilman model of plant strategies: Relative Growth Rate and biomass partitioning. The American Naturalist 136:139-153.
- Shipley, B. and Peters, R.H. 1990b. The allometry of seed weight and seedling Relative Growth Rate. Functional ecology 4:523-529.
- Tholen, D., Voeselek, L.A.C.J. and Poorte, H. 2004. Ethylene insensitivity does not increase leaf area of relative growth rate in *Arabidopsis*, *Nicotiana* and *Petunia* × *hybrida*. Plant physiology 134:1803-1812.
- Westoby, M.E., Jurado, E. and Leishman, M. 1992. Comparative evolutionary ecology of seed size. Trends in Ecology and Evolution 7:368-372.
- Wright, I.J. and Westoby, M. 1999. Differences in seedling growth behaviour among species: trait correlations across species, and trait shifts along nutrient compared to rainfall gradients. J. of Ecology 87:85-97.

## Tables

Table 1. 'Haden' and 'Manila' size seed categories by fresh weight biomass.

Size category	Fresh weight (g)	SD
1	14,55	3,11
2	19,54	1,90
3	24,81	1,91
1	8,30	1,28
2	11,74	1,19
3	15,27	1,22

Table 2. Comparative growth of 14 weeks old seedlings after epicotyl emergence at 25°C± 2°C and a 12/12h photoperiod.

Growth parameters of seedlings					
Variety	Size seed category	SLA (m <sup>2</sup> kg <sup>-1</sup> )	LMF (g g <sup>-1</sup> )	URL (g m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup> )	RGR (mg g <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
'Haden'	1	69.56	0.23	0.0031	0.050
	2	93.62	0.31	0.0019	0.054
	3	98.96	0.28	0.0023	0.064
'Manila'	1	39.82	0.58	0.0019	0.042
	2	76.35	0.5	0.0003	0.010
	3	80.98	0.39	0.0009	0.029

Table 3. Parameters of growth as biomass increase by seed of 'Haden' and 'Manila' varieties.

Comparative growth parameters of seedlings				
	SLA (m <sup>2</sup> kg <sup>-1</sup> )	LMF (g g <sup>-1</sup> )	URL (g m <sup>2</sup> d <sup>-1</sup> )	RGR (mg g <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
'Haden'				
Group 1	69.56	0.23	0.0031	0.050
Group 2	93.62	0.31	0.0018	0.054
Group 3	98.96	0.28	0.0023	0.064
'Manila'				
Group 1	79.65	0.58	0.0018	0.085
Group 2	180.73	0.5	0.0003	0.024
Group 3	267.05	0.39	0.0009	0.096

**Figures**

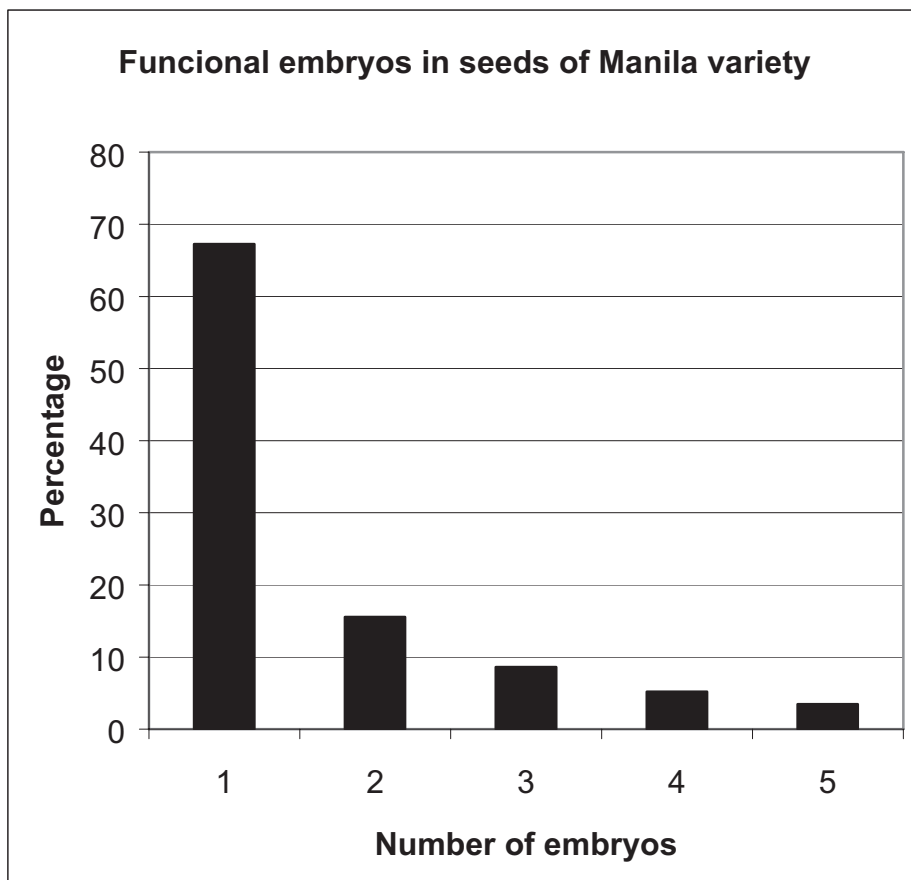


Fig. 1. Funcional embryos germinated per seed in var. 'Manila'.

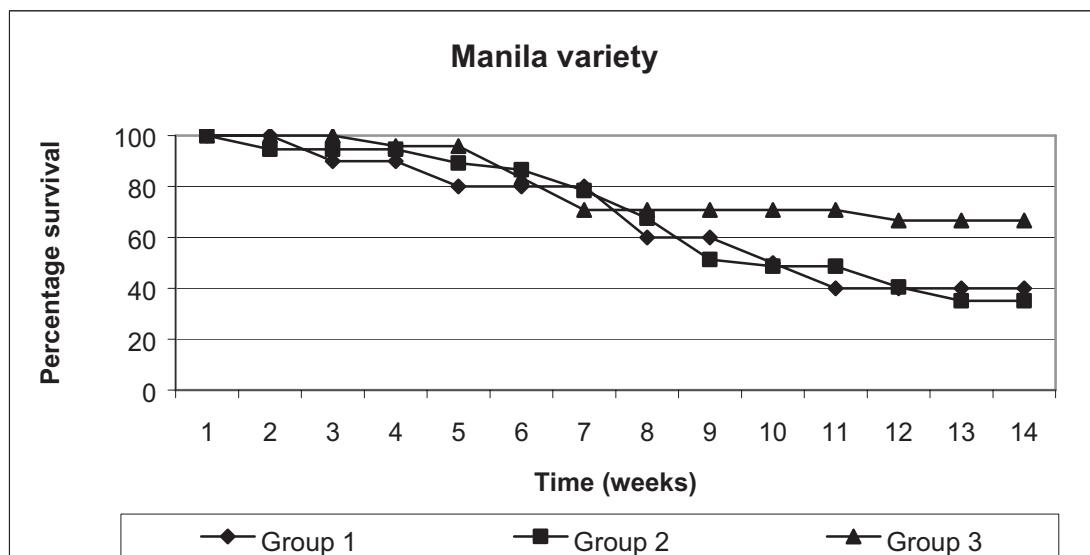


Fig. 2. Percentage of seedling survival related to seed size.

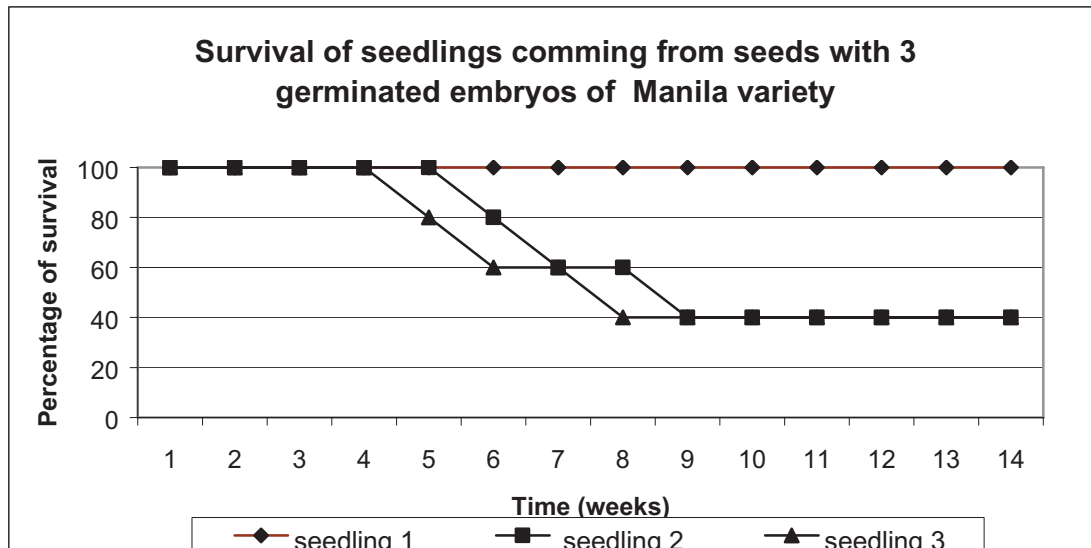


Fig. 3. Percentage of seedling survival by number of embryos germinated from the same seed in the 'Manila' variety.

