



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DESARROLLO DE FRUTOS DE MANGO *Mangifera indica* L. VAR.
"HADEN" Y PREVENCIÓN DE ANTRACNOSIS

Tesis que para obtener el grado académico de Maestro en
Ciencias Biológicas

P R E S E N T A

CLAUDIA BARBOSA MARTÍNEZ

Directora: Dra. Leticia Ponce de León García
Asesora: Dra. Clara Pelayo Zaldivar
Asesor: Dr. Daniel Nieto Angel

Diciembre del 2003

La Maestría en Biología de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT y además cuenta con apoyo financiero del mismo Consejo.

La presente tesis titulada: DESARROLLO DE FRUTOS DE MANGO *Mangifera indica* L. VAR. HADEN Y PREVENCIÓN DE ANTRACNOSIS, realizada por la alumna CLAUDIA BARBOSA MARTÍNEZ bajo la dirección del Comité Tutorial abajo indicado, ha sido aprobada por el mismo y por el jurado designado.

Dra. Leticia Ponce de León García
Universidad Autónoma Metropolitana -Iztapalapa
(Presidente)

Dra. Clara Pelayo Zaldivar
Universidad Autónoma Metropolitana -Iztapalapa
(Secretario)

Dr. Daniel Nieto Angel
Colegio de Postgraduados
(Vocal)

Dra. Gpe. Judith Márquez Guzmán
Fac. Ciencias UNAM
(Vocal)

Dr. E. Mark Engleman Clark
Colegio de Postgraduados
(Vocal)

México, D. F., Diciembre del 2003

D e d i c a t o r i a

Con todo mi amor
para mi hijo Carlos Antonio
porque tu sola presencia me motiva a
superarme día con día.

Para mi esposo Octavio
ya que sin tu apoyo, amor y comprensión
no hubiera sido posible
la realización de este sueño.

Con todo mi cariño y agradecimiento
a mi madre,
mis hermanos y todos mis amigos.

Para mi familia política
por el apoyo incondicional que me han
brindado en esta etapa de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

El logro de este trabajo de tesis fue gracias al pueblo de México a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

A la Dra. Clara Pelayo Zaldivar, por su gran disposición en la revisión de este y otros trabajos que han formado parte de mi formación académica y por la confianza que siempre ha depositado en mí.

Al Dr. Daniel Nieto Angel, por su apoyo incondicional en el campo de la fitopatología, por su disposición y calidad humana.

A la Dra. Judith Márquez, por aceptar ser parte del jurado de tesis y por la revisión minuciosa de la misma.

Al Dr. E. Mark Engleman, por enseñarme un poco del vasto conocimiento que posee en anatomía de semillas y por ser parte del jurado de tesis.

A la Dra. Ana Laura Ibáñez, por preocuparse por nosotros, los estudiantes de la maestría.

Al Dr. José Sepúlveda Sánchez, por enseñarme y hacerme amar a la microscopía, por ser más que un profesor un gran amigo y maestro de vida y porque representa un digno ejemplo a seguir por su calidad humana incomparable.

A la Ing. Patricia Castillo, por la confianza y amistad que me ha brindado y por su apoyo en el procesamiento y observación del material de microscopía electrónica.

Al Dr. F. José Fernández Perrino, por compartirme un poco de sus conocimientos en microbiología y biología molecular.

Al Dr. Antonio Mora, por contagiarme su pasión por la fitopatología.

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

Al Dr. David Krogmann, por contribuir en la revisión de uno de los artículos científicos derivado del trabajo de tesis, por su paciencia y dedicación.

Al Fis. Jorge Lodigiani, por su apoyo en la toma de fotografías.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Ecofisiología, Víctor García, Rodrigo Lara, Marco Allán Pérez, Erica Guillén, Elizabeth X. Jiménez, Elizabeth Santiago, Andrea, Esther, Juan y Fátima, por los buenos momentos que pasamos juntos y por el gran apoyo brindado.

A María Eugenia Muñiz, por ser mi gran amiga y confidente y porque juntas estamos a un paso de alcanzar una de nuestras metas.

A mis amigos de la maestría, Marú, Paco, Ariadna, Laura G., Marco, Laura, Sandra y Enrique porque en los momentos difíciles siempre estuvimos juntos para apoyarnos.

A todas aquellas personas, quienes de alguna manera hicieron posible este trabajo de tesis.

RECONOCIMIENTO

Un reconocimiento especial a una de las personas que más ha contribuido en mi formación académica y humana durante varios años.

Dra. Leticia Ponce de León García

Quiero agradecerle sinceramente el apoyo incondicional que siempre me ha brindado; la paciencia, la confianza y la atención que ha tenido conmigo en cada momento en que me ha asesorado. Pero sobre todo la amistad y el cariño que me ha otorgado durante todo este tiempo. Muchas gracias.

CONTENIDO

	Pág.
1. RESUMEN	1
ABSTRACT	2
2. INTRODUCCIÓN	3
3. OBJETIVO GENERAL	9
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
HIPÓTESIS	9
4. METODOLOGÍA	10
5. DESCRIPCIÓN DEL SITIO DE COLECTA	
5.1. Localización de la huerta La Pedregosa	11
5.2. Descripción de la huerta La Pedregosa	11
6. DESARROLLO DEL FRUTO Y LA SEMILLA VAR. ‘HADEN’	
6.1. ANTECEDENTES	
6.1.1. Características botánicas	13
6.1.2. Características de las flores	15
6.1.3. El pericarpo	16
6.1.4. La semilla del mango	17
6.2. OBJETIVO	20
6.3. MATERIALES Y MÉTODOS	
6.3.1. Sitio de colecta	20
6.3.2. Material colectado	20
6.3.3. Parámetros de calidad	20
6.3.4. Parámetros histológicos	21
6.3.5. Preparación de muestras para microscopía óptica	21
6.3.6. Preparación de muestras para microscopía de barrido	22
6.4. RESULTADOS	
6.4.1. Parámetros de calidad de frutos var. ‘Haden’	23
6.4.2. Flor y verticilos florales	23
6.4.3. Desarrollo del fruto	30

6.4.4.	Desarrollo de la semilla	35
6.4.5.	Curva de crecimiento de los frutos var. ‘Haden’	48
6.5.	DISCUSIÓN	51
6.6.	CONCLUSIONES	53
7.	DESARROLLO DEL FRUTO Y LA SEMILLA VAR. ‘MANILA’	
7.1.	ANTECEDENTES	56
7.2.	OBJETIVO	57
7.3.	MATERIALES Y MÉTODOS	57
7.4.	RESULTADOS	
7.4.1.	Parámetros de calidad de frutos var. ‘Manila’	58
7.4.2.	Flor y verticilos florales	58
7.4.3.	Desarrollo del fruto var. ‘Manila’	59
7.4.4.	Desarrollo de la semilla var. ‘Manila’	61
7.4.5.	Curva de crecimiento de los frutos var. ‘Manila’	62
7.5.	DISCUSIÓN	68
7.6.	CONCLUSIONES	79
8.	EFFECTO DEL OZONO EN LA PREVENCIÓN DE ANTRACNOSIS	
8.1.	ANTECEDENTES	
8.1.1.	Antracnosis del mango	72
8.1.2.	Control mediante el uso de fungicidas	73
8.1.3.	Tratamientos alternativos	74
8.1.4.	Estudios histopatológicos en mango	76
8.2.	OBJETIVO	77
8.3.	MATERIALES Y MÉTODOS	
8.3.1.	Obtención, aislamiento y cultivo de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> Penz.	77
8.3.2.	Evaluación de la germinación de esporas a diferentes concentraciones de ozono	78
8.3.3.	Evaluación del crecimiento micelial	78
8.3.4.	Esporulación	78
8.3.5.	Evaluación de patogenicidad	79
8.3.6.	Preparación de muestras para microscopía de transmisión	79
8.3.7.	Análisis estadístico	80

8.4.	RESULTADOS	
8.4.1.	Evaluación de la germinación de esporas a diferentes concentraciones de ozono	80
8.4.2.	Evaluación del crecimiento micelial	82
8.4.3.	Esporulación	82
8.4.4.	Evaluación de patogenicidad en frutos de mango	82
8.5.	DISCUSIÓN	94
8.6.	CONCLUSIONES	95
9.	BIBLIOGRAFÍA	97
10.	ANEXOS	
10.1.	Apéndices	109
10.2.	Artículo derivado del trabajo de investigación de tesis	113

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Fases de la embriogénesis	19
Figura 2. Panícula y flores de mango var. 'Haden'	28
Figura 3. Flor de mango var. 'Haden'	29
Figura 4. Exocarpo, mesocarpo y endocarpo de fruto de mango var. 'Haden'	38
Figura 5. Exocarpo, mesocarpo y endocarpo de fruto de mango var. 'Haden' durante las tres primeras etapas de desarrollo	39
Figura 6. Exocarpo, mesocarpo y endocarpo de fruto de mango var. 'Haden' durante las etapas IV, sazón y maduro	40
Figura 7. Exocarpo, mesocarpo y endocarpo de fruto de mango var. 'Haden' durante las etapas III, IV, maduro y senescente	42
Figura 8. Desarrollo de la capa papirácea	43
Figura 9. Cutícula de frutos 'Haden' y 'Manila'	44
Figura 10. Embriogénesis	46
Figura 11. Tegumentos de semillas mono y poliembriónicas	47
Figura 12. Etapas de desarrollo de frutos var. 'Haden'	50
Figura 13. Etapas de desarrollo de frutos var. 'Manila'	64
Figura 14. Exocarpo, mesocarpo y endocarpo de fruto de mango var. 'Manila' durante las tres primeras etapas de desarrollo	66
Figura 15. Exocarpo, mesocarpo y endocarpo de fruto de mango var. 'Manila' durante las etapas IV, sazón y maduro	67
Figura 16. Esporas de <i>C. gloeosporioides</i> expuestas a diferentes concentraciones de ozono	87
Figura 17. Síntomas de antracnosis en frutos var. 'Haden'	88
Figura 18. Síntomas de antracnosis en frutos var. 'Manila'	89
Figura 19. Histopatología de frutos var. 'Haden' inoculados con esporas de <i>C. gloeosporioides</i>	91
Figura 20. Histopatología de frutos var. 'Manila' inoculados con esporas de <i>C. gloeosporioides</i>	92

ÍNDICE DE CUADROS Y GRÁFICAS

	Pág.
Gráfica 1. Producción de mango a nivel mundial	5
Gráfica 2. Producción de mango a nivel nacional	5
Gráfica 3. Exportación mundial de mango	5
Cuadro 1. Enfermedades más relevantes del mango	8
Cuadro 2. Posición taxonómica del mango	13
Cuadro 3. Contenido nutrimental del fruto del mango	14
Cuadro 4. Peso de los diferentes tejidos en un lote de 100 frutos maduros var. 'Haden'	23
Cuadro 5. Parámetros cualitativos y cuantitativos de los verticilos florales de var. 'Haden'	26
Gráfica 4. Tamaños celulares de los tejidos de los frutos de mango de la var. 'Haden' durante el desarrollo	49
Gráfica 5. Curva de crecimiento de la var. 'Haden'	49
Cuadro 6. Peso de los diferentes tejidos en un lote de 100 frutos maduros var. 'Manila'	58
Gráfica 6. Tamaños celulares de los tejidos de los frutos de mango de la var. 'Manila' durante el desarrollo	63
Gráfica 7. Germinación de esporas de <i>C. gloeosporioides</i> expuestas a diferentes concentraciones de ozono	85
Gráfica 8. Crecimiento micelial en colonias de esporas de <i>C. gloeosporioides</i> tratadas con diferentes concentraciones de ozono	85
Gráfica 9. Esporulación de colonias de <i>C. gloeosporioides</i> expuestas a diferentes concentraciones de ozono	85
Gráfica 10. Patogenicidad en frutos de mango inoculados con <i>C. gloeosporioides</i>	93

1. RESUMEN

Este estudio aporta conocimientos acerca de los principales cambios morfohistológicos que tienen lugar durante siete etapas de desarrollo del fruto y la semilla de mango (*Mangifera indica* L.) de las variedades ‘Haden’ y ‘Manila’ y, por otro lado, evalúa al ozono como un método de prevención de antracnosis, una de las enfermedades que provocan las mayores pérdidas en postcosecha. Flores, frutos y semillas en diferentes estados de desarrollo se colectaron en Sinaloa, México. Muestras de tejido (exocarpo, mesocarpo, endocarpo y semilla) se fijaron en FAA y glutaraldehído y prepararon mediante técnicas histológicas convencionales para microscopía óptica y electrónica. Algunos frutos maduros de ambas variedades se inocularon con esporas de *Colletotrichum gloeosporioides*, frutos inoculados y no inoculados se incubaron durante 11 días para cuantificar los síntomas de la antracnosis. Después de la fecundación, los fitoreguladores inducen la transformación del ovario en fruto, estos cambios ocurren en aproximadamente 115 a 120 días, en este período se diferencian los tejidos: exocarpo, mesocarpo, endocarpo y la semilla. El patrón de desarrollo, después de la fecundación comienza con un crecimiento lento en las primeras cinco semanas. La tasa de crecimiento se incrementa exponencialmente de la sexta a la décimo tercera semana y más tarde se presenta una tasa lenta hasta la madurez. En la variedad ‘Manila’ la diferenciación de los tejidos del fruto ocurre de manera más acelerada que en la ‘Haden’, así como la acumulación de sustancias amiláceas y, por lo tanto, la maduración y senescencia también se presentan de forma relativamente anticipada, lo que explica la corta vida de anaquel de los frutos de la variedad ‘Manila’ y el hecho de que se dificulte su exportación a destinos lejanos. El exocarpo y el endocarpo en la var. ‘Haden’ son más gruesos, lo que le confiere mayor firmeza y resistencia contra daños mecánico, por frío o ataque de patógenos, tanto en el fruto como en la semilla. La var. ‘Haden’ presenta una semilla con un solo embrión de tipo sexual, mientras que en ‘Manila’ se presentan varios embriones, uno de ellos es sexual y el resto son de origen nucelar. Después de la fecundación, el cigoto permanece sin dividirse en el extremo micropilar del saco embrionario, mientras que el endospermo comienza su desarrollo, inicialmente el endospermo es de tipo sincicial y posteriormente se celulariza y el embrión ocupa la mayor parte del saco embrionario, ya que consume al endospermo. La diferenciación del endospermo y el desarrollo a embrión acorazonado ocurre cuando el fruto alcanza aproximadamente cuatro centímetros de longitud en ambas variedades. El ozono resultó un buen método de prevención de antracnosis en mango a una concentración de 2.0 mg.L^{-1} de ozono, con la ventaja sobre otros métodos tradicionales como el tiabendazol y el benomil de no dejar residuos tóxicos y sin reducir sensiblemente la calidad de los frutos.

ABSTRACT

This study contributes to the knowledge of the main morphohistological changes that take place during seven stages of fruit and seed development of mango (*Mangifera indica* L.) in the 'Haden' and 'Manila' varieties. It also evaluates ozone application as a method for anthracnosis prevention. This is one of the diseases that cause greater losses after harvest. Flowers, fruits and seeds in different development stages were collected in Sinaloa, Mexico. Tissue samples were fixed in FAA and glutaraldehyde and prepared by conventional techniques of histology for optical and electronic microscopy. Some mature fruits of two varieties were inoculated with spores of *Colletotrichum gloeosporioides*, both inoculated and no inoculated fruits were incubated during 11 days to quantify the anthracnosis symptoms. After the fecundation, the phytohormones induce the transformation of the ovary in fruit. Fruit development occurs in a period of 115 to 120 days. In this process exocarp, mesocarp, endocarp tissues and the seed differentiate. After the fecundation, the development pattern starts with a slow growth which extends for the first five weeks; then the growth rate increased exponentially from the sixth to the thirteenth week and after that it proceeds at a slower rate until maturity. In 'Manila' fruits differentiation of tissues occurs more rapidly than in 'Haden'. The accumulation of amilaceous substances and maturation and senescence processes take place earlier than in 'Haden', which explains the shorter shelf life of 'Manila' fruits and their limitation to be exported to distant destinations. The exocarp and the endocarp in 'Haden' fruits are thicker, which confers greater firmness and resistance to mechanical damages, cold damage or pathogen attack, to both, the fruit and the seed, respectively. 'Haden' variety presents a seed with a single sexual embryo, while in 'Manila' several embryos are present. One of these is sexual and the rest are nucellar in origin. During the first stages of embryogenesis, the zygote remains without being divided at the micropilar end of the embryonic sack, while the endosperm starts to develop. Initially endosperm is syntitial, and later becomes cellular. When this happens, the embryo occupies most of the embryonic sack, and the endosperm is consumed. The endosperm and heart embryo differentiation occur when the fruit reaches four centimeters in length approximately in both varieties. The ozone is a good method for anthracnosis prevention in mango at a concentration of 2.0 mg.L⁻¹ ozone, with the advantage over other traditional methods such as the tiabendazol, that it does not leave toxic residues and without reducing the quality of the fruits sensibly.

3. INTRODUCCION

Morfológicamente, la familia de las Anacardiaceas a la cual pertenece el mango ha recibido poca atención. El mango *Mangifera indica* L. es la especie cultivada de mayor distribución mundial de la familia (entre 33° de latitud Sur y 36° de latitud Norte), es el tercer cultivo tropical de importancia económica a nivel mundial, superado solo por el plátano y la piña (Galán, 1993; 1999).

El mango es una especie que se originó probablemente en la región Indo-Malaya, se cultiva desde hace más de 6000 años (Hill, 1952; Mata y Mosqueda, 1995). Se reconocen dos centros de domesticación, uno en la India para las variedades monoembriónicas y otro en Myanmar, Tailandia, Filipinas e Indonesia para las poliembriónicas lo que explicaría las diferencias existentes entre los cultivares poliembriónicos de Myanmar, Tailandia, Indochina y Vietnam, y los cultivares monoembriónicos de la India (Bompard y Schnell, 1997). Actualmente se producen más de 26 millones de toneladas de mango en más de 100 países de los trópicos y subtropicos Gráfica 1 (FAO, 2002).

En México, los españoles lo introdujeron a fines del siglo XVIII y principios del siglo XIX (Mosqueda, *et al.* 1996). A Florida llega en 1861 (Campbell, 1992). La obtención en 1912 en Florida de los cultivares Haden, Tommy Atkins, Kent, Keitt e Irwin por el Bureau of Plant Industry del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, marca el desarrollo moderno de este cultivo en el Occidente, no sólo adaptado para cultivo comercial en varios países, sino que dichas variedades han servido de base a los programas de mejora de Israel, Sudáfrica y Australia (Galán, 1999).

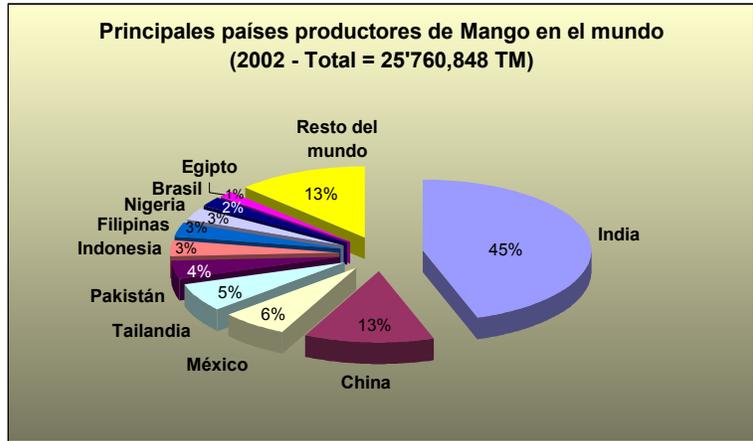
Actualmente 25 de los 32 estados de la República Mexicana producen mango, localizándose 91% de la superficie plantada en los estados de Veracruz, Michoacán, Nayarit, Chiapas, Guerrero, Oaxaca, Sinaloa, Colima, Jalisco y Campeche, los que aportan

el 94% de la producción total del país, que en el año 2001 superó el millón y medio de toneladas (Gráfica 2) (Mata y Mosqueda, 1995).

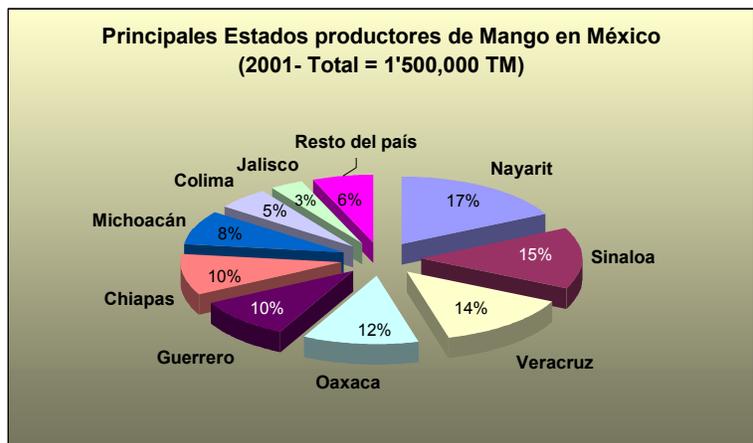
El estado de Sinaloa, uno de los exportadores más importantes del país, participa con alrededor de un 23% en la exportación de mango. La región es considerada como una de las mejores en calidad de fruta, por lo que es la que tiene mayor participación en el mercado europeo y de Japón (Loubet, 2000), localizándose principalmente en los municipios de Escuinapa, El Rosario, Mazatlán y Concordia (Guzmán, *et al*, 1993).

El mango es un frutal de importancia socioeconómica en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. En México, la producción se ha incrementado año tras año debido a la demanda nacional e internacional (Ruiz, 2001). En el año 2002 nuestro país ocupó el tercer lugar como productor antecedido por la India y China (Gráfica 3) (FAO, 2002). Como exportador México ocupa el primer lugar, comercializando en los mercados internacionales un volumen cercano a las 206 mil toneladas de mango fresco por año (Gráfica 3.3) (FAO, 2000).

Hasta ahora el mercado de exportación para el mango mexicano esta orientado principalmente a América del Norte, debido a su cercanía, aunque también exporta a Europa, Japón, Nueva Zelanda, Australia y Chile. Entre las variedades de exportación más comerciales están: 'Tommy Atkins' (43%), 'Haden' (22%), 'Kent' (15%), 'Ataulfo' (13%), 'Keitt' (7%) y recientemente se introducen pequeños volúmenes de 'Manila' (De los Santos y Mosqueda, 1989; Crane *et al.*, 1997; Wong, 1998; Báez, 1998; Galán, 1998; EMEX A.C.,1999; Loubet, 2000).



Gráfica 1. Producción de mango a nivel mundial



Gráfica 2. Producción de mango a nivel nacional



Gráfica 3. Exportación mundial de mango

El cultivo del mango en México enfrenta problemas socioeconómicos, tecnológicos y fitosanitarios que provocan daños directos en la producción y calidad de los frutos, lo que afecta notablemente la comercialización (Vega, 1994; Ruíz, 2001; Ponce de León, *et al.*, 2003)

El mango es una especie que puede contraer numerosas enfermedades, se conocen alrededor de 90 patógenos (hongos y bacterias) que afectan el cultivo (Galán, *et al.*, 1982). En el cuadro 1 se citan las enfermedades que causan las mayores pérdidas a nivel mundial.

El síntoma provocado por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. se denomina antracnosis y es una de las enfermedades que afecta al mayor volumen de frutas en diversos cultivos, entre los que se encuentran el mango, el aguacate, la papaya, el plátano y los cítricos principalmente (Jeffries *et al.*, 1990; Alahakoon *et al.*, 1994; Nieto *et al.* 1997).

Actualmente la aplicación tradicional de fungicidas como tiabendazol, maneb, mancozeb, propineb, zineb, clortalonil, captafol, benomilo, captan, oxiclورو de cobre y metil tiofanato han sido eficaces para el control de la antracnosis (Galán, 1999), pero éstos, además de presentar efectos adversos en el ambiente, favorecen la presencia de residuos tóxicos en los productos alimentarios, por lo que se están investigando tratamientos de prevención y control alternativos como: hidrotermia, irradiación, refrigeración, atmósferas modificadas o controladas (Bósquez, 1997) y ozonización (Ponce de León *et al.* 2001).

El ozono es un dímero del oxígeno que se sintetiza a partir de éste en la naturaleza utilizando la energía liberada por las descargas eléctricas, es un gas con un gran efecto germicida por sus propiedades oxidantes, liberado en el aire o en solución la molécula es inestable, se mantiene solo de 15 a 20 min a temperaturas entre 10 y 20°C y después se descompone en oxígeno sin dejar residuos tóxicos (Gordon, 1979; Ponce de León *et al.*, 2001).

En los últimos años, se han realizado grandes esfuerzos en manejo integrado con el objetivo de reducir el número de tratamientos químicos (Téliz, 1998), incluso se trabaja en la producción de fruta orgánica sin tratamientos químicos y sin abonos de síntesis, cuya demanda va en aumento en los mercados europeos (Galán, 1999).

Se han reconocido como plagas de menor o mayor importancia en mango a 87 de 206 especies de insectos y ácaros. Entre las plagas más serias se pueden mencionar a las moscas de la fruta, el taladrador de la semilla, diversas cochinillas, los trips, los gorgojos y los ácaros, que alimentándose directamente de cualquier parte de la planta, raspando u ovopositando pueden causar pérdidas de diferentes magnitudes. El taladrador de la semilla y algunas larvas penetran la pulpa de la fruta y en ocasiones la semilla. Otras plagas, como *Otheris materna* L., *Gonodonta pyrago* Cram, *G. Clotilde* Stoll y *Leptoglossus stigmai* Herbest se presentan sólo en la pulpa de los mangos maduros. Los trips, también pueden considerarse entre los que causan pérdidas importantes en flores y durante las fases tempranas del desarrollo de las frutas. Las moscas de la fruta pertenecen a los géneros *Anastrepha*, *Bactrocera*, *Ceratitis*, *Dirioxa* y *Toxotrypana*, se encuentran en todas las áreas de cultivo del mundo tanto en frutos verdes como maduros dependiendo de la especie (Galán, 1997; Peña y Mohyuddin, 1997; White y Elson-Harris, 1992).

Hasta ahora las plagas se han controlado con la aplicación de una amplia variedad de químicos, entre los que se encuentran: el diclorvos, endosulphan, dimethoate, fenithrothion, carbaryl y malathion (Nachiappan y Baskaran, 1986; Yee, 1987; Wysoki, et al., 1993). La utilización continúa de insecticidas ha traído como consecuencia que algunas especies de insectos hayan adquirido resistencia, y además algunas pestes menores se han transformado en pestes de mayor impacto. Por otro lado, al aplicar insecticidas se perturba el medio ambiente y se afecta la salud del consumidor, por lo que la tendencia es a reducir la aplicación de químicos y promover los programas de manejo integrado de plagas (Téliz, 1998). El control biológico, utilizando parasitoides, depredadores naturales e insectos estériles dentro de las poblaciones ha sido exitoso (Cunningham, 1984; Barclay, 1987; Mohyudiin y Mahmood, 1993; Wysoki, et al., 1993; Peña, et al., 1997).

Cuadro 1. Enfermedades más relevantes del mango

Enfermedad	Patógeno
Antracnosis	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc. in Penz y su variante <i>C. gloeosporioides var. minor</i> Simmonds.
Malformación o escoba de bruja	<i>Fusarium subglutinans</i> Wollemweb & Reinking. <i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht.
Oidio o cenicilla	<i>Oidium mangiferae</i> Berthet.
Muerte descendente	<i>Botryodiplodia theobromae</i> Pat.
Fumagina	<i>Capnodium mangiferae</i> P. Henn.
Pudriciones de la base del fruto (Pudrición de pedúnculo)	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> (Pat.) Griffon & Maubl. <i>Dothiorella dominicana</i> Petrak. et Cif. <i>Dothiorella mangiferae</i> H. et P. Syd. et But. <i>Phomosis mangiferae</i> Ahmad. <i>Pestalotiopsis mangiferae</i> (Henn.) Steyaert.
Mancha foliar gris	<i>Pestalotiopsis mangiferae</i> (Henn.) Steyaert.
Pudrición negra	<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Kreisler.
Roña	<i>Elsinöe mangiferae</i> Betancourt & Jenkin.
Mancha negra bacteriana	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Mangiferae indicae</i> (Patel, Moniz & Kulkarni) Robbs, Ribeiro & Kimurat.
Pudrición por moho negro	<i>Aspergillus niger</i> Tieghem.

Fuente: Fitzell y Peak, 1984; Jeffries *et al*, 1990; 1994; Lim, 1994; Tandon, *et al.*, 1955 ; Nieto *et al* 1997; Dodd *et al.*, 1997; Ploetz y Prakash, 1997; Manicom, 1998; Galán, 1999; Ruiz, 2001.

OBJETIVO GENERAL

Describir el patrón de desarrollo del fruto y la semilla de mango de la variedad 'Haden' y evaluar al ozono como un método de prevención de antracnosis.

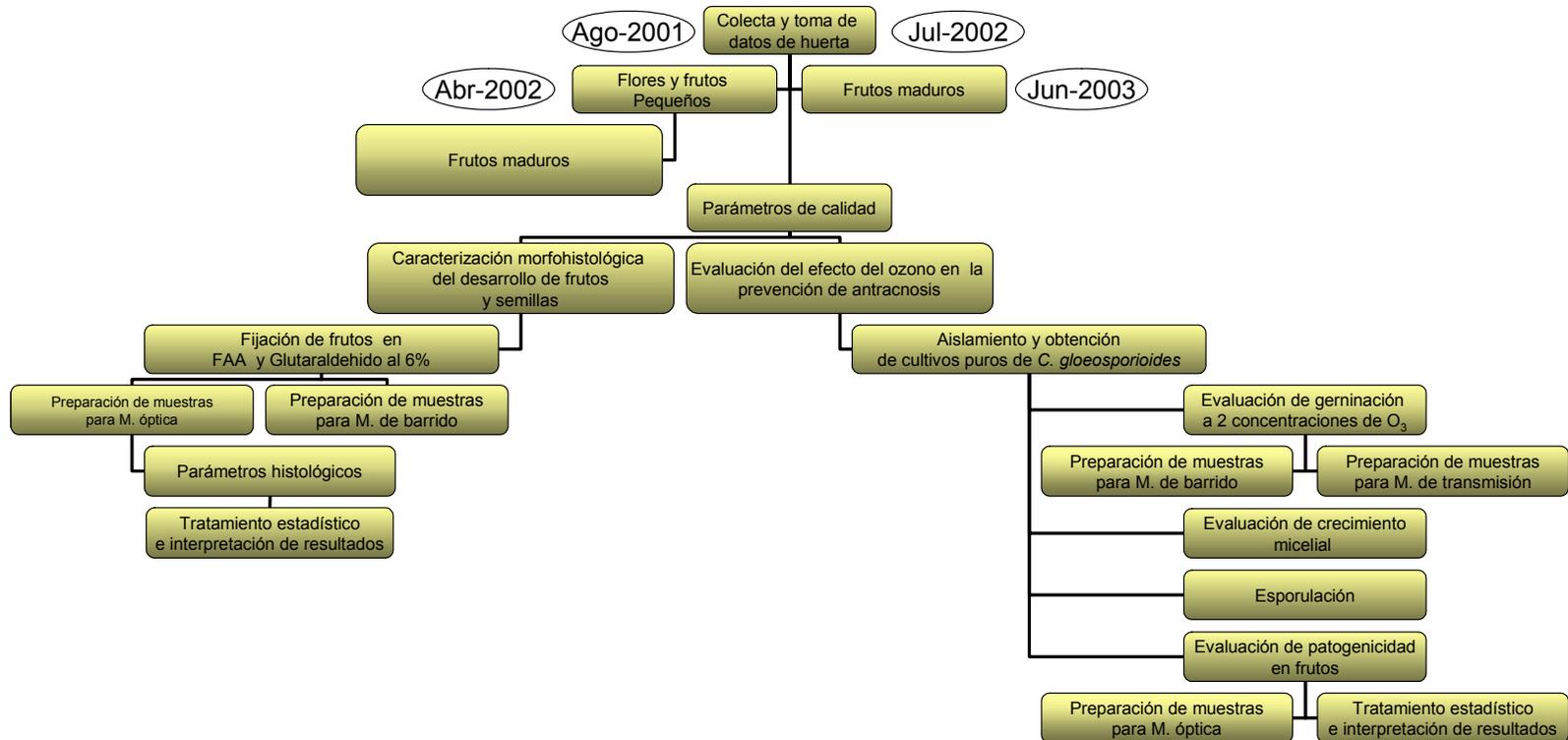
OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterización morfohistológica de flores, semillas y frutos en diferentes estados de desarrollo de mango variedad 'Haden'.
- Comparación de algunos eventos fundamentales del desarrollo de la semilla y del fruto en la variedad 'Manila'.
- Evaluación de la efectividad del ozono para la prevención postcosecha de antracnosis en frutos de mango.

HIPÓTESIS

Las características pre y postfecundación del óvulo y del ovario que distinguen a las variedades de mango contribuyen a explicar las diferencias tanto estructurales como fisiológicas presentadas por las semillas y los frutos. Estas diferencias condicionan la respuesta de los frutos frente a tecnologías de conservación y les confieren distinta susceptibilidad a enfermedades.

4. METODOLOGÍA



5. DESCRIPCIÓN DEL SITIO DE COLECTA

5.1. Localización de la huerta La Pedregosa

Flores y frutos de mango de las variedades ‘Haden’ y ‘Manila’ se colectaron en la huerta la Pedregosa en el municipio de El Rosario, Sinaloa, México. El Rosario está localizado a 76 km al sudeste de Mazatlán y a 299 km de Culiacán en el estado de Sinaloa. Latitud: 22°59’ N; longitud: 105° 51’ W; altitud: 35 msnm. La huerta la Pedregosa se encuentra ubicada en el entronque de las carreteras El Rosario (kilómetro 13) - Agua Verde, a 2.5 km del poblado El Matadero.

5.2. Descripción de la huerta La Pedregosa

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. En la huerta se cultiva mango de las variedades ‘Manila’, ‘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, se aplican fertilizantes y fungicidas periódicamente, el sistema de riego es por goteo.

Las condiciones ambientales de la huerta La Pedregosa son las siguientes:

Suelo: pH: 5.6 -8.0; salinidad:0.2 -1.7 miliomhs; profundidad: 30- 100 m; textura: franco arenosa, franco arcillosa y arcillosa; composición: arcilla: 53.76%, limo: 14.16%, arena: 32.08%.

Temperatura: Mínima extrema: 5.5° C; Máxima extrema: 41° C; Máxima: 20.75 – 30° C.

Precipitación pluvial total anual: 954 mm.

Evaporación total anual: 1787 mm.

Período de lluvias: Julio, agosto y septiembre.

Período seco: Febrero, marzo, abril y junio.

6. DESARROLLO DEL FRUTO Y LA SEMILLA VAR. 'HADEN'



6. DESARROLLO DEL FRUTO Y LA SEMILLA VAR. ‘HADEN’

6.1. ANTECEDENTES

6.1.1. Características botánicas

El mango pertenece a la familia de las Anacardiáceas (Cuadro 2), el género *Mangifera* comprende 69 especies (Kosterman y Bompard, 1993) El árbol del mango es una planta perenne que 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 varía en función del cultivar, condiciones climáticas, época de floración y productividad del árbol (Singh, 1963; Singh, et al., 1966; Galán, et al., 1984). El color de la inflorescencia así como de la flor es característico también de cada variedad (Mukherjee, 1997; Galán, 1999).

Cuadro 2. Posición taxonómica del mango

Clase	Dicotiledóneas
Subclase	Rosidae
Orden	Sapindales
Suborden	Anacardiineae
Familia	Anacardiaceae
Género	Mangifera
Especie	indica

Fuente: Galán, 1999.

El fruto del mango es una drupa grande y carnosa cuya semilla puede contener uno o más embriones. Los mangos de tipo indú (monoembriónicos) son de los que derivan la mayoría de los cultivares comerciales actuales: ‘Haden’, ‘Tommy Atkins’, ‘Kent’, ‘Keitt’. Los mangos poliembriónicos se utilizan normalmente como patrones, aunque hay algunos

cultivares importantes poliembriónicos, tales como, ‘Manila’, ‘Kesington’ o ‘Nan Doc Mai’ (Galán, 1999).

El fruto posee un mesocarpo comestible, de grosor variable con un sabor de trementina a dulce, pasando por diversos grados de acidez. La fruta madura del mango contiene aminoácidos, hidratos de carbono, ácidos grasos, minerales, ácidos orgánicos, proteínas, vitaminas y azúcares: sacarosa, glucosa y fructosa. Muchos de los valores de la composición del mango son variables dependiendo de los cultivares y del grado de madurez; en el cuadro 3 se presenta un ejemplo de un análisis realizado por la USDA en 1992.

Cuadro 3. Contenido nutrimental del fruto del mango

Componente	Contenido en 200 g de pulpa de mango
Calorias	54.0 g
Proteínas	0.6 g
Hidratos de carbono	14.0 g
Lípidos	0.35 g
Sodio	6.0 mg
Potasio	156.0 mg
Vitamina A	3960.0 IU
Vitamina C	29 mg

Fuente: 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 200g hasta 2kg y en forma desde redonda hasta ovoide, arriñonados y a veces aplanados lateralmente y en cuanto al color, este varía entre verde, amarillo y distintas tonalidades de rosa, rojo y violeta (Mukherjee, 1997, Galán, 1999).

La variedad ‘Haden’ es la más antigua de las variedades de Florida, Estados Unidos (1902). Fue sembrada por Jonh J. Haden, proviene de un árbol de la variedad ‘Mulgoba’ originaria de la India. 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, se propaga vegetativamente o por injerto para conservar sus mejores características. Los frutos son drupas carnosas de forma oval y base redonda, regularmente de tamaño grande que miden entre 10.5 a 13 cm de largo, con un peso que varía de 270 a 430 gramos y 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. En México, el mango ‘Haden’ junto con el ‘Tommy Atkins’, ocupan las mayores superficies dentro de las variedades comerciales. ‘Haden’ ocupa el segundo lugar en volúmenes de exportación de mango (22%), antecedida 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).

6.1.2. Características de las flores

Las flores están dispuestas en panículas que miden entre 10 y 60 cm, en cada panícula se producen cientos de flores hermafroditas o únicamente masculinas, estas últimas son más abundantes (Juliano y Cuevas, 1933; Singh, 1968). Solamente pocas de las flores hermafroditas llegan a convertirse en frutos (Torres, 1931). Las condiciones ambientales y fisiológicas influyen sobre el número de flores masculinas y hermafroditas por panícula (Popenoe, 1917, Simao y Maranhao, 1959; Majumed y Mukherjee 1961; Singh *et al*, 1966; Anderson 1982; Jiron y Hedstrom, 1985) debido a una modificación en la proporción de fitorreguladores (Maiti, 1973, Kuriant e Iyer, 1993).

Las flores miden de 5 a 10 mm en diámetro, presentan cinco pétalos, raramente pueden presentar 4 ó 7 sépalos o pétalos (Kosterman y Bompard, 1993). Los pétalos son pubescentes de color cremoso con líneas amarillas y cambian a un tono rosado. Los sépalos son ovados muy pubescentes. En las las anteras de los estambres se produce el polen, los estambres son cinco en número, pero solamente el que se encuentra en una

posición opuesta al estilo es funcional, mientras que los otros degeneran; en algunos casos, uno o más de los estaminodios pueden llegar a producir granos de polen. En las flores masculinas el carpelo o pistilo no se desarrolla. La parte femenina es el ovario, de forma globosa, unilocular, con un solo óvulo y el estilo lateral. El grano de polen fecunda al óvulo y da comienzo al desarrollo del embrión y a la formación de la semilla (Juliano y Cuevas, 1933; Ponce de León, 1997; Mukherjee, 1997; Barbosa, *et al.*, 1999a; García-Ireta, *et al.*, 1999; Galán, 1999).

6.1.3. El pericarpo

Después de la fertilización, los estambres, los sépalos y los pétalos se secan y caen. Sólo permanece el pistilo y el disco nectarial (Juliano y Cuevas, 1933; Barbosa, *et al.*, 1999a). El período de desarrollo del mango, desde que se fecunda la flor hasta la cosecha de los frutos es de aproximadamente 100 a 115 días, algunas variedades pueden alcanzar un tamaño definitivo en siete semanas y madurar lo suficiente para ser cosechados entre las 12 a 13 semanas (Chandler, 1966).

El desarrollo del fruto se inicia inducido por la acción de fitorreguladores (auxinas, giberelinas y citocininas) que se producen durante el desarrollo del embrión. Dichos metabolitos promueven el crecimiento del ovario que consiste en la multiplicación, extensión y diferenciación de las células que lo constituyen. La diferenciación da lugar a la cáscara (exocarpo), la pulpa (mesocarpo) y el hueso (endocarpo) (Bósquez-Molina *et al.*, 1996; Ponce de León, 1997).

En el fruto están presentes clorofilas, carotenoides, antocianinas y xantofilas (Mukherjee, 1997). La clorofila, responsable del color verde desaparece durante la maduración (Lakshminrayana, 1980). El color del fruto en la maduración depende del genotipo, por ejemplo, en la variedad ‘Manila’ el color es amarillo y la variedad ‘Haden’ presenta tonos amarillos con chapeo rojizo por acumulación de pigmentos (Lakshminarayana, 1980; Ponce de León, 1997).

El crecimiento del fruto termina cuando por un lado, las células de los tejidos dejan de multiplicarse y de expandirse, momento en el que el fruto alcanza su tamaño máximo y por otro, cuando el fruto y la semilla son capaces de mantenerse con las sustancias de reserva acumuladas en su interior y que no necesitan más de un flujo continuo de nutrientes que provienen de la planta madre. La independencia funcional que marca el fin de la etapa de crecimiento no implica la separación física inmediata entre el fruto y la planta madre. Esta independencia funcional hace posible que se puedan cosechar los frutos en ese momento sin poner en riesgo el buen desempeño de la siguiente fase llamada de maduración la cual se lleva a cabo con las reservas previamente acumuladas en el fruto (Ponce de León, 1997).

La etapa de maduración puede llevarse a cabo en frutos en el árbol o en frutos cosechados. La maduración consiste en una serie de cambios bioquímicos que otorgan al mismo los atributos que lo hacen comestible (Roth, 1977; Ponce de León, 1997).

6.1.4. La semilla del mango

La semilla del mango es oblonga, ovoide y alargada, se encuentra recubierta por un endocarpo fibroso y por una membrana papirácea, posee una testa delgada de color café oscuro en la madurez (Juliano y Cuevas, 1933; Mukherjee, 1997; Galán, 1999).

La semilla del mango es recalcitrante y solo permanece viable unos pocos días o semanas en almacenamiento a temperatura ambiente (Parisot, 1988).

El óvulo del fruto del mango es de tipo anátropo, el cual se caracteriza por tener nucela recta, la cálaza alejada del micrópilo y una rafe bien desarrollada (Espinosa-Osornio y Engleman, 1998).

El desarrollo de la semilla comienza con el proceso de doble fecundación del óvulo anátropo, el cual lleva a la formación del embrión y el endospermo.

El eje embrionario y los cotiledones se forman durante el primer tercio de la embriogénesis, al igual que el endospermo. Los subsecuentes eventos incluyen crecimiento y diferenciación celular. De acuerdo con Juliano y Cuevas (1933) y Chaudhury y col. (2001), después de la fertilización del cigoto, éste presenta división celular asimétrica que da lugar a una célula apical y una basal. La célula apical más pequeña da lugar a la mayor parte del embrión, mientras que la célula basal origina el suspensor y la radícula. En el caso del mango el embrión puede ser resultado de la autofecundación o de la fecundación cruzada (Ponce de León, 1997). Los granos de polen germinan entre 1 a 2 horas tras su adhesión al estigma y los tubos polínicos crecen a través del estilo hasta alcanzar el óvulo.

El óvulo es el megasporangio (nucela) rodeado de los tegumentos contiene al saco embrionario (megagametofito), que en la madurez presenta tres antípodas, dos sinérgidas, la ovocélula y la célula central binucleada (Fig. 1a), en los últimos estadios de desarrollo del óvulo los núcleos de la célula central pueden fusionarse formando un núcleo diploide. Las dos células espermáticas contenidas en el extremo del tubo polínico se vierten en el saco embrionario donde se lleva a cabo la doble fecundación fusionándose los núcleos de las células espermáticas con las de la célula gamética u ovocélula que originará al cigoto ($2n$), y la célula central, que dará origen al endospermo ($3n$) (Espinosa-Osornio y Engleman, 1998; Galán, 1999) (Fig. 1b y 1c). Las sinérgidas y las antípodas se degradan durante las primeras fases del desarrollo y simultáneamente con su desaparición el saco embrionario se agranda y una porción se alarga dirigiéndose hacia el micrópilo, en este momento comienza a desarrollarse el endospermo, en cambio el cigoto no se divide inmediatamente después de la fecundación, permanece sin dividirse incluso después de la formación del endospermo (Juliano y Cuevas, 1933).

El desarrollo del endospermo atraviesa por cuatro fases: nuclear o sincicial (Fig. 1d), celularización, diferenciación y muerte. Las sucesivas divisiones de los núcleos ocurren sin citocinesis, solo hay cariocinesis, lo que genera un sincitio multinucleado. El cigoto, inicia la multiplicación, dividiéndose transversalmente para formar cuatro células embrionarias, que por mitosis dan lugar al embrión globular (Fig. 1d) y más tarde al embrión acorazonado, en el cual las dos protuberancias corresponden a los primordios de los

cotiledones (Fig. 1e). Finalmente, cuando el embrión madura, queda constituido por un eje epicótilo-radicular que está limitado en los extremos por dos meristemas: el meristemo apical del vástago y el meristemo apical de la radícula y dos cotiledones (Espinosa-Osornio y Engleman, 1998; Chaudhury, et al., 2001).

Las semillas de los mangos de la variedad ‘Haden’ son de tipo monoembriónico, contienen un solo embrión sexual o cigótico. En algunos casos el cigoto parece estar degradado y su membrana desorganizada. No se divide y por lo tanto, no se produce embrión. Si no hay embrión o éste presenta trastornos en su desarrollo los fitorreguladores no se producen o se producen en proporción inadecuada, el riesgo es que el ovario se marchite con el resto de la flor o se produzca un fruto que no llegue a término (Juliano y Cuevas 1933; Ponce de León, 1997).

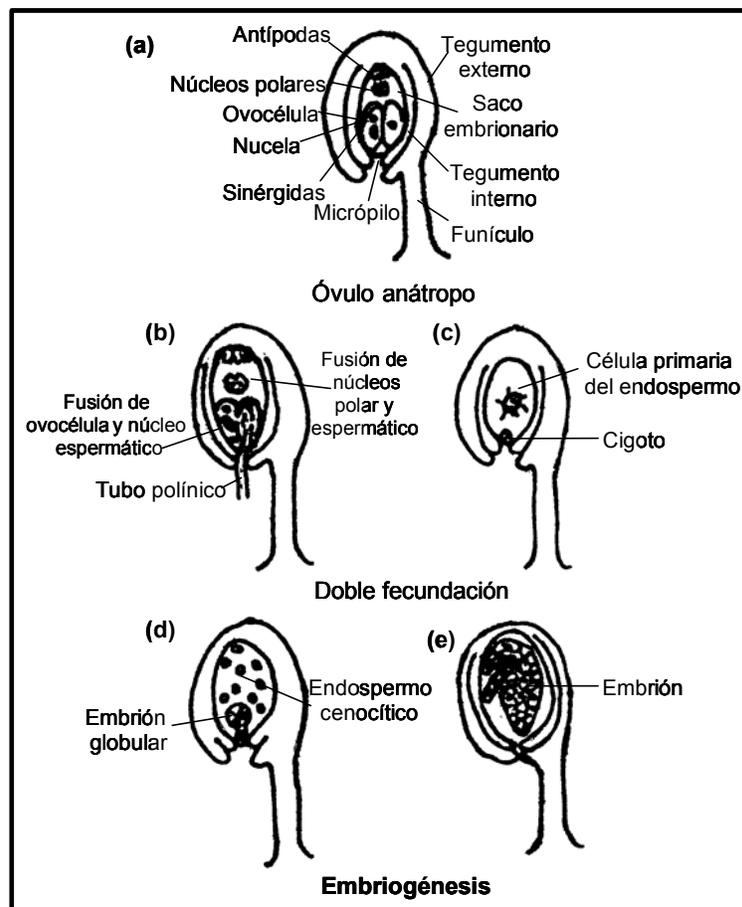


Fig. 1. Fases de la embriogénesis, esquema modificado de Chaudhury, 2001 y Espinosa-Osornio y Engleman, 1998.

6.2. OBJETIVO

Caracterizar morfohistológicamente a flores, semillas y frutos en diferentes estados de desarrollo de mango variedad ‘Haden’.

6.3. MATERIALES Y MÉTODOS

6.3.1. Sitio de colecta

Flores en antesis, frutos y semillas de mango de la variedad ‘Haden’ en diferentes estados de desarrollo se colectaron durante los meses de abril a agosto de los años 2001 a 2003 de la Huerta La Pedregosa en El Rosario, Sinaloa.

6.3.2. Material colectado

Los frutos utilizados para la investigación de desarrollo del mango fueron clasificados en siete grupos: etapa I: frutos canica (0.5-1.5 cm), etapa II: frutos amarrados (1.6-3.6 cm), etapa III: frutos en desarrollo (3.7-5.4 cm), etapa IV: frutos previo sazón (5.5 -10 cm), etapa V: frutos sazón (10 a 12 cm), etapa VI: frutos maduros (12-13 cm) y etapa VII: frutos senescentes (12-13 cm). SE utilizaron 9 frutos de cada estadio. Muestras de tejido: exocarpo, mesocarpo, endocarpo y semilla fueron fijados en FAA en el campo y en el laboratorio de Ecofisiología de la UAM-I.

6.3.3. Parámetros de calidad

Se determinaron características de calidad en frutos maduros. Los parámetros evaluados fueron:

a) Firmeza, que es una medida de la resistencia que ofrece el fruto a una fuerza de penetración, expresada en Kg-f, se midió con un penetrómetro (Mc Cormick, Cía.

EFFEGY, USA), en los hombros (parte más ancha del fruto) del mango eliminando previamente la cáscara de ambos hombros.

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

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

d) Peso y tamaño, se determinaron al arribo de los frutos al laboratorio de Ecofisiología de la UAM –Iztapalapa.

6.3.4. Parámetros histológicos

Se caracterizaron la disposición de los tejidos, forma, tipo, tamaños celulares y presencia de material ergástico en los tejidos epidérmico, parenquimático y nectarial de los verticilos florales y estados de desarrollo del exocarpo, mesocarpo y el endocarpo de frutos de mango. Se realizaron observaciones y micrografías en microscopía óptica y electrónica de barrido.

6.3.5. Preparación de muestras para microscopía óptica

Se tomaron fracciones de tejido de 0.5 cm², y se fijaron en FAA (Apéndice 1) durante algunas semanas, posteriormente se deshidrataron con una serie de alcoholes ter-butílico, etílico y agua destilada (Apéndice 2); se infiltraron en parafina refinada para histología; los cortes se incluyeron en moldes de papel aluminio o papel bond con parafina fundida. Una vez que las muestras se incluyeron en los moldes se dejó solidificar la parafina a temperatura ambiente y se desmoldaron para montarlos en soportes de metal, con la ayuda de una navaja y de un microscopio estereoscópico se formaron pirámides, a manera de que el corte quedará en el centro de la misma.

El material se cortó con un micrótopo rotatorio (Spencer, American Optical Company. Mod. 820), se obtuvieron cortes seriados de 12 micrómetros de grosor, los cuales se colocaron en baño de flotación con agua destilada y grenetina a 52°C para extenderlos y adherirlos a los portaobjetos, los cortes se colocaron dentro de una estufa a no más de 50°C para adherirlos completamente y eliminar burbujas durante unas horas o hasta 2 días. Los cortes se desparafinaron e hidrataron, posteriormente se tiñeron con la técnica de contraste safranina-verde fijo (Apéndice 3) o rojo de aceite para la observación de ceras en cutícula. Los cortes se montaron con resina sintética o jalea de glicerina (Apéndice 4) en el caso de ceras; se dejaron secar de 2 a 3 días para ser observados en un microscopio compuesto (Carl Zeiss Axiolab) (Gray, 1964).

6.3.6. Preparación de muestras para microscopía de barrido

Se tomaron fracciones de 0.5 cm² de material, los cortes se fijaron en glutaraldehído al 6% durante 24 h (Apéndice 5), se lavaron de 3 a 4 veces con buffer de fosfatos 0.02 M durante 5 min cada uno, se hizo una doble fijación con tetraóxido de osmio al 2% (Apéndice 6) durante 2 h, el material se volvió a lavar con amortiguador de fosfatos 3 veces y se deshidrató con soluciones porcentuales de alcohol (de 30 a 100%) durante 5 min en cada cambio. La deshidratación de las muestras culminó con la desecación al punto crítico utilizando para ello el equipo denominado desecador al punto crítico (SAMDR1-780B. Tousimis) con CO₂ para lo cual las muestras se colocaron en unas cápsulas microporosas embebidas en alcohol. Las muestras se montaron en soportes de aluminio y se recubrieron con una capa de carbón y otra de oro de 500 Å de grosor en un evaporador de carbono y recubridor de oro (BAL-TEC SDC 050) (Bozzola, *et al*, 1991); se observaron en un microscopio electrónico de barrido (Zeiss DSM 940 A Digital Scanning Microscope) y se obtuvo material micrográfico.

6.4. RESULTADOS

6.4.1. *Parámetros de calidad de frutos var. 'Haden'*

Los parámetros de calidad se determinaron en frutos maduros. Los frutos de la variedad 'Haden' midieron entre 10 y 12 cm de longitud, con un peso en promedio de 305 g. El valor medio de la firmeza fue de 14.7 kg-f y los sólidos solubles totales resultaron en 7.3 °Brix. Los frutos maduran en color amarillo con chapeo rojo intenso. En el cuadro 4 se presentan los promedios del peso fresco total de los frutos y el porcentaje de peso correspondiente a cada tejido.

Cuadro 4. Peso de los diferentes tejidos en un lote de 100 frutos maduros var. 'Haden'

Tejido	Peso (g)	Porcentaje (%)
Exocarpo	100	34.4
Mesocarpo	136	48.4
Endocarpo	36	9.5
Semilla	31	7.6
Fruto completo	303	100

La multiplicación celular y la elongación de los diferentes tejidos del fruto incrementa el peso en el fruto maduro. En la variedad 'Haden', el exocarpo es responsable de aproximadamente el 50% del peso total del fruto, el mesocarpo del 34%, el endocarpo del 9.5% y la semilla del 7.6%. Mientras que en las primeras fases la semilla ocupa más del 40% del fruto.

6.4.2. *Flor y verticilos florales*

Las flores de mango se presentan en panículas, que pueden llegar a medir hasta 60 cm. El número de flores por panícula es variable (mínimo entre 70 y 120 flores) (Fig. 2a).

Las flores de la variedad 'Haden' son pequeñas, de aproximadamente 5 mm, de color amarillo crema con líneas amarillas y rojas (Fig. 2b). En ocasiones se presentan cuatro pétalos y cuatro sépalos pubescentes (Fig. 2d), pero por lo general, son pentámeras. En una misma panícula pueden presentarse flores hermafroditas y masculinas, ambas, poseen un estambre fértil, con un filamento de color blanco, una antera rosada y cuatro estaminoides. En las flores femeninas el ovario es súpero y de inserción lateral (Fig. 2b), en las flores masculinas el ovario es inexistente o extremadamente reducido (Fig. 2c).

Los verticilos florales no fértiles tienen como función contribuir al éxito de la polinización, y presentan características que atraen a los polinizadores como colores, aromas, néctar y gomas. Algunos de ellos una vez cumplida su función como los sépalos, pétalos y estambres después de la fecundación entran en senescencia y abscisión. Los pétalos cubren los órganos internos de la flor hasta la antesis.

El filamento del estambre mide entre 1.5 a 1.65 mm (Fig. 3d), las anteras contienen los granos de polen que miden entre 22 y 23 μm en las variedades de estudio (Fig. 3b).

La epidermis de los sépalos de las flores de mango tiene células isodiamétricas, presenta además de estomas, diversos derivados epidérmicos como: tricomas no glandulares en la superficie abaxial y glandulares en la superficie adaxial (Fig. 3a). Los tejidos vasculares se presentan en haces poco numerosos (cuadro 5). Las células del parénquima son clorofílicas.

Las células epidérmicas de los pétalos son de tamaños diversos, siendo mayores las de la superficie adaxial (Cuadro 5), es notable la presencia de tejido nectarial (Fig. 3d) en la base de los pétalos.

En el receptáculo es notable la presencia de canales secretores de gran calibre que están frecuentemente asociados al tejido vascular: xilema y floema (Fig. 3d). En el parénquima se aprecian abundantes cristales de oxalato de calcio "drusas".

Los tejidos de xilema y floema se distribuyen abundantemente en numerosos haces colocados al centro y en la periferia del ovario para garantizar el aporte eficiente de nutrientes, dichos tejidos provienen del pedicelo de la flor. Se observa la presencia de canales secretores de látex con frecuencia asociados a los tejidos vasculares (Fig. 3d). La epidermis externa del ovario está constituida por células en empalizada (Fig. 3c). Durante el proceso de desarrollo estas células se multiplican dando lugar a células de distinto tamaño, lo que confiere la topografía específica del exocarpo de mango. Estas células en el fruto maduro producen una gruesa cutícula, pero durante esta etapa de desarrollo es bastante delgada en ambas variedades. Las células de parénquima más cercanas a la epidermis son clorofílicas y después de la fecundación presentan un engrosamiento en las paredes. Las células de la epidermis externa (exocarpo) son de tamaño similar que las de la epidermis interna (endocarpo) (Gráf. 5).

Los tamaños celulares de los tejidos estudiados en la flor: exocarpo, mesocarpo y endocarpo, son muy similares en las dos variedades estudiadas; así como los tamaños celulares de la epidermis y parénquima de los verticilos florales: sépalos, pétalos, estambres y receptáculo (cuadro 5).

Cuadro 5. Parámetros cualitativos y cuantitativos de los verticilos florales

VERTICILO FLORAL	EPIDERMIS		TEJIDO VASCULAR	PARÉNQUIMA	
	Tamaños celulares (µm)			Tamaños celulares (µm)	
	Largo	Ancho	Derivados epidérmicos	Largo	Ancho
Material ergástico					
S E P A L O S	21.5-35		Estomas, Tricomas glandulares, Tricomas no glandulares	25.5-38-25-35	
P E T A L O S	21.25- 25.75	11-15	Estomas, Tricomas glandulares, Pigmentos	14.37-22.5	
ESTAMBRE	12.5	16.5- 25		19.5- 37.5	10- 17.5
RECEPTACULO	10-16.25		Estomas	38.25-55	
			Xilema y floema en haces vasculares, más de 6 Canales secretorios		Drusas, Tejido nectarial 7.7-17.5µm

Pies de figuras 2 y 3.

Figura 2. **a)** Inflorescencias en las ramas superiores de un árbol de mango var. 'Haden'. Barra = 10 cm; **b)** Flor hermafrodita var. 'Haden'. Barra = 1 mm; **c)** Flor hermafrodita var. 'Manila' donde se observa el óvulo anátropo y parte del estilo de inserción lateral. Barra = 300 μm ; **d)** Flor hermafrodita var. 'Manila', se observan 3 pétalos y dos sépalos pubescentes. Barra = 1 mm; **e)** Flor masculina var. 'Haden' en donde se han separado los sépalos y los pétalos. Barra = 2 mm; **f)** Extremo de un sépalo donde se observan tricomas glandulares. Barra = 200 μm . **pa** (panícula), **p** (pétalo), **o** (ovario), **fb** (flores botón), **e** (estilo), **oa** (óvulo anátropo), **an** (antera), **tn** (tejido nectarial), **se** (sépalo), **es** (esambre), **est** (estaminodio), **tr** (tricoma).

Figura 3. **a)** Corte de una flor cerrada donde se observan fragmentos de sépalos con tricomas glandulares. Barra = 25 μm ; **b)** Corte de antera donde se observan los granos de polen Barra = 25 μm ; **c)** Corte transversal del ovario de una flor donde se observan el exocarpo con una epidermis en empalizada, el mesocarpo con células parenquimáticas isodiamétricas y el endocarpo donde se observa la epidermis interna. Barra = 25 μm ; **d)** Flor hermafrodita var. 'Haden', solo se observan 2 sépalos, el resto de los verticilos infértiles se desprendieron. Barra = 0.2 mm; **tr** (tricomas), **gp** (granos de polen), **ep** (epidermis), **end** (endotecio), **epx** (epidermis externa), **pa** (parénquima), **ep** (epidermis interna), **an** (antera), **f** (filamento del estambre), **tn** (tejido nectarial), **se** (sépalo), **re** (receptáculo), **cs** (canales secretores), **o** (ovario).

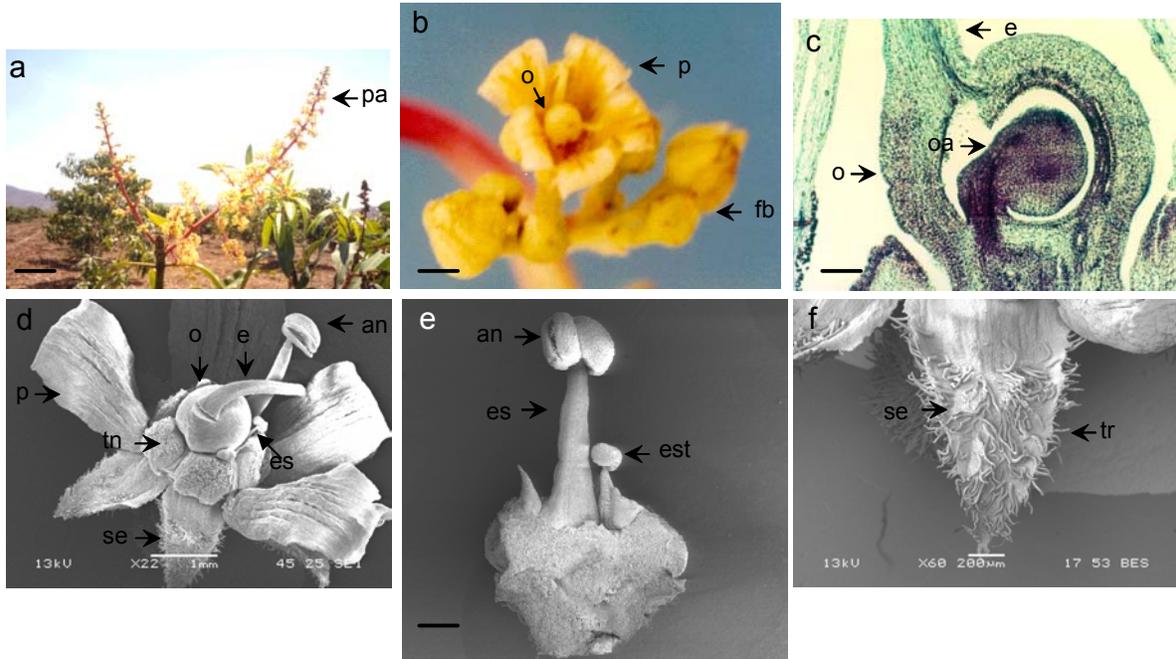


Fig. 2. a) Panícula de mango; b) Flor hermafrodita, var. 'Haden'; c) Óvulo anátropo; d) Flor hermafrodita var. 'Manila'; e) Flor masculina var. 'Haden'; f) Acercamiento de sépalo pubescente.

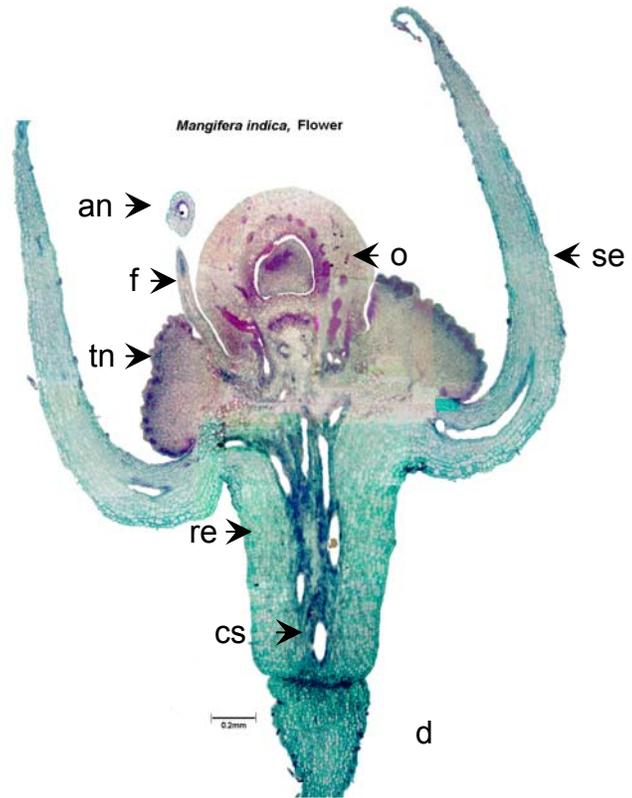
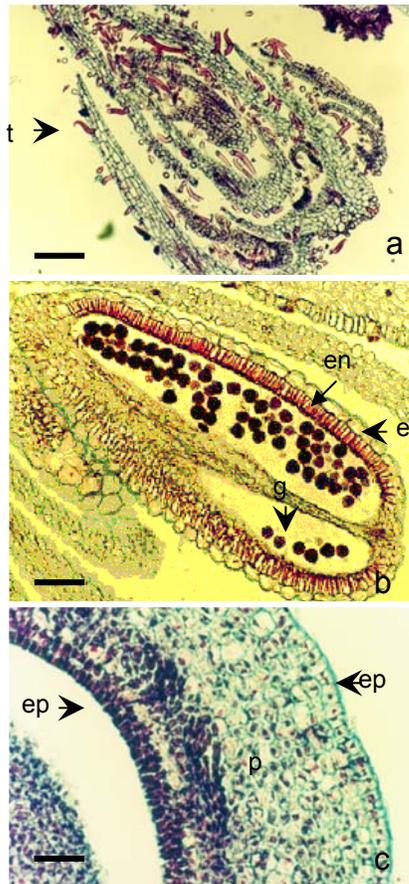


Fig. 3 a) Sépalos con tricomas de flor var. 'Haden'; b) antera con granos de polen; c) Exocarpo, mesocarpo y endocarpo del ovario de una flor en antesis; d) Flor hermafrodita, var. 'Haden'. Barra = 25 μ m en a, b, y c

6.4.3. Desarrollo del fruto

Después de la fecundación, los fitoreguladores inducen la transformación del ovario en fruto, estos cambios ocurren en aproximadamente 115 a 120 días, durante los cuales la drupa del mango puede alcanzar hasta 13 cm de longitud en la var. 'Haden' (Fig. 4a), en este período se diferencian los siguientes tejidos: el exocarpo o cáscara, el mesocarpo o pulpa y el endocarpo o hueso (Fig. 4a y 4b).

Factores ambientales y genéticos, entre otros, pueden hacer que se presenten diferencias en el desarrollo de los frutos; sin embargo, a continuación se propone un patrón general de desarrollo en frutos de mango de la variedad 'Haden'. Para este estudio, los frutos colectados se clasificaron en siete etapas, el criterio principal para distinguir los siete grupos fueron los cambios histológicos significativos observados en el pericarpo.

Etapa I: Frutos canica (0.5 – 1.5 cm)

En la primera etapa se observa la abscisión de los verticilos florales (pétalos, estambres, estaminoides) y la deshidratación y pérdida del estilo y del estigma. Las células de todos los tejidos del ovario fecundado inician una multiplicación celular sostenida, la epidermis externa presenta divisiones anticlinales formando una capa en empalizada (Fig. 5a) que crece continuamente, como también lo observó Roth (1977). La cutícula de la epidermis externa, en este estadio es una capa muy delgada de cutina y ceras que está presente desde el ovario pero se engrosa durante el desarrollo del fruto. La epidermis es interrumpida por abundantes lenticelas y estomas, estos últimos son raros. Las lenticelas tienen paredes suberizadas y permanecen abiertas para permitir el intercambio gaseoso entre las células subepidérmicas y la atmósfera (Fig. 5a; Fig. 9; Gráf. 5).

El mesocarpo presenta células parenquimáticas isodiamétricas con paredes muy delgadas (Fig. 5b), comienzan a formarse los canales secretores, asociados a los haces vasculares, que rodean la semilla.

La epidermis interna, que forma parte del endocarpo y que rodea la semilla inicia divisiones periclinales y comienza a diferenciarse de manera discontinua en dos capas (Fig. 5c). La cutícula de la epidermis del endocarpo es muy delgada en la etapa I (Fig. 8a).

Etapla II: Frutos amarrados (1.6-3.6 cm)

Cuando el fruto alcanza aproximadamente los 3 cm de largo, ocurren cambios significativos fundamentalmente en el exocarpo; la multiplicación y la expansión anticlinal ocurren en células hijas, éstas cambian en tamaño (Gráf. 5) y forma, el resultado es un patrón de ondulación por crecimiento disparejo lo que modifica a la epidermis en empalizada, donde las crestas corresponden a grandes células y los valles a células pequeñas, los grupos de células que constituyen este patrón son de 6 a 8. La cutícula de la epidermis externa aumenta considerablemente su grosor con respecto a la etapa I (Gráf. 5, Fig. 5d). Por debajo de la epidermis, cuatro a siete capas de células permanecen más pequeñas e isodiamétricas (Fig. 5d).

En el mesocarpo algunas células comienzan a elongarse (Gráf. 5), mientras que otras permanecen isodiamétricas (Fig. 5e). Estos cambios son acompañados por la formación de espacios intercelulares. Las células del endocarpo se dividen y multiplican de manera acelerada; se observan de dos a tres capas de células epidérmicas (Fig. 5f), la más externa con células en empalizada, y la capa o capas más internas, ligeramente alargadas longitudinalmente. Las células que subyacen la epidermis interna son muy similares en tamaño a las que están por debajo de la epidermis externa (Fig. 5f; Gráf. 5). Al igual que en el exocarpo, entre seis y ocho capas de células por debajo de la epidermis interna permanecen más pequeñas e isodiamétricas. La cutícula de la epidermis interna permanece delgada (Fig. 8b) y con una superficie muy lisa. La expansión y multiplicación de células en el mesocarpo y endocarpo es intensa, por lo que se observa que los canales secretores se desplazan hacia la epidermis externa.

Etapa III: Frutos an desarrollo (3.7-5.4 cm)

Las células de la epidermis externa completan el desarrollo conforme a lo descrito en la etapa II. La acumulación de cutícula es mucho más notoria (Gráf. 5), imágenes en microscopía electrónica de barrido muestran un depósito de cutícula característica presente en todos los subsecuentes estados de desarrollo hasta la maduración (Fig. 7a y 9b). El grosor de las paredes celulares de todos los tejidos aumenta. Durante esta etapa las células de parénquima que constituyen la pulpa casi duplican su tamaño respecto a la etapa II (Fig. 5h). Las células más próximas al endocarpo se elongan para formar fibras (Fig. 5i).

Etapa IV: Frutos previo sazón (5.5 -10 cm)

En el fruto se pueden distinguir fácilmente los tres tipos de tejidos: exocarpo, mesocarpo y endocarpo. Las células epidérmicas comienzan a perder citoplasma y su disposición ordenada. Hay de cuatro a seis capas de células hipodérmicas isodiamétricas (Fig. 7b). Comienza a degradarse la clorofila y se presenta la síntesis de xantofilas, carotenoides y antocianinas. La cutícula de la epidermis externa alcanza su grosor máximo y arreglo característico (Fig. 6a; 9c; Gráf. 5). El mesocarpo es una masa homogénea de células grandes, oblongas, elongadas o isodiamétricas, con numerosos espacios intercelulares. Hay gran acumulación de granos de almidón (Fig. 6b y 7b). Dentro de una misma célula puede haber granos de almidón y cristales de oxalato de calcio. Los canales secretores alcanzan las mayores dimensiones.

En el endocarpo, la elongación de células para la formación de fibras es muy intensa (Fig. 6c), las fibras presentan lignificación de las paredes. Las paredes celulares de la epidermis del endocarpo, que están en contacto con la cavidad que contiene la semilla comienzan a presentar una modificación, que consiste en lignificación y cambio en la forma (Fig. 8d y 8f).

Etapa V: Frutos sazón (entre 10 y 12 cm)

Esta etapa se denomina en fisiología postcosecha sazón. Las células de la epidermis externa alcanzan su tamaño máximo (Gráfica 4), la epidermis es irregular, con una cutícula de ceras epicuticulares distribuidas heterogéneamente y que disminuye su tamaño con respecto a la etapa IV, dándole a la superficie del pericarpo una apariencia reticulada y con proyecciones (Fig. 9d). Se observa la presencia de lenticelas cuyas células presentan paredes suberizadas y que interrumpen el arreglo de la epidermis (Fig. 6d). En el exocarpo, se aprecian cristales de oxalato de calcio: drusas y cristales prismáticos y cuadrados.

Las células hipodérmicas (4 a 8 estratos) son más pequeñas que el resto (Gráf. 5), son oblongas y tangencialmente comprimidas, éstas células mantienen sus paredes uniformemente engrosadas, característica que le proporciona mayor resistencia al fruto. El mesocarpo ocupa la mayor parte del pericarpo, sus células son más grandes, isodiamétricas o algo elongadas con paredes más delgadas que las células hipodérmicas; se encuentran numerosos espacios intercelulares entre ellas (Fig. 6e). Las células del mesocarpo continúan expandiéndose hasta la última etapa de desarrollo (Gráfica 4). El mesocarpo es atravesado por pequeños haces vasculares, que de acuerdo con Juliano y Cuevas (1933), irrigan el endocarpo; los haces están asociados casi siempre con canales secretores, los elementos de vasos del xilema presentan paredes secundarias helicoidales; además, incluyen sustancias ergásticas como polifenoles (fenoles condensados, taninos y epicatequinas (Sunday, 2000), que se localizan tanto en las células externas del mesocarpo como en la epidermis e hipodermis, que con la tinción safranina-verde rápido se tiñen de colores morado y rojo (Fig. 6e y 7c); estos pueden ser de apariencia condensada y granular.

El endocarpo o capa dura presenta fibras engrosadas formando un retículo fibroso (Fig. 6f). La vascularización asociada a las mismas está constituida por numerosos haces de floema y xilema bien definidos. El citoplasma de las fibras desaparece en el curso del proceso del endurecimiento quedando tan solo las paredes.

Etapa VI: Frutos maduros (12-13 cm)

Durante la etapa VI el fruto entra en el proceso de maduración, hay degradación de clorofila y síntesis de pigmentos xantofilas, carotenoides y antocianinas, lo que provoca que el citoplasma de las células epidérmicas, hipodérmicas y parenquimáticas más externa se tiñan de rojo, probablemente este color corresponde a pigmentos antociánicos y xantofilas, que dan el chapeo al fruto. En las células hipodérmicas se acumulan polifenoles (taninos) (Fig. 6g).

Cuando el fruto madura, las células de la pulpa acumulan grandes cantidades de almidón (Fig. 6h y 7c), los granos de almidón se hidrolizan y se ocupan para la síntesis de azúcares solubles y disminuye la acidez. Comienza a degradarse la lámina media de las paredes celulares (Fig. 6h), lo que contribuye al ablandamiento y jugosidad. Se presentan finalmente cambios en el contenido celular (carbohidratos, ácidos orgánicos) y producción de compuestos volátiles y aromáticos, (Roth, 1977; Mukherjee, 1997; Ponce de León, 1997).

El endocarpo presenta una epidermis de células en empalizada con paredes lignificadas; por debajo de ésta se encuentran de dos a tres capas de células isodiamétricas, con las paredes lignificadas (Fig. 6i); más abajo se encuentran de cuatro a cinco capas de células ligeramente oblongas, este tejido es atravesado longitudinalmente por numerosos haces vasculares. La cutícula de la epidermis interna presenta ceras epicuticulares que se depositan de manera uniforme hasta los últimos estados de desarrollo (Fig. 6l).

Etapa VII: Frutos senescentes

Los cambios posteriores al momento en que el fruto alcanza la madurez y que tienden a la degradación de la cáscara y la pulpa (Fig. 7d) promoviendo la liberación del hueso (endocarpo) y la semillas conducen al fruto a la última etapa de desarrollo, denominada de senescencia. Los procesos de senescencia pueden acelerarse por la acción de

microorganismos que se desarrollan sobre los tejidos y contribuyen a la rápida degradación de los mismos.⁷

Conforme el fruto avanza hacia la senescencia, la cutícula se adelgaza y pierde continuidad; la epidermis se desorganiza y pierde contenido citoplasmático. Las células hipodérmicas se comprimen tangencialmente y sus paredes se degradan (Fig. 6j). Las paredes de las células del mesocarpo se degradan de forma muy conspicua y comienzan a fermentarse los azúcares solubles (Fig. 6k y 7d).

6.4.4. Desarrollo de la semilla

Las semillas, al igual que los frutos se dividieron en etapas de desarrollo para su estudio. En el fruto de mango el ovario unilocular y con un solo óvulo crece paralelamente a la formación de la semilla. Después de la fecundación el núcleo primario triploide del endospermo (Fig. 10a) migra hacia la porción media del saco embrionario y comienza una activa división. Los núcleos libres resultantes continúan dividiéndose para formar un endospermo de tipo nuclear (cenocítico o sincicial) (Fig. 10b y 10c). Divisiones periclinales llevan al proceso de citocinesis (formación de paredes) y celularización del endospermo (Fig. 10d). La celularización comienza en la región donde se desarrolla el embrión. La celularización coincide con el desarrollo de los cotiledones. El tejido del endospermo puede inicialmente llenar casi completamente el saco embrionario y después es absorbido por el embrión en desarrollo.

El embrión se diferencia morfológicamente cuando el fruto alcanza cuatro centímetros de longitud aproximadamente; en este momento, los cotiledones se aprecian perfectamente (Fig. 10e). Los núcleos del endospermo ya se encuentran celularizados y su proporción es menor con respecto a la cantidad de tejido cotiledonario. Las células de los cotiledones se expanden (Fig. 10f) hasta alcanzar su tamaño máximo y almacenan una abundante cantidad de reservas para la germinación, agotando casi por completo al endospermo. Tanto en los cotiledones, como en el endospermo las sustancias de reserva son proteínas, lípidos y polisacáridos. Entre las sustancias no proteicas que se almacenan en abundancia se

encuentra el almidón (Fig. 10g) que tiende a hacer menos visible la presencia de lípidos. El almidón se presenta en granos con hilos en el centro, los granos de almidón pueden estar libres cuando la semilla está madura. El tamaño de los cuerpos lipídicos es variable.

Conforme avanza el desarrollo las células de los tegumentos, que envuelven a la nucela, se expanden y diferencian, el tegumento externo, da origen a la testa (Fig. 11a, c, y e) y el tegumento interno al tegmen (Fig. 11b, d y f). El tegmen presenta células isodiamétricas o elongadas. Las células de la testa son elongadas y presentan taninos condensados al igual que las del tegmen cuando el embrión alcanza la madurez.

El tejido nucelar no es absorbido completamente por el endospermo ni por el embrión en desarrollo; una porción permanece a los lados del saco embrionario en forma de copa para formar una paucicálaza. El tejido vascular irriga toda la paucicálaza, la cual a su vez aporta nutrientes al saco embrionario.

El desarrollo de la semilla culmina con la entrada en quiescencia y coincide con la terminación del desarrollo del fruto, para su diseminación y germinación de la semilla (Fig. 11g y h) .

Pies de figuras 4, 5 y 6.

Figura 4. a) Frutos de mango maduro donde se muestran los tejidos estudiados: exocarpo o cáscara, mesocarpo o pulpa, endocarpo o hueso y la semilla. Barra = 1.7 cm; **b)** Micrografía de barrido de un corte de un fruto de la etapa IV, donde se observa el exocarpo con una gruesa cutícula y el mesocarpo con numerosos canales secretores. Barra = 75 μm . **epx** (epidermis externa), **cu** (cutícula), **ex** (exocarpo), **cs** (canales secretores), **me** (mesocarpo).

Figura 5. Primeras tres etapas de desarrollo de la variedad 'Haden', **a)** Corte de exocarpo en la etapa de desarrollo I, se observa la epidermis externa con células en empalizada y una cutícula muy delgada; **b)** Mesocarpo de fruto en la etapa de desarrollo I, se observan células parenquimáticas isodiamétricas; **c)** Endocarpo de un fruto en la etapa I, se observa la epidermis interna en empalizada y canales secretores asociados a haces vasculares; **d)** Exocarpo durante la etapa II, se observa modificación de la epidermis en un patrón de ondulación; **e)** Mesocarpo durante la etapa II; **f)** Endocarpo en la etapa de desarrollo II, se aprecia la epidermis en empalizada y le subyacen dos capas de células hipodérmicas, la cutícula interna se tiñe de verde; **g)** Exocarpo en la etapa III con una epidermis en ondas y cutícula engrosada; **h)** Mesocarpo en la etapa III, se observan células de parénquima isodiamétricas o algo alargadas; **i)** Endocarpo durante la tercera etapa de desarrollo, se observa la epidermis interna y dos capas de células hipodérmicas, se aprecia también la cutícula y algunas fibras asociadas a haces vasculares. La barra en las fotos equivale a 25 μm . **epx** (epidermis externa), **cu** (cutícula), **ex** (exocarpo), **cs** (canales secretores), **me** (mesocarpo), **epi** (epidermis interna), **cut** (cutícula interna), **ch** (células hipodérmicas), **fi** (fibras), **en** (endocarpo).

Figura 6. Etapas de desarrollo IV, V, VI y VII de la variedad 'Haden', **a)** Corte de exocarpo en la etapa de desarrollo IV (denominada previo desarrollo), se observa la epidermis externa en un patrón de ondas y la cutícula de grosor máximo durante el desarrollo, además células hidérmicas con acumulación de taninos que se tiñen de rojo con la tinción safranina-verde fijo; **b)** Mesocarpo de fruto en la etapa de desarrollo IV, se observan células parenquimáticas isodiamétricas; **c)** Endocarpo de un fruto en la etapa IV, se observa la elongación de fibras asociadas a haces vasculares; **d)** Exocarpo durante la etapa V, se observa la epidermis ondulada y las células hipodérmicas con contenidos teñidos de rojo (taninos), la cutícula se observa un poco más delgada con respecto a la etapa anterior; **e)** Mesocarpo durante la etapa V, se aprecian numerosos granos de almidón; **f)** Endocarpo en la etapa de desarrollo V, se observan las fibras completamente elongadas, formando un retículo fibroso; **g)** Exocarpo en la etapa VI con una epidermis en ondas y citoplasma con tinción roja o morada que pueden ser contenidos antocianínicos que proporcionan el chapeo rojo al fruto maduro; **h)** Mesocarpo en la etapa VI con granos de almidón; **i)** Endocarpo durante la sexta etapa de desarrollo, se observa la epidermis interna con paredes engrosadas; **j)** Exocarpo en la etapa VII, la cutícula se observa rota en algunos puntos, la epidermis ha perdido contenido citoplásmico y las células hipodérmicas se observan comprimidas; **k)** Mesocarpo con células parenquimáticas degradadas; **l)** Endocarpo, se aprecia la epidermis y la cutícula, teñida de rojo (tinción rojo de aceite). La barra en las fotos equivale a 25 μm . **epx** (epidermis externa), **cu** (cutícula), **ex** (exocarpo), **cs** (canales secretores), **al** (granos de almidón), **me** (mesocarpo), **epi** (epidermis interna), **cut** (cutícula interna), **ch** (células hipodérmicas), **fi** (fibras), **en** (endocarpo).

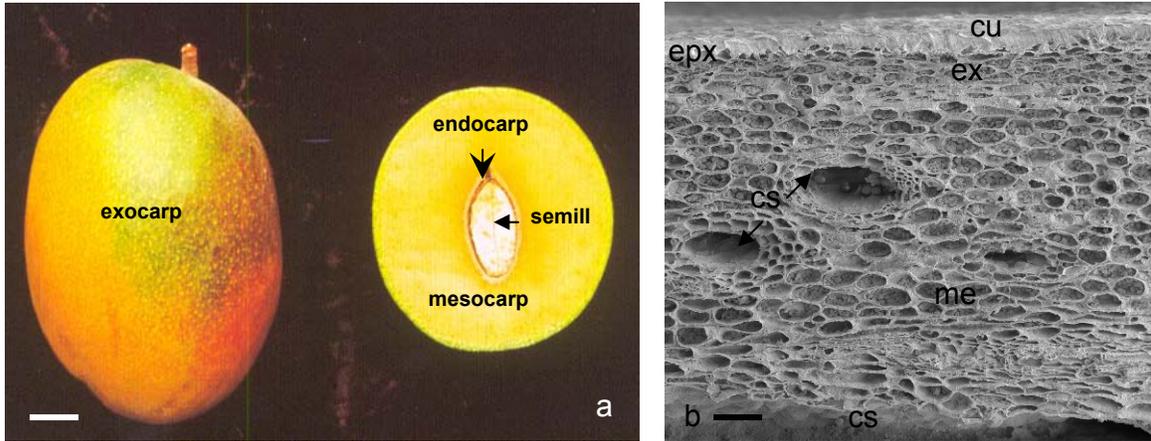


Fig. 4 a) Fruto de mango en etapa madura, exocarpio o cáscara, mesocarpio o pulpa, endocarpio o hueso y semilla;
b) Micrografía de barrido del exocarpio (ex) y mesocarpio (me) de mango en etapa IV, 150 x.

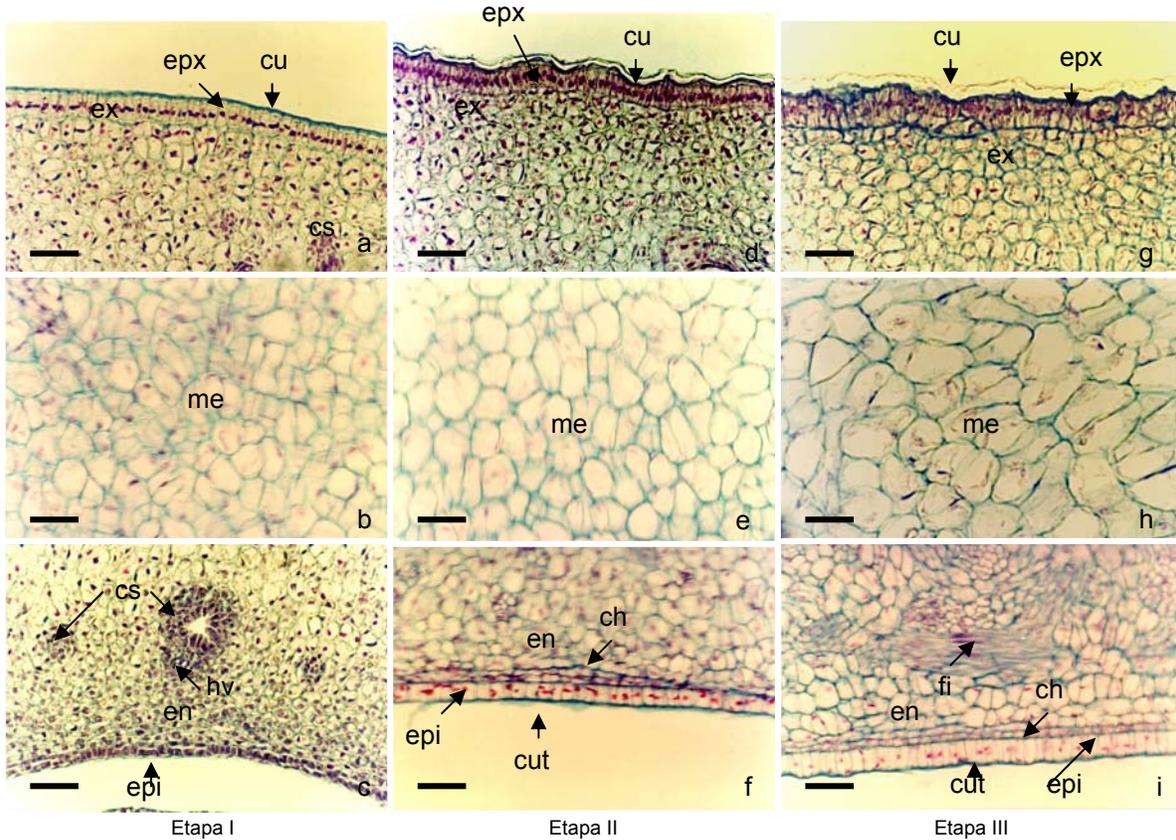


Fig. 5. Exocarpo (*ex*), mesocarpo (*me*) y endocarpo (*en*) de frutos var. 'Haden' durante las tres primeras etapas de desarrollo. Barra = 25μ

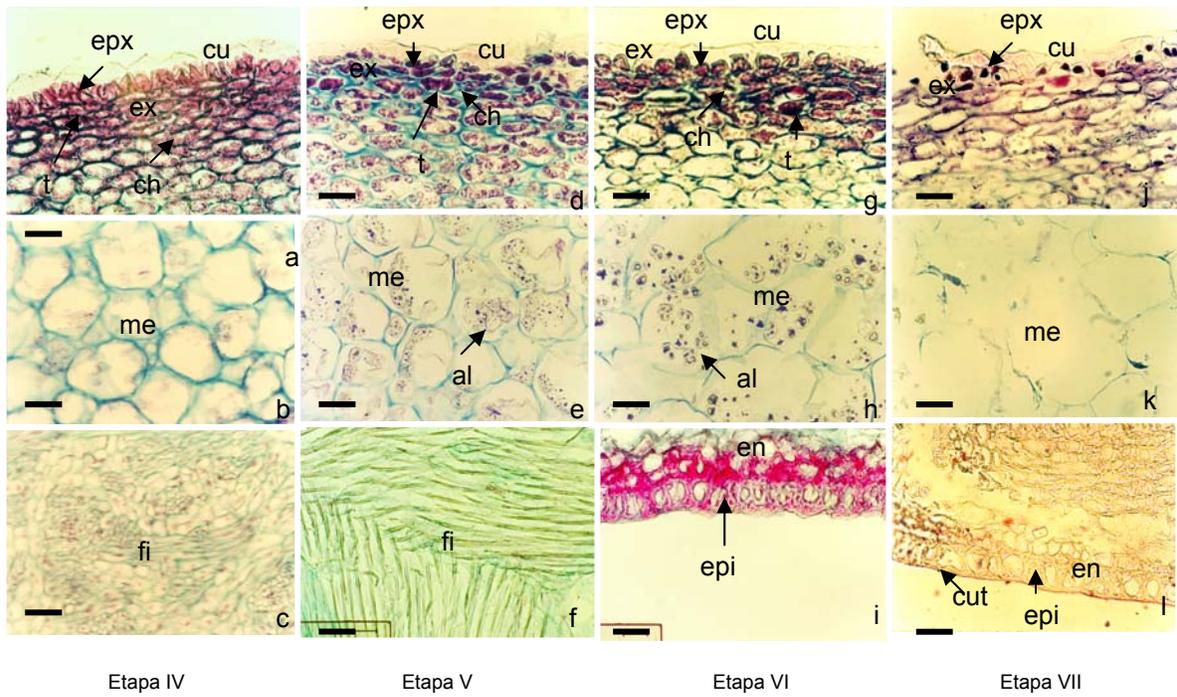


Fig. 6. Exocarpo (ex), mesocarpo (me) y endocarpo (en) de frutos de la var. 'Haden' durante las etapas IV, V, VI y VII.
Barra = 25μ

i

Pies de figuras 7, 8 y 9

Figura 7. Micrografías de barrido de diferentes etapas de desarrollo de frutos de la var. ‘Haden’. **a)** Exocarpo y mesocarpo durante la etapa II; **b)** Exocarpo y mesocarpo durante la etapa IV, se observan abundantes granos de almidón; **c)** Exocarpo y mesocarpo durante la etapa VI (fruto maduro) se observa la acumulación de taninos en las células hipodérmicas y la degradación de granos de almidón para la síntesis de azúcares solubles; **d)** Exocarpo y mesocarpo durante la etapa VII (fruto senescente), se observa la degradación de los tejidos. La barra en las imágenes equivale a 22.5 μm . **epx** (epidermis externa), **cu** (cutícula), **al** (granos de almidón), **pa** (parénquima), **ta** (taninos), **ch** (células hipodérmicas).

Figura 8. Cortes oblicuos de la cutícula de la epidermis interna de frutos var. ‘Haden’. **a)** Endocarpo durante la primera etapa de desarrollo, la cutícula es delgada; **b)** Endocarpo en la etapa II; **c)** Endocarpo durante la etapa III; **d)** Endocarpo durante la etapa IV, se observan células epidérmicas con paredes engrosadas **e)** Micrografía de barrido de la cutícula interna durante la etapa IV; **f)** Endocarpo durante la etapa IV, se observan células epidérmicas con paredes engrosadas (tinción rojo de aceite). La barra en a, b, c, d y f equivale a 25 μm , la barra en e equivale a 9 μm . **cut** (cutícula interna), **epi** (epidermis interna), **fi** (fibras asociadas a haces vasculares).

Figura 9. Micrografías de barrido de la cutícula externa de frutos de las variedades ‘Haden’ y ‘Manila’ en diferentes estados de desarrollo **a)** Cutícula de la var ‘Haden’ durante la primera etapa de desarrollo. Barra = 37 μm ; **b)** Cutícula de la var ‘Haden’ durante la etapa II. Barra = 37 μm ; **c)** Cutícula de la var ‘Haden’ durante la cuarta etapa de desarrollo. Barra= 45 μm ; **d)** Cutícula de la var ‘Haden’ durante la etapa V. Barra = 37 μm ; **e)** Cutícula de la var ‘Manila’ durante la tercera etapa de desarrollo. Barra = 45 μm ; **f)** Cutícula de la var ‘Manila’ durante la cuarta etapa de desarrollo. Barra = 45 μm ; **le** (lenticelas).

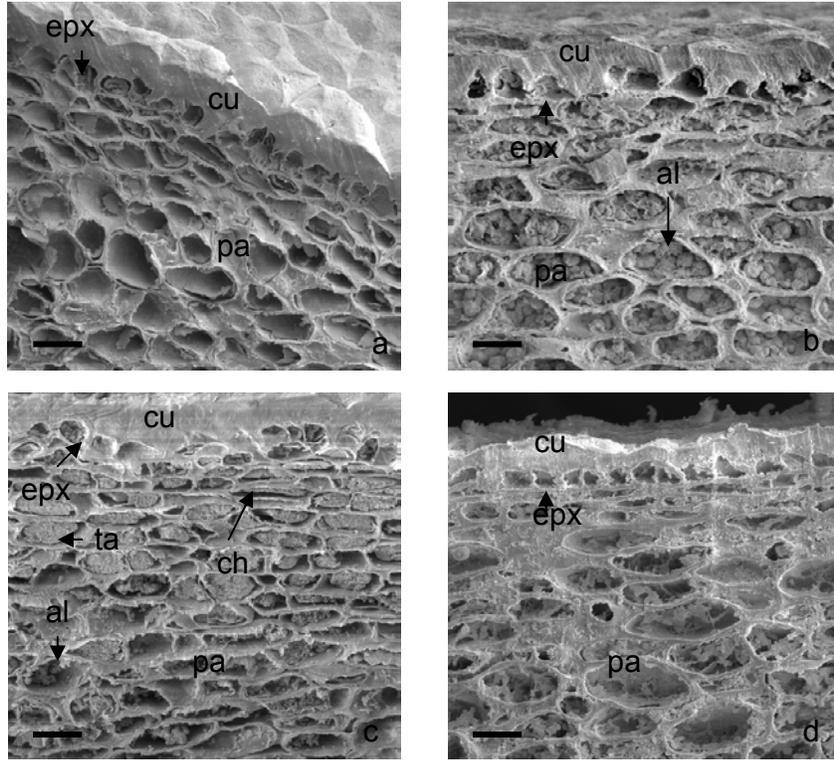


Fig. 7. Exocarpo y mesocarpo de frutos var. 'Haden', **a)** etapa III; **b)** etapa IV; **c)** etapa VI (maduro); **d)** etapa VII (senescencia). Barra = 22.5 μ

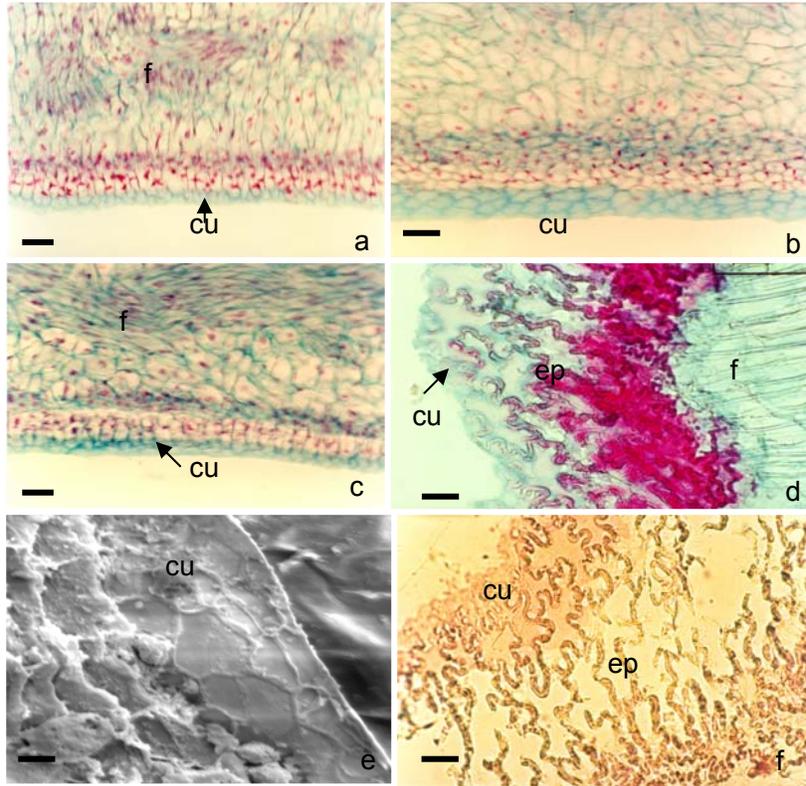


Fig. 8. Cutícula de la epidermis interna (cut) de frutos de var. 'Haden' en etapas de desarrollo a) I; b) II; c) III, d) IV (tinción safranina-verde rápido, y f) V (tinción rojo de aceite), Barra = 25 μ ; e) micrografía de barrido etapa III (1500x, barra = 9 μ m). (fi) fibras, (ep) epidermis.

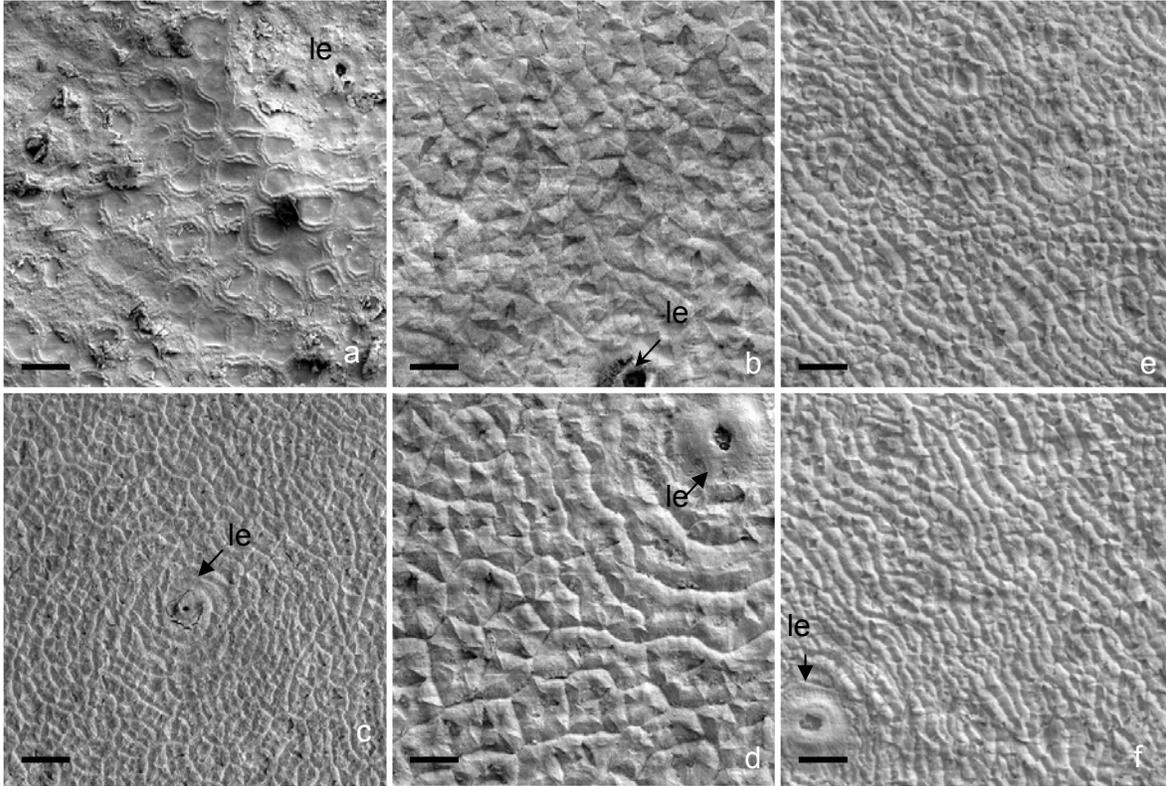


Fig. 9 a, b, c y d) Cutícula de la epidermis externa de frutos var. 'Haden' en etapas de desarrollo I; II (300x, barra = 37 μ); IV (250x, barra = 45 μ) y V (300x, barra = 37 μ); **e y f)** Cutícula de la epidermis externa de frutos var. 'Manila' en etapas de desarrollo III y IV (250x, barra = 45 μ).

Pies de figuras 10 y 11

Figura 10. Desarrollo del endospermo y los cotiledones de la semilla, **a)** Célula primaria del endospermo en la primera etapa de desarrollo; **b)** Endospermo cenocítico en la segunda etapa de desarrollo; **c)** Endospermo cenocítico en la tercera etapa de desarrollo; **d)** Endospermo celularizado, etapa IV; **e)** Células de cotiledón en la var. 'Haden' durante la etapa IV; **f)** Cotiledones de la var. 'Manila' en la etapa V; **g)** Tejido cotiledonario de var. 'Haden' en la etapa VI, se observan abundante granos de almidón con hilos en el centro teñidos de color pardo y reservas proteicas que se tiñen de rojo; **h)** Tejido de cotiledón de 'Manila', donde se observan estomas. La barra en las fotos equivale a 25 μm . **cpe** (célula primaria del endospermo, **ec** (endospermo cenocítico), **ece** (endospermo celularizado), **cot** (cotiledón), **al** (granos de almidón), **p** (proteínas), **es** (estomas).

Figura 11. Desarrollo de los tegumentos, **a y b)** Tegumentos externo e interno en la etapa I; **c y d)** Tegumentos externo e interno en la etapa III; **e y f)** Testa y tegmen en semilla madura; **g)** Semillas poliembriónicas de la var. 'Manila' y semillas monoembriónicas var. 'Haden'; **h)** semillas mono y poliembriónicas germinadas. **te** (tegumento externo), **ti** (tegumento interno), **t** (testa), **tg** (tegmen). Barra = 25 μ .

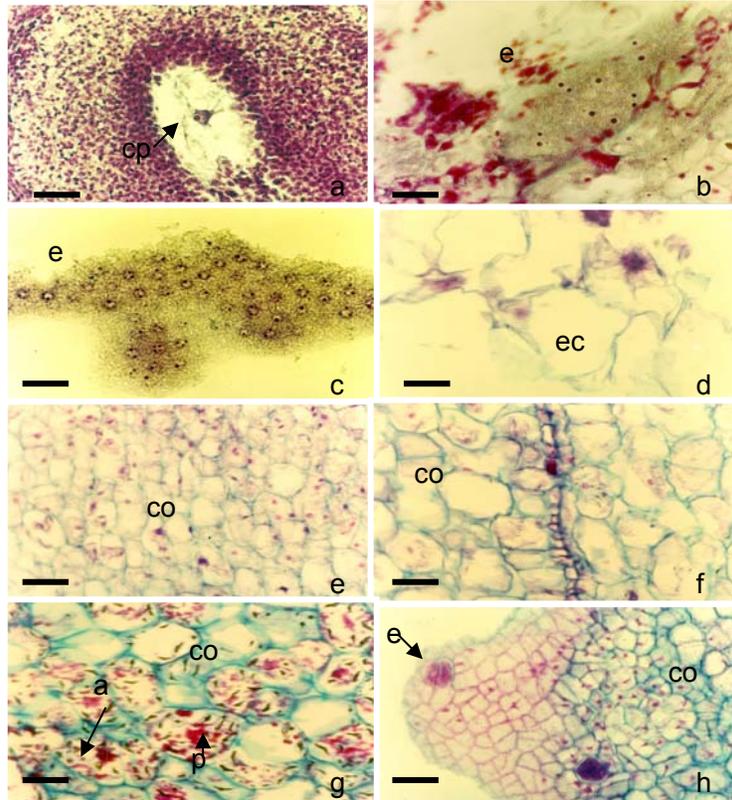


Fig. 10. Desarrollo del endospermo y los cotiledones. Barra = 25 μ .

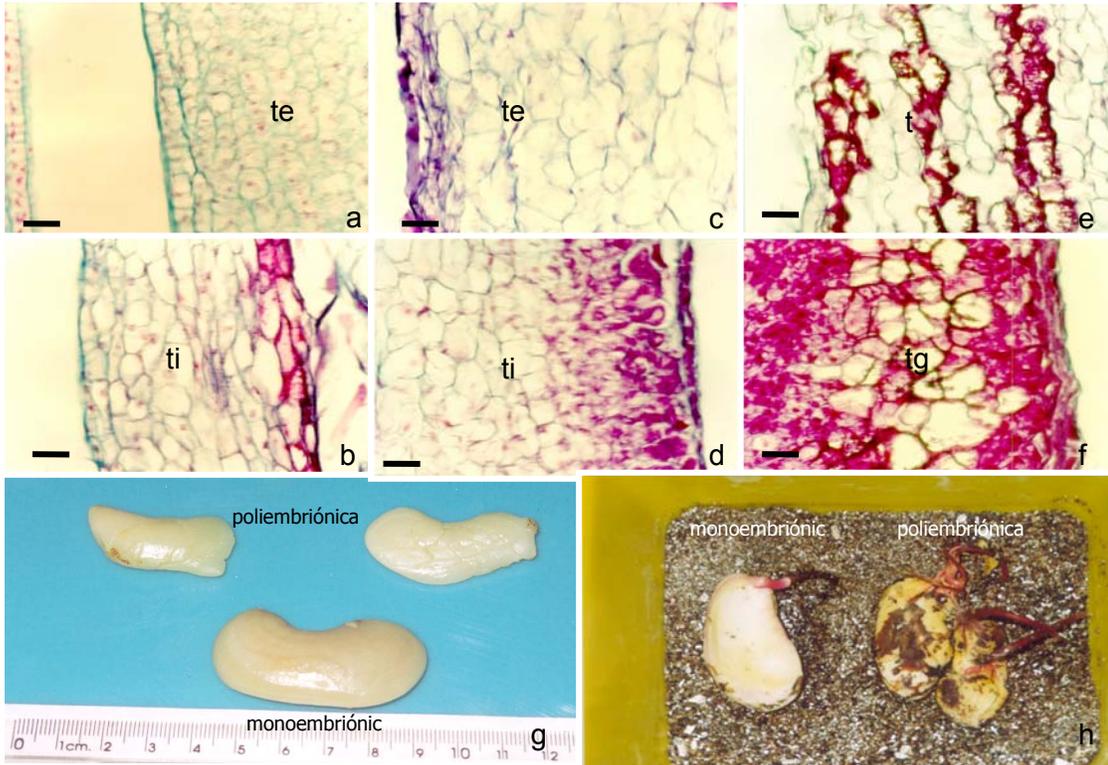
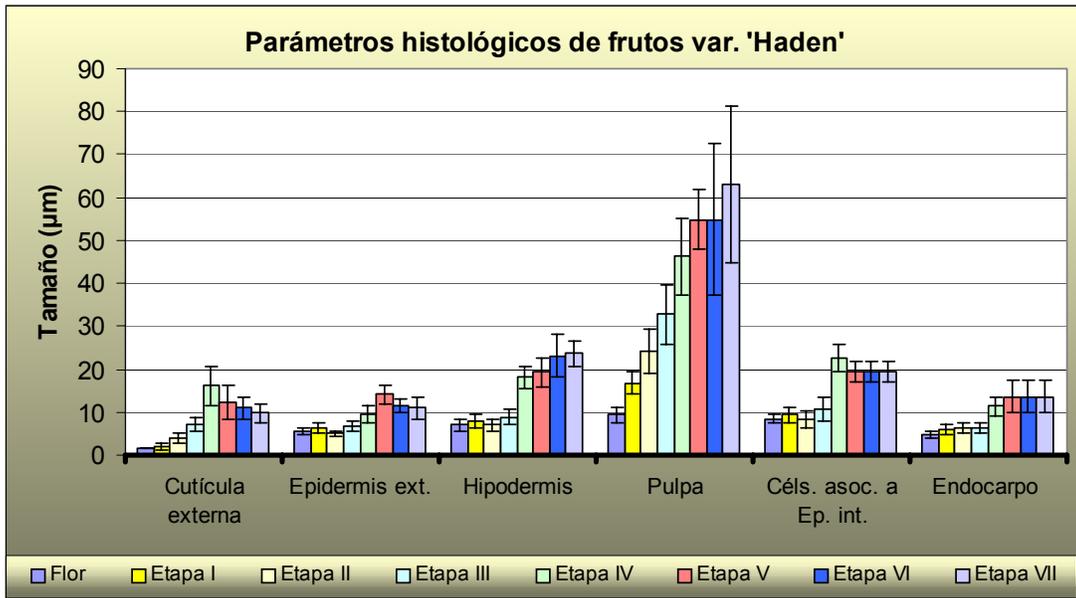


Fig. 11. Desarrollo de los tegumentos. Barra = 25 μ .

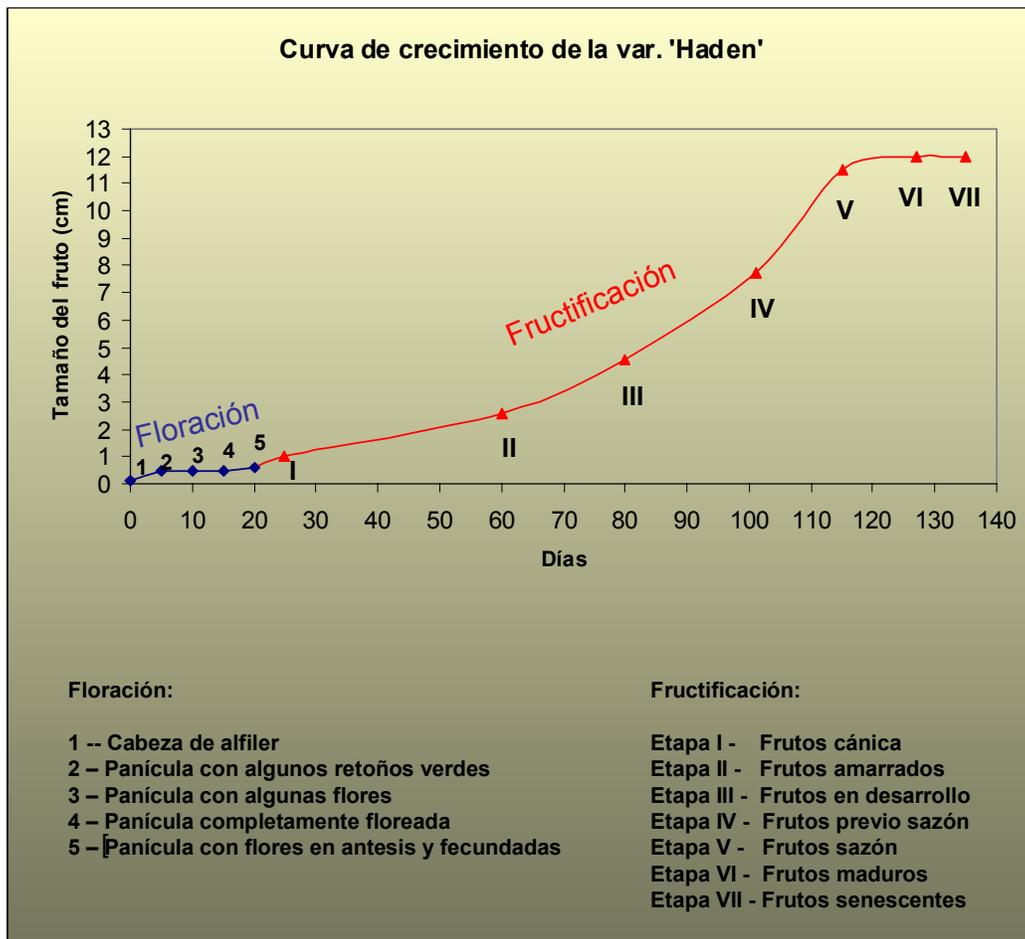
6.4.5. Curva de crecimiento de los frutos var. 'Haden'

En la gráfica 5 se presenta una curva de crecimiento para la variedad 'Haden', que exhibe un crecimiento de tipo sigmoide. En la gráfica se hace una relación entre el tamaño de las flores y frutos y el período de desarrollo en días con base en las fechas de colecta del material. Los cambios histológicos observados durante el desarrollo incluyendo la floración y hasta la senescencia se presentan en aproximadamente 135 días ó 19 semanas. En la gráfica se presentan las etapas de desarrollo consideradas en este estudio y los nombres que reciben en el campo los diferentes estadios de floración y fructificación.

Desde el inicio de la floración, es decir cuando la panícula se encuentra en el árbol como cabeza de alfiler hasta la fecundación transcurren por lo menos 20 días, aunque las fases de floración suelen traslaparse con las etapas I (frutos canica) y II (frutos amarrados). La etapa I comienza aproximadamente al día 25 (Fig. 12). Durante las etapas I y II la tasa de crecimiento es lenta. Aproximadamente después del día 60, la tasa de crecimiento es más acelerada. Después de alrededor de 80 días, los frutos de la etapa III denominados en desarrollo alcanzan un tamaño entre 3.7 y 5.4 cm de longitud (Fig. 12). El estadio previo sazón (etapa IV) ocurre cuando los frutos tienen aproximadamente 8 cm de longitud (Fig. 12) y después de que han transcurrido 100 días. Después de 115 a 120 días se alcanza el estado sazón (etapa V) y luego de 7 a 10 días los frutos llegan a la etapa VI denominada madurez y adquieren su tamaño máximo, aproximadamente 12 cm (Fig. 12), posteriormente entran en senescencia (etapa VII). Una vez que se alcanzó el estado sazón (etapa V), las tasa de crecimiento es muy lenta.



Gráfica 4. Tamaños celulares de los tejidos de los frutos de mango de la var. 'Haden' durante el desarrollo.



Gráfica 5. Curva de crecimiento de la var. 'Haden'

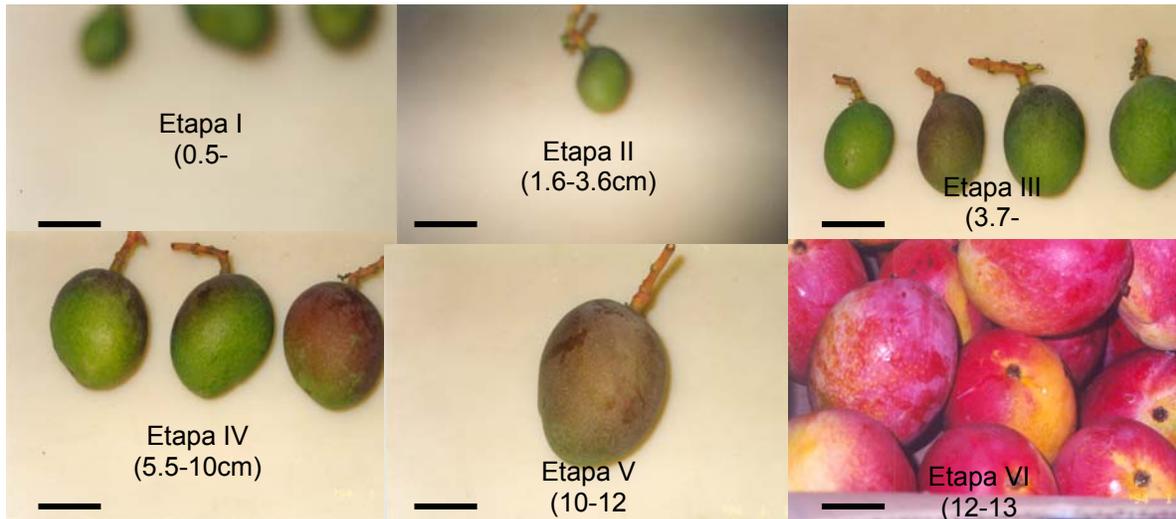


Fig. 12. Frutos de la var. 'Haden' en diferentes estados de desarrollo. Barra = 4 cm.

6.5 DISCUSIÓN

Las características histológicas de los frutos y semillas durante el desarrollo pueden utilizarse como fundamento para mejorar las prácticas de manejo de huerta y producción de frutos, además como indicadores de cosecha. A manera de ejemplo consideraremos dos aspectos, riego y fertilización. En cuanto al riego, es imprescindible que no falte el agua durante la floración y el amarre para evitar la caída de frutos y asegurar un buen desarrollo. Conociendo la curva de crecimiento (Graf. 5) se puede predecir que la mayor demanda de agua ocurre entre los 40 y los 80 días a partir de la antesis. Aunque se ha señalado que la disminución del riego poco antes de la recolección puede anticipar la maduración y aumentar el contenido de materia seca del fruto (Diczballis, 1994). En cuanto a la fertilización, se debe garantizar una adecuada aportación de nitrógeno durante el período de rápido desarrollo del fruto (Samra, et al., 1977 y Guzmán Estrada, et al., 1997), entre 30 y 80 días, momento en que la demanda de nutrientes es máxima, lo que puede aumentar la producción.

En México algunos parámetros de calidad, como la firmeza, los grados Brix y color de la pulpa y la cáscara han sido utilizados como índices de corte. Sin embargo, la mayoría de estos métodos son destructivos o subjetivos y poco prácticos para su utilización en campo. Para la variedad 'Haden', de acuerdo con Báez y Bringas (1996) los mínimos aceptables son 13.2 kg-f de firmeza, 7 a 8° Brix, el color de la cáscara debe cambiar a amarillo en el área de los hombros, además debe observarse un cambio de color café en las lentécelas. Para determinar el color de la pulpa se utilizan las cartas de color de EMEX, A.C. En este estudio los frutos analizados coinciden con las características mencionadas por Báez y Bringas; pero, estos parámetros en la práctica no pueden ser evaluados en todos los frutos que se destinan al consumo, pero sí se pueden evaluar pequeños lotes para determinar la calidad de los frutos, que en el caso de los frutos estudiados en este trabajo es excelente.

Este trabajo permite sugerir parámetros histológicos que relacionados con el tiempo a partir de la antesis pueden proporcionar indicadores de corte complementarios o alternativos que

pueden servir como otro criterio para saber cuándo deben cosecharse los frutos. La edad de los frutos es un criterio que se ha utilizado en el Sudeste de Asia desde hace muchos años. En Guatemala y en México también se ha empleado. En nuestro país se estiman entre 93 y 115 días, según cultivares y zonas de producción (Galán, 1999). Este período está en los límites de lo que se encontró histológicamente en la var. 'Haden', los frutos llegan a la etapa sazón en aproximadamente 115 a 120 días, en esta etapa se sugiere que deben ser cosechados, ya que han alcanzado el desarrollo y tamaño suficiente para que después de la cosecha puedan lograr la madurez de consumo. En la etapa sazón comienzan a degradarse la clorofila y a sintetizarse pigmentos relacionados con el cambio de color; ocurre la mayor acumulación de granos de almidón, tanto en el mesocarpo como en el tejido cotiledonario y el endocarpo termina de endurecerse.

Algunos trabajos histológicos y químicos realizados sobre desarrollo de frutos de otras variedades de mango coinciden con la curva de crecimiento propuesta en este estudio. En la variedad 'Alfonso' (Hari, 1999), los canales de resina se forman a los 30 días después de la fructificación, este período concuerda con lo que se observó en la segunda etapa de desarrollo de los frutos 'Haden'. Tanto en la variedad 'Alfonso' como en la 'Irwin' (Ito, et al., 1997) la formación de fibras en el endocarpo comienzan aproximadamente a los 80 días, lo cual es consistente con la tercera etapa de desarrollo de los frutos 'Haden'. Sin embargo, en el caso de 'Irwin' el hueso termina su endurecimiento a los 90 días aproximadamente, mientras 'Haden' forma el retículo fibroso lignificado hasta el estado sazón, es decir, a los 115 días aproximadamente. En estas tres variedades: 'Haden', 'Alfonso' e 'Irwin', la acumulación de almidón se inicia aproximadamente a los 90 días, en el caso de 'Haden' corresponde a la etapa IV. Antes de la madurez, según Ito y col. (1997), el azúcar predominante es la fructosa. Conforme el desarrollo avanza el almidón es poco detectable y la sacarosa aumenta significativamente en la madurez (cinco días después de la cosecha) y por lo tanto, los niveles de fructosa disminuyen. En un estudio realizado con frutos de la variedad 'Kensington Pride' por Herianus y col. (2003), se encontró que en la etapa sazón algunos ácido orgánicos, como el cítrico y málico son perceptibles y en la madurez disminuyen por completo, los ácidos grasos así como los compuestos aromáticos volátiles aumentan conforme la fruta madura. Los grupos más abundantes de compuestos

volátiles fueron los hidrocarburos (59%) y los ésteres (20%), como los terpinolenos y los octanoatos de etilo. No existe información clara acerca de dónde se sintetizan dichos compuestos.

El color, el aroma y el ablandamiento típicos de la maduración de consumo se presentan a los 6-7 días después de la cosecha. En las variedades 'Irwin' y 'Kensington Pride' el color y el ablandamiento coincidieron con el pico máximo de la respiración climatérica y con la máxima producción de etileno. En la variedad 'Haden', según lo reporta Ponce de León (1997) el pico climatérico se alcanza alrededor de los 6 días postcosecha, por lo que, en 'Haden' los cambios en el color y el ablandamiento también coinciden con el pico climatérico. Una vez que se alcanza la mayor actividad respiratoria y el pico más alto de etileno los frutos entran en la etapa de senescencia declarada (después de 127 a 135 días), se degrada la cáscara y la pulpa y, finalmente se promueve la liberación del hueso y la semilla.

Después de la cosecha y hasta la madurez de consumo se calculan entre 7 y 10 días antes de que los frutos entren en senescencia declarada, es decir, que para la var. 'Haden', según los resultados obtenidos en este estudio la vida de anaquel a temperatura ambiente (20° C) es de 7 a 10 días. Si los frutos son cosechados prematuramente (tiernos) no maduran de forma regular, no logran el sabor y el color deseable y, por otro lado, en la semilla no se acumulan suficientes sustancias de reserva para la germinación. Además los frutos así cosechados son más sensibles a temperaturas bajas y a una deshidratación más rápida. Por el contrario, si se cosechan tardíamente se reduce la vida postcosecha y los frutos se hacen más sensibles al ataque de patógenos y al daño mecánico, pues los tejidos comienzan a degradarse.

6.6. CONCLUSIONES

Las características histológicas de los frutos y semillas de mango pueden utilizarse como índices durante el desarrollo para mejorar las prácticas de manejo de huerta y producción de frutos y además pueden contribuir a precisar el momento del corte.

La resistencia de la cáscara, así como el período relativamente largo de ablandamiento de los tejidos durante la maduración, permiten que los frutos de la variedad 'Haden' puedan ser exportados con muy buena calidad a destinos lejanos. Las características de la cáscara y de la pulpa explican la resistencia de los frutos a daños mecánico y al ataque de patógenos.

7. DESARROLLO DEL FRUTO Y LA SEMILLA VAR. 'MANILA'



7. DESARROLLO DEL FRUTO Y LA SEMILLA VAR. ‘MANILA’

7.1. ANTECEDENTES

La variedad ‘Manila’ es poliembriónica, temprana. En los resultados de un estudio realizado en el Rosario, Sinaloa, México (Guzman, *et al*, 1993), los autores observaron que los árboles son vigorosos y de marcada alternancia en la producción. Tomando en cuenta la amplia gama de variedades, el tamaño de los frutos de la var. ‘Manila’ es considerado como pequeño a mediano, con aproximadamente 12 cm de largo y alrededor de 175 a 240 gramos 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’ (Guzman, *et al*, 1993). 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 esta variedad se destina principalmente al consumo nacional (Loubet, 2000). En Sinaloa se cosecha entre junio y julio (Guzman, *et al*, 1993).

Las semillas de las variedades poliembriónicas, como ‘Manila’ presentan más de un embrión en una semilla (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 (embriones adventicios) (Juliano, 1934; Maheshwari, *et al.*, 1955; Mukherjee, 1997), pero en otros casos uno de los embriones es sexual y los restantes nucleares (Galán, 1999). Los embriones nucleares aparentemente carecen de suspensor (Mukherjee, 1997). En estadios tempranos un embrión cigótico o sexual puede distinguirse por su posición micropilar y forma regular (Espinosa-Osornio y Engleman, 1998) o por análisis de isozimas (Schnell y Knight, 1992). En el caso de *Mangifera* aparentemente uno o más genes recesivos están involucrados en la poliembriónía (Espinosa-Osornio y Engleman, 1998).

7.2. OBJETIVO

Comparar algunos eventos fundamentales del desarrollo del embrión y del fruto en otra variedad: 'Manila'.

7.3. MATERIALES Y METODOS

Flores, frutos y semillas de la variedad 'Manila' en diferentes fases de desarrollo se colectaron en la huerta La Pedregosa en el Rosario, Sin., México en los meses de abril a agosto de los años 2001 a 2003. Los frutos se clasificaron en siete etapas por tamaño: I:0.5 a 1.5 cm, II:1.6 a 3.6 cm III:3.7 a 5.4 cm IV:5.5 a 9.9 cm, V:10 a 12 cm, VI: 12 en adelante (Fig. 13) y VII: estado senescente. En frutos de la etapa VI (maduros) se determinaron parámetros de calidad: firmeza, °Brix, tamaño, peso y color externo.

Muestras de 1 cm de tejido (exocarpo, mesocarpo, endocarpo y semilla) se fijaron en formaldehído alcohol ácido acético (FAA) y se deshidrataron con series graduales de alcohol terbutílico, alcohol etílico y agua. Las muestras se infiltraron en parafina histológica durante dos a tres días y se vaciaron en moldes, una vez que solidificaron, las muestras se cortaron (10 a 12 μm de espesor) utilizando un micrótopo rotatorio (Spencer, American Optical Company). Los cortes se tiñeron con una tinción de contraste safranina – verde fijo y se montaron con resina sintética. Las preparaciones se observaron en el microscopio óptico (Carl Zeiss Axiolab) y se obtuvieron micrografías. Se determinaron parámetros histológicos: tamaño, forma y tipos celulares, así como presencia de material ergástico y materiales de reserva. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza y separación de medias por la prueba de Tukey.

Para la observación en microscopía electrónica de barrido (SEM), muestras de 0.5 cm^2 se fijaron en una solución de glutaraldehído al 6% y se posfijaron en una solución de tetraóxido de osmio al 2%. La deshidratación se realizó con una serie gradual de alcohol metílico y se desecaron al punto crítico en una cámara (SAMDRI-780B. Tousimis). Las

muestras se montaron y recubrieron con carbón y oro para observarlas en SEM. Los análisis cuantitativos se realizaron utilizando una escala incluida en el microscopio de barrido (Zeiss DSM 940A).

7.4. RESULTADOS

7.4.1. *Parámetros de calidad de la var. ‘Manila’*

Los frutos de la var. ‘Manila’ midieron entre 11 y 13 cm, el peso promedio fue de 234 g, la firmeza fue de 5.0 kg-f y los sólidos solubles totales resultaron en 18.15° Brix.

Cuadro 6. Peso de los diferentes tejidos en un lote de 100 frutos maduros var. ‘Manila’

Tejido	Peso (g)	Porcentaje (%)
Exocarpo	58	24.7
Mesocarpo	127	57.4
Endocarpo	35	13.7
Semilla	15	4.13
Fruto completo	234	100

En el cuadro 6 se presenta el peso total del fruto y la proporción en porcentaje de cada tejido. En la var. ‘Manila’ la pulpa es la que presenta un mayor porcentaje en peso (cerca del 60%), la cáscara tiene el 24.7%, el hueso el 13.7% y la semilla solamente el 4.13% de peso total. El incremento en el peso de los frutos de la variedad ‘Manila’ es menor que en ‘Haden’, debido a que en ‘Manila’ la cáscara es notablemente más delgada y la pulpa con células de un tamaño más grande que en ‘Haden’ ocupan la mayor la proporción del fruto.

7.4.2. *Flor y verticilos florales*

Las flores de la variedad ‘Manila’ son de un tamaño aproximado a la de ‘Haden’ entre 0.3 a 0.5 cm y son pentámeras. Los tamaños celulares de los tejidos de los verticilos y del ovario

en la flor de la var. 'Manila' son muy similares a los de 'Haden' (cuadro 5). En las flores hermafroditas de ambas variedades el ovario es súpero y presenta un estilo de inserción lateral (Fig.13a), presentan un óvulo anátropo (Fig. 13b).

7.4.3. Desarrollo del fruto variedad 'Manila'

El desarrollo del fruto de la variedad 'Manila' es semejante al de la variedad 'Haden', por lo que se describen las principales diferencias.

Etapa I (0.5 – 1.5 cm)

En el caso de la var. 'Manila', solamente cuando el fruto es menor a un centímetro la epidermis se encuentra organizada con células en empalizada, posteriormente, las células de la epidermis comienzan a reorganizarse y dan una apariencia como de ondas (Fig.14a). El tamaño de las células de los diferentes tejidos es similar en ambas variedades (Gráf. 8). La formación de canales secretores asociados a haces vasculares es más frecuente que en la variedad 'Haden' (Fig. 14b). Así mismo, se acumula material de reserva en estadios más jóvenes en la variedad 'Manila' (Fig.14a y 14b). En el endocarpo, la formación de fibras se presenta a partir de esta etapa y progresa rápidamente. Existen de cuatro a seis capas de células isodiamétricas por debajo de la epidermis interna (Fig.14c) igual que en la variedad 'Haden', pero en esta etapa en la variedad 'Manila' son poco más grandes.

Etapa II (1.6-3.6 cm)

Durante la segunda etapa, la cutícula aumenta su grosor considerablemente (Fig. 14d), las células epidérmicas crecen un tanto con respecto a la etapa I (Gráf. 8). Se agrupan de seis a ocho células por debajo de la cutícula y comienza a definirse una forma claramente piramidal. Las células que forman el mesocarpo siguen multiplicándose y expandiéndose, por lo que entre ellas se forman espacios intercelulares (Fig. 14e). La formación de fibras continúa en las capas hipodérmicas de la epidermis interna (Fig. 14f).

Etapa III (3.7-5.4 cm)

En la etapa tres, la cutícula no aumenta de grosor con respecto al estadio II (Fig. 14g; Gráf. 8). Durante la etapa III, el grosor de la cutícula coincide con la variedad ‘Haden’. Las células de la epidermis se organizan de forma más continúa haciendo que la deposición de cutícula tenga una apariencia más lisa (Fig. 9e). A diferencia de ‘Haden’, que en esta etapa presenta una epidermis estriada, debido a la topografía ondulada. En la hipodermis, las paredes celulares permanecen más gruesas. El mesocarpo es el tejido que en todos los estados de desarrollo crece más (Gráf. 6). Durante la etapa III comienza la acumulación de material de reserva en las células del parénquima (mesocarpo) (Fig. 14h). La formación de fibras es muy intensa (Fig.14i).

Etapa IV (5.5 -10 cm)

Durante la etapa cuatro, las células epidérmicas comienzan a desorganizarse, (Fig. 15a), el grosor de la cutícula aumenta un poco (Gráf. 6) y en el caso de la variedad ‘Manila’ las crestas y valles que forma la capa cuticular no coinciden con las puntas y bases de las células epidérmicas, por lo que el arreglo es más continuo en esta variedad que en la ‘Haden’ (Fig. 9f). En este estadio, la cutícula es más gruesa en la variedad ‘Haden’. Las células del mesocarpo siguen expandiéndose y acumulando gránulos de almidón (Fig. 15b). (Gráf. 8). Comienzan a degradarse las células asociadas a la epidermis interna (Fig. 15c). Todos los tejidos, excepto las células parenquimáticas alcanzan su tamaño máximo (Gráf. 6).

Etapa V (mayor a 10 cm)

En esta etapa las células de la epidermis comienzan a perder contenidos citoplasmáticos, por lo que se observan desorganizadas y llegan a verse espacios entre ellas (Fig. 15d). Se degrada la clorofila y se sintetizan xantofilas y carotenoides, por lo que se presentan cambios de color (Fig. 13c). Las células parenquimáticas que subyacen a la epidermis

externa presenta paredes más engrosadas que el resto del mesocarpo y acumulan polifenoles (Fig. 15d y 15e). Las células del mesocarpo continúan creciendo (Fig. 15e; Gráf. 6). La formación de fibras y el engrosamiento de paredes celulares es menor en los frutos de la variedad 'Manila' (Fig. 15f), como puede notarse cuando son consumidos ambos frutos.

Etapa VI (10-12 cm)

Conforme el fruto madura, la cutícula externa se adelgaza y la deposición de ceras es discontinúa (Fig. 15l). Las paredes de las células parenquimáticas se degradan provocando cambios en la firmeza (Fig. 15g y 15h). Aparentemente, la cantidad de almidón que se almacena en el mesocarpo de la variedad 'Manila' es mayor que en la 'Haden'. No se forma un retículo fibroso en el endocarpo como en el caso de 'Haden' (Fig. 15i).

Etapa VII (Frutos senescentes)

Las células hipodérmicas se comprimen. Hay degradación de todos los tejidos, pérdida de contenidos citoplásmicos y fermentación de azúcares. Las células de mesocarpo se expanden incluso en esta etapa de desarrollo (Fig 15j y 15k).

7.4.4. Desarrollo de la semilla

A diferencia de los frutos de la variedad 'Haden', los frutos 'Manila' son poliembriónicos. Presentan de seis a ocho embriones, cuyo tamaño va de 2 a 5 cm de longitud (Fig. 9g y 9h). Este fenómeno se debe a la formación de embriones adventicios que tienen como origen la nucela. Solamente uno de los embriones es sexual, el resto son nucelares.

Después de la fecundación, conforme el saco embrionario se agranda, el tejido de la nucela se degrada y algunas de las células que se encuentran en el extremo micropilar se diferencian, estas células poseen grandes núcleos y un citoplasma denso, dichas células comienzan a desarrollarse y dividirse formando embriones adventicios. El desarrollo de los

embriones nucelares implica la utilización del tejido nucelar. Los tegumentos se desarrollan de la misma forma que en la variedad 'Haden' (Fig. 11).

En la tercera etapa de desarrollo al igual que en la variedad 'Haden' el endospermo de los frutos 'Manila' se celulariza y se distinguen los cotiledones. En el caso de los cotiledones de la variedad 'Manila' se observó la presencia de estomas en la madurez (Fig. 10g y 10 i).

7.4.5. Curva de crecimiento de la var. 'Manila'

La curva de crecimiento presentada para la variedad 'Haden' (Gráfica 5) puede ser utilizada para la 'Manila', aunque algunos eventos del desarrollo se presentan en etapas distintas.

En la etapa I (frutos canica) entre los 20 y 25 días, se anticipa la reorganización de la epidermis empalizada y se forman ondas, inicia la formación de canales secretores y la formación de fibras, eventos que en 'Haden' ocurrieron hasta la segunda etapa.

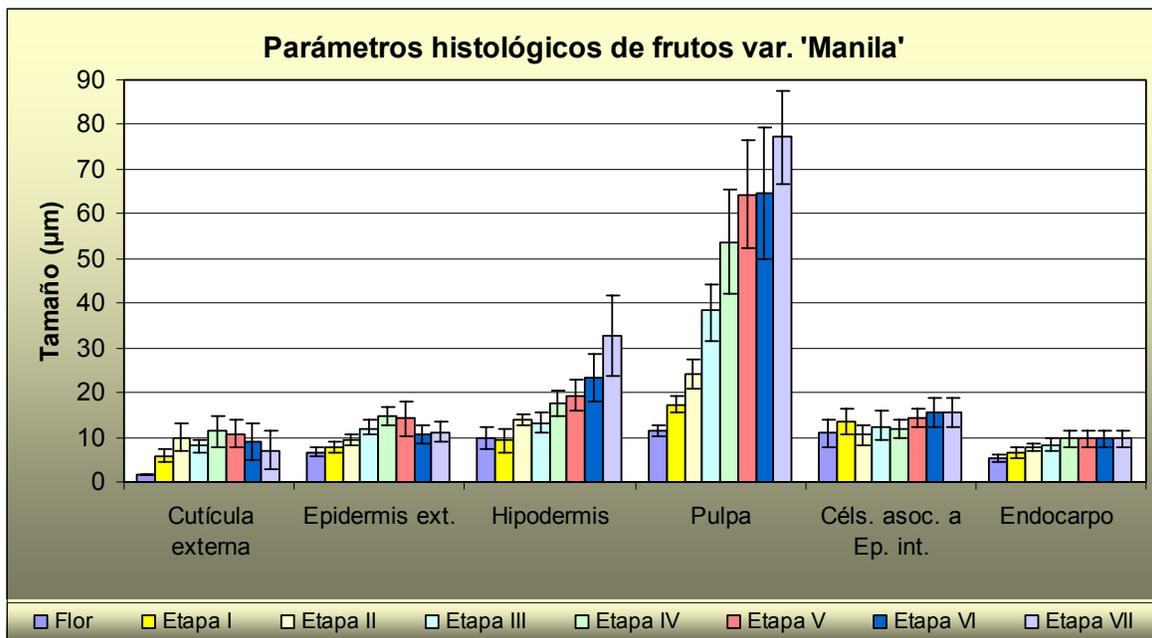
Durante la segunda etapa (frutos entre 1.6 y 3.6 cm denominados frutos en amarre) la tasa de crecimiento es lenta, es decir, transcurren aproximadamente 50 días, en los cuales continúa la formación de fibras del endocarpo y se expanden las células de todos los tejidos.

En la etapa III, aproximadamente a los 80 días, inicia la acumulación de almidón, evento que se presenta también de manera anticipada con respecto a 'Haden'. En la semilla se forman los cotiledones y el endospermo celular. En la etapa IV, al igual que en 'Haden' se alcanzan los tamaños celulares máximos en todos los tejidos, excepto en las células parenquimáticas del mesocarpo y la hipodermis y se siguen acumulando sustancias de reserva.

Durante la etapa V, cuando el fruto se encuentra en estado sazón, entre 115 y 120 días, el hueso no se endurece completamente, debido a que en el endocarpo no todas las células se convierten en fibras. Comienza la degradación de clorofila y se produce la síntesis de

pigmentos. Cuando el fruto madura (etapa VI), aproximadamente a los 125 días, las paredes de las células del mesocarpo se degradan, se presenta ablandamiento y cambio de color en la cáscara por la síntesis de xantofilas y carotenoides. La degradación de los tejidos y la senescencia (etapa VII) ocurren de manera más acelerada aproximadamente a los 130 días.

Al igual que en la var. ‘Haden’ los frutos en estado sazón de la var. ‘Manila’ presentan las características de madurez de consumo necesarias para que durante esta etapa de desarrollo pueda realizarse el corte; sin embargo el período de vida de anaquel para ‘Manila’ es más corto, según las observaciones realizadas entre 4 a 5 días.



Gráfica 6. Tamaños celulares de los tejidos de los frutos de mango de la var. ‘Manila’ durante el desarrollo.



Fig. 13. Frutos de la var. 'Manila en diferentes estados de desarrollo. Barra = 4 cm.

Pies de figuras 14 y 15

Figura 14. Primeras tres etapas de desarrollo de la variedad ‘Manila’, **a)** Corte de exocarpo en la etapa de desarrollo I, se observa la epidermis externa con células en que comienzan a modificarse en ondas y se aprecia la cutícula engrosada; **b)** Mesocarpo de fruto en la etapa de desarrollo I, se observan células parenquimáticas isodiamétricas y canales secretores cerrados; **c)** Endocarpo de un fruto en la etapa I, se observa la epidermis interna en empalizada y fibras asociadas a haces vasculares; **d)** Exocarpo durante la etapa II, se observa modificación de la epidermis en un patrón de ondulación; **e)** Mesocarpo durante la etapa II; **f)** Endocarpo en la etapa de desarrollo II, se aprecia la epidermis en empalizada, la cutícula interna se tiñe de verde; **g)** Exocarpo en la etapa III con una epidermis en ondas y cutícula engrosada; **h)** Mesocarpo en la etapa III, se observan células de parénquima isodiamétricas o algo alargadas; **i)** Endocarpo durante la tercera etapa de desarrollo, se observa la epidermis interna, se aprecia también la cutícula y algunas fibras asociadas a haces vasculares. La barra en las fotos equivale a **25 µm**. **epx** (epidermis externa), **cu** (cutícula), **ex** (exocarpo), **cs** (canales secretores), **me** (mesocarpo), **epi** (epidermis interna), **cut** (cutícula interna), **ch** (células hipodérmicas), **fi** (fibras), **en** (endocarpo).

Figura 15. Etapas de desarrollo IV, V, VI y VII de la variedad ‘Manila’, **a)** Corte de exocarpo en la etapa de desarrollo IV (denominada previo desarrollo), se observa la epidermis externa en un patrón de ondas y la cutícula de grosor máximo durante el desarrollo; **b)** Mesocarpo de fruto en la etapa de desarrollo IV, se observan células parenquimáticas isodiamétricas; **c)** Endocarpo de un fruto en la etapa IV, se observa la elongación de fibras asociadas a haces vasculares; **d)** Exocarpo durante la etapa V, se observa la epidermis ondulada y las células hipodérmicas con contenidos teñidos de rojo (taninos), la cutícula se observa un poco más delgada con respecto a la etapa anterior; **e)** Mesocarpo durante la etapa V, se aprecian numerosos granos de almidón; **f)** Endocarpo en la etapa de desarrollo V, se observan algunas fibras elongadas; **g)** Exocarpo en la etapa VI con una epidermis en ondas; **h)** Mesocarpo en la etapa VI con granos de almidón; **i)** Endocarpo durante la sexta etapa de desarrollo, se observa la formación de fibras; **j)** Exocarpo en la etapa VII, la cutícula se observa rota en algunos puntos, la epidermis ha perdido contenido citoplásmico y las células hipodérmicas se observan comprimidas; **k)** Mesocarpo con células parenquimáticas degradadas; **l)** Exocarpo teñido con rojo de aceite para apreciar las ceras epicuticulares de la epidermis externa de un fruto en etapa VII. La barra en las fotos equivale a **25 µm**. **epx** (epidermis externa), **cu** (cutícula), **ex** (exocarpo), **cs** (canales secretores), **al** (granos de almidón), **me** (mesocarpo), **epi** (epidermis interna), **cut** (cutícula interna), **ch** (células hipodérmicas), **fi** (fibras), **en** (endocarpo), **ce** (ceras epicuticulares).

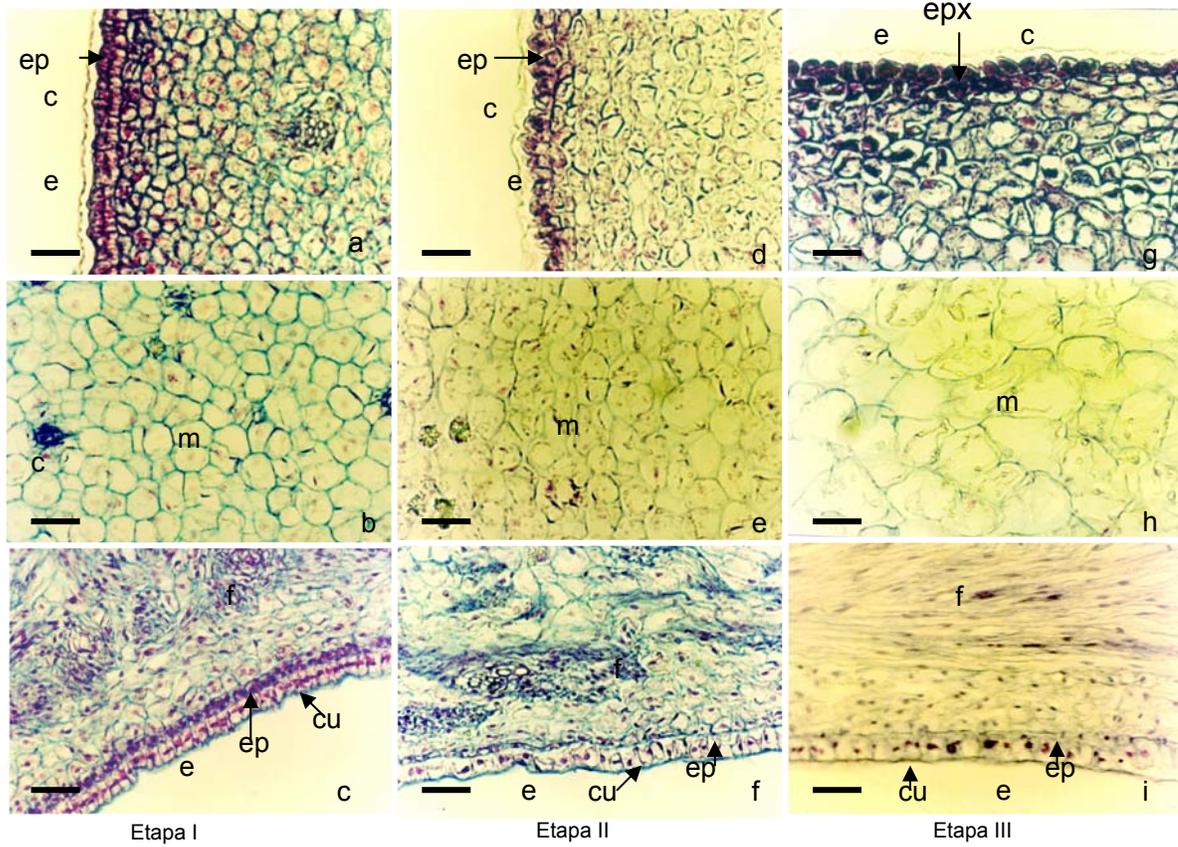


Fig. 14. Exocarpo, mesocarpo y endocarpo de la var. 'Manila' durante las primeras tres etapas de desarrollo. Barra = 25 μ

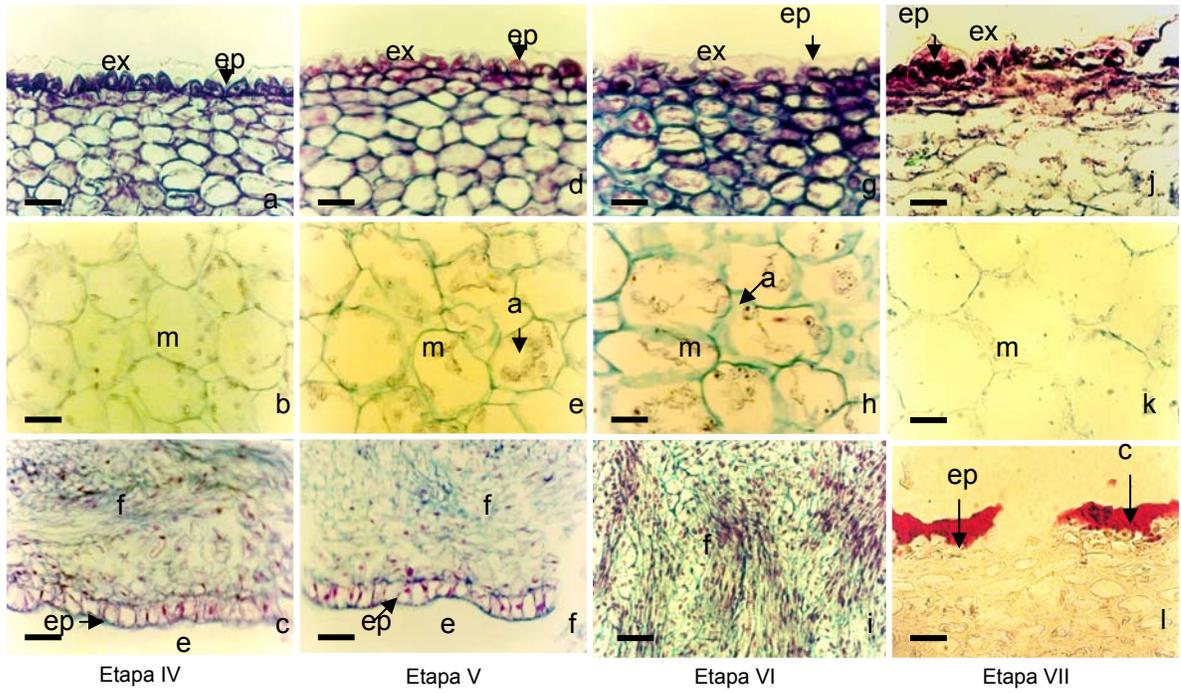


Fig. 15. Exocarpo, mesocarpo y endocarpo de la var. 'Manila' durante las etapas IV, V, VI y VII. Barra = 25 μ .

7.5 DISCUSIÓN

A pesar de que los frutos no presentan un crecimiento en intervalos regulares, algunos autores han intentado establecer tres o cuatro estados de desarrollo principales en frutas como las manzanas y los duraznos: multiplicación, expansión, diferenciación celular y maduración o madurez (Long, 1943; Kobel, 1954; Lilleland, 1930; Tukey, 1936). Estas cuatro divisiones tienen propósitos prácticos para distinguir las fases de desarrollo; sin embargo, no toman en cuenta que el crecimiento es un proceso continuo y gradual que afecta los tejidos en diferentes tiempos y que la velocidad de crecimiento es variable también (Roth, 1977). En los frutos de aguacate la división celular continúa hasta la madurez (Schroeder, 1953). En el caso del mango, lo que se observó en este estudio es que la división, extensión y diferenciación celular puede presentarse en los tejidos en diferentes tiempos (Barbosa, et al., Artículo en revisión). Mientras, que la expansión celular cesa en la epidermis externa, colénquima, endocarpo y capas subepidérmicas de la epidermis interna, durante la cuarta etapa de desarrollo, pero siguen multiplicándose; la expansión en las células del mesocarpo continúa hasta la última etapa de desarrollo del fruto en las dos variedades estudiadas.

Las diferencias en el patrón de desarrollo de los frutos de la variedad 'Manila' con respecto a la variedad 'Haden' radica especialmente en la anticipación de los cambios histológicos, como la constitución de la epidermis de forma ondulada, el adelanto en la formación de fibras en el endocarpo y la acumulación de material de reserva en la pulpa. Además de las diferencias que se presentan en la madurez: el grosor de la cáscara es menor en 'Manila' que en 'Haden', en el mesocarpo las células alcanzan un tamaño mayor en 'Manila' y se forma un mayor número de espacios intercelulares y al final del desarrollo de 'Manila' no termina de formarse un retículo fibroso con paredes lignificadas. El desarrollo de la semilla es similar en ambas variedades, pero el número de embriones es significativamente diferente. 'Haden' es monoembriónico, mientras que 'Manila' es poliembriónico, presenta de 4 a 6 embriones con tamaños que van desde 2 a 5 cm de longitud. Las reservas cotiledonarias son similares en ambas variedades; sin embargo, la concentración de éstas es mayor en 'Manila'.

Por otro lado, las reservas en el parénquima de la pulpa de ‘Manila’ resultan más abundantes en almidón y posteriormente en sólidos solubles totales. Las células del mesocarpo presentan durante la maduración un proceso de degradación de pared más rápido, lo que contribuye a explicar la corta vida de anaquel de la var. ‘Manila’ (entre 4 y 5 días) y el por qué la exportación a destinos lejanos de los frutos de esta variedad resulta más difícil, a pesar de su excelente sabor y textura.

Cuando el fruto alcanza aproximadamente 12 cm de longitud (estado sazón), la semilla y el fruto han acumulado abundantes cantidades de sustancias de reserva y de otros compuestos como hidrocarburos y ésteres, además la clorofila comienza a degradarse y la síntesis de pigmentos relacionados con el cambio de color inicia; lo anterior permite que los frutos sean capaces de mantenerse sin los nutrientes provenientes de la planta madre. Por lo que se confirma que el corte debe hacerse durante la etapa sazón si se pretende prolongar la vida de anaquel.

En el caso de citrus, de acuerdo con Koltunow y col. (1996), el desarrollo de los embriones adventicios se realiza a partir del tejido nuclear y no requiere de una cantidad mayor de endospermo. Los embriones adventicios carecen de suspensor y suelen ser más pequeños que el embrión sexual; sin embargo en semillas maduras son difíciles de distinguir.

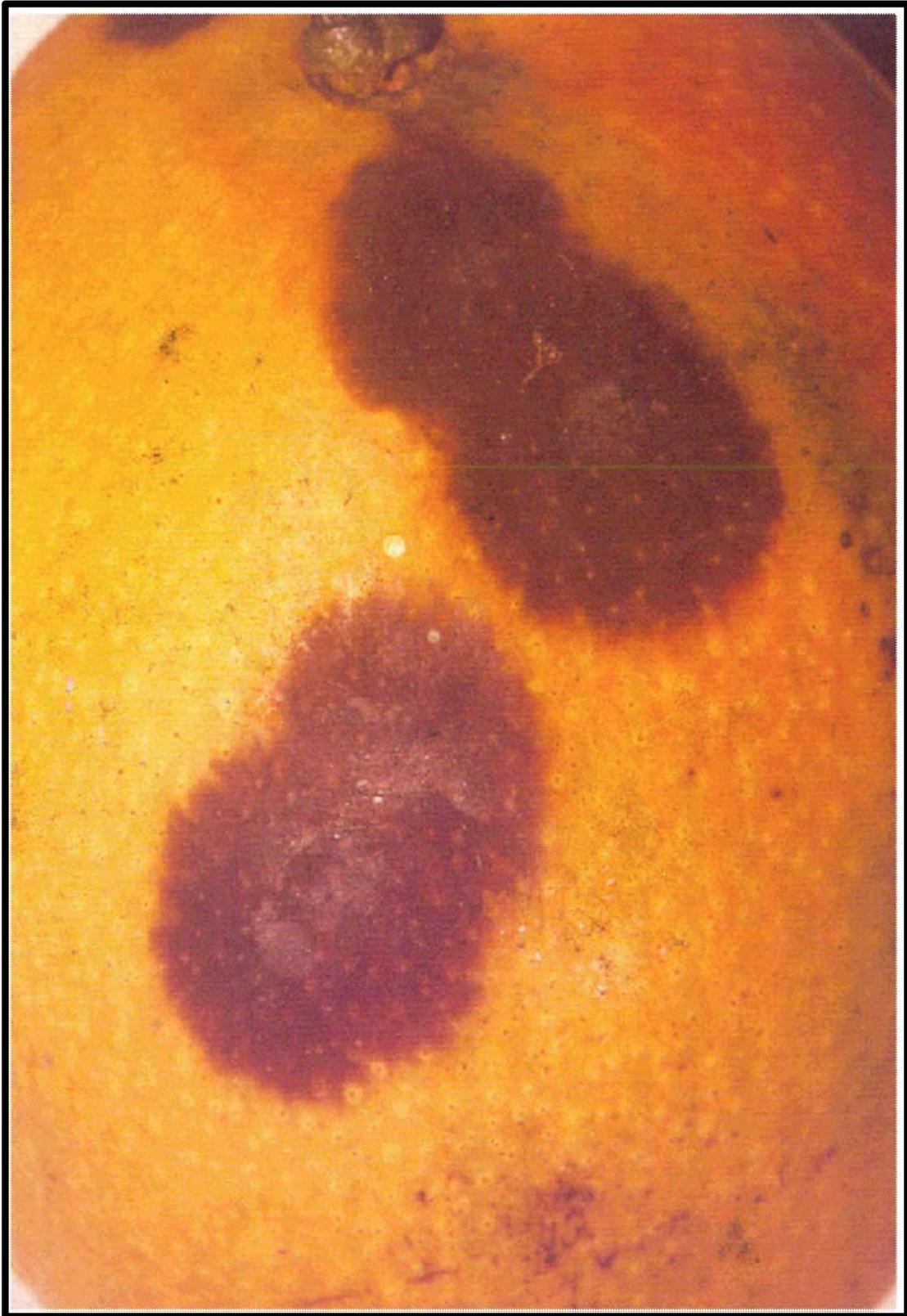
7.6. CONCLUSIONES

Las características histológicas que marcan las diferencias en el desarrollo de las dos variedades, explican el hecho de que ‘Manila’ sea menos resistente a los daños por manipulación y por frío, y así mismo, sea más susceptible a la pérdida fisiológica de peso y menos resistente al ataque de patógenos, por lo que se hace más difícil su exportación a destinos lejanos.

Es necesario hacer observaciones más precisas del período de desarrollo de la var. ‘Manila’ para la realización de su curva de crecimiento y corroborar los resultados obtenidos hasta

este momento. Sin embargo, las observaciones histológicas realizadas en la var. 'Manila' permiten sugerir que cuando el fruto alcanza aproximadamente 12 cm, éste y la semilla están listos para ser cosechados. El fruto madura en alrededor de 5 días.

8. EFECTO DEL OZONO EN LA PREVENCIÓN DE ANTRACNOSIS



8. EFECTO DEL OZONO EN LA PREVENCIÓN DE ANTRACNOSIS

8.1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

8.1.1. Antracnosis del mango

Colletotrichum gloeosporioides pertenece a la clase de los Deuteromycetes y al orden Melanconiales, mientras que su teleomorfo, *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld y von Schrenk, pertenece a la clase Ascomycetes y al orden de los Xilariales (Alexopoulos y Mims, 1985).

El síntoma de *C. gloeosporioides* en mango, es conocido como antracnosis es una de las enfermedades más importantes en todas las regiones productoras de mango del mundo, está asociada a temperaturas elevadas y humedad relativa arriba del 95%. Ocasiona disminución de la producción, deterioro de la calidad del fruto y fuertes pérdidas postcosecha (Cook, 1975; Fitzell y Peak, 1984; Jeffries *et al*, 1990; Dodd *et al*, 1991) pudiendo infectar las partes aéreas del árbol en todos los estados de desarrollo (Fitzell y Peak, 1984; Bailey y Jerger, 1992). En México, la enfermedad se encuentra distribuida en todas las regiones productoras y ocasiona severos daños en floración, fructificación y postcosecha. Las pérdidas varían entre el 15 y el 50% del volumen producido (Becerra-Leor, 1995).

La Antracnosis es una de las enfermedades fúngicas que causa mayores pérdidas, en México reduce el volumen de la producción total de mango. Otras enfermedades son pudrición del pedúnculo y secamiento de las ramas terminales de los árboles (*Lasiodiplodia theobromae*) y otros tipos de pudriciones (*Fusarium oxysporum*, *Pestalotiopsis mangiferae*) (Jeffries *et al*, 1990; Lim, 1994; Tandon, *et al.*, 1995; Nieto *et al.*, 1997).

Las esporas de *C. gloeosporioides* se adhieren a la epidermis de los frutos y tardan en germinar entre 12 y 48 horas, forman un apresorio que permanece latente hasta que el fruto alcanza comienza a cambiar de color (Jeffries *et al*, 1990).

La antracnosis ocasiona la caída prematura de los frutos, pero las mayores pérdidas ocurren durante la maduración en postcosecha, en este período, la infección se desarrolla por lo que se desencadena la presencia de lesiones de color café oscuro a negras con bordes indefinidos en la cáscara del fruto (Nieto *et al* 1997; Arauz, 2000). Estas lesiones de diferentes tamaños pueden aparecer en toda la superficie del fruto, pero con mayor frecuencia alrededor del pedúnculo, ya que los conidios tienden a depositarse alrededor de éste, después son distribuidos en el fruto durante el período de lluvias (Dodd *et al.*, 1991; Nieto, 1997).

Las lesiones se limitan a la cáscara del fruto, pero en casos severos el hongo llega a invadir la pulpa; conforme la enfermedad avanza se forman hundimientos en la superficie del fruto y masas de esporas de color anaranjado o rosado (Arauz, 2000; Dodd, *et al.*, 1997).

La producción y diseminación del hongo ocurre probablemente durante todo el año, principalmente cuando hay períodos de lluvia prolongados y coincide con la etapa de floración (Singh, 1968; Fitzell, 1979; Fitzell y Peak, 1984; Prusky, *et al.*, 1981).

8.12. Control mediante el uso de funguicidas

Las frutas requieren de la aplicación de tecnologías que garanticen la eliminación de microorganismos patógenos, los cuales reducen sus atributos de calidad y vida de anaquel (Barbosa, *et al.*, 1999b). El método de control tradicional depende de la aplicación de funguicidas tales como el tiabendazol, maneb, mancozeb, propineb, zineb, clortalonil, captafol, benomilo (benlate), captan, oxiclورو de cobre y metil tiofanato que han sido eficaces para el control de la antracnosis dependiendo de la zona productora (Johnson, *et al*, 1992; Galán, 1999). Pero además de los funguicidas, se aplican soluciones con halógenos, frecuentemente el cloro u otros compuestos (Prusky, 1997; Saaiman 1997). Las aplicaciones de funguicidas en precosecha son necesarias para proteger al fruto y asegurar el rendimiento. Se sugiere aplicar Captán, Maneb, Zineb, Benlate, Kocide o Cupravit, para prevenir la antracnosis desde que inicia la floración (Prior *et al.*, 1992; Guzmán, *et al*, 1993; Nieto, *et al.*, 1997).

En algunos casos se han aplicado con éxito tratamientos físicos como agua y vapor caliente (Coates et al 1997, Esquerra y Lizada 1990) o radiaciones infrarojas de onda corta (Saaiman, 1997).

El tratamiento físico que se recomienda para el control de la antracnosis, es la inmersión de los frutos en agua caliente. El tratamiento debe ser como mínimo a 50° C y no debe exceder de los 54 ± 1° C por cinco minutos; cuando el agua caliente se combina con fungicidas como el Benomilo, Imazalil, TBZ o Prochloraz, las temperaturas se deben reducir a 52 o 53°C (Spalding y Reeder, 1986; Nieto *et al.*, 1997). Sin embargo, el uso de fungicidas, a pesar de su efectividad puede tener efectos adversos secundarios en la salud del consumidor, el medio ambiente y la calidad de los productos; además de que se pueden formar razas del hongo resistentes a los productos químicos. A partir de esto, se le ha prestado más atención al desarrollo de métodos de control alternativos que sustituyan el uso de agentes químicos tóxicos (Bósquez, 1997; Arauz, 2000).

8.1.3. Tratamientos alternativos

En la actualidad existen algunos métodos alternativos de control de enfermedades basados en la modificación de los factores bióticos o físicos en los que se desarrolla el agente patógeno y que no tienen efectos secundarios tóxicos para la salud. Algunos de estos métodos alternativos son: hidrotermia, irradiación, refrigeración, atmósferas modificadas o controladas (Bósquez, 1997) y se explora el uso del ozono (Smilanick, 1999; Ponce de León, *et al.*, 2001).

En la búsqueda de tratamientos efectivos para la desinfección de frutas y hortalizas frescas, algunos distribuidores y procesadores de productos frescos emplean el ozono para la desinfección de agua, para el tratamiento de aire en cuartos fríos y otras aplicaciones postcosecha. El ozono ha logrado la categoría de un compuesto Generalmente Reconocido como Seguro (GRAS), este es un dictamen que surgió de recomendaciones recientes de un

jurado consejero de expertos y ha sido autorizado por el USDA en el año 2000 (Graham, 1997).

El ozono es un oxidante fuerte, que se forma en la naturaleza por la irradiación UV (185nm) de origen solar y durante la descarga eléctrica de los relámpagos; liberado en el aire o en solución la molécula es inestable, se mantiene solo de 15 a 20 min a temperaturas entre 10 y 20°C, después se descompone en oxígeno sin dejar residuos (Gordon, 1979; Ponce de León *et al.*, 2001).

El ozono es casi insoluble en agua (0.00003g/100ml a 20° C). La actividad desinfectante del ozono no se modifica en el rango de pH de 6 a 8.5. El ozono se detecta fácilmente por el olfato humano a concentraciones entre 0.01 y 0.04 ppm, tiene un olor acre desagradable e irrita los ojos y la garganta. Los límites de exposición que ha determinado la OSHA (Administración de Salud y Bienestar de los Trabajadores de los E.U.) especifican un umbral de 0.1 ppm en el caso de un exposición continua durante un período de 8 horas y de 0.3 ppm por un período de quince min (Graham, 1997).

El potencial de oxidación del ozono es 1.5 veces la del cloro y 3,000 veces la del ácido hipocloroso (HOCl). Los tiempos de contacto para la acción antimicrobiana son de 4 a 5 veces menores que los del cloro. El ozono ataca rápidamente las paredes de las células bacterianas, a concentraciones seguras es más eficaz que el cloro contra las esporas de hongos patógenos vegetales de pared gruesa y contra los parásitos de animales (Botzenhart, *et al.*, 1993; Barth, *et al.*, 1995).

El ozono ha sido utilizado desde 1904 para la desinfección de agua municipal, de aguas de proceso, de piscinas, purificación de agua y como desinfectante de frutas (manzana, melocotón, fresa, pera, zarzamora, cereza, zanahoria, cebolla, papa, tomate, pepino y mango) y alimentos almacenados desde 1930 (Ewell, 1938; Berger y Hansen, 1965; Sciumbato y Hegwood, 1978; Hampson, 1985; Ogawa *et al.*, 1990; Spotts y Cervantes, 1989 y 1992; Liew, *et al.*, 1994; Barth, *et al.*, 1995; Gooch, 1996; Ridley y Sims, 1996; Barbosa, *et al.*, 2002).

8.1.4. Estudios histopatológicos en mango

Se han realizado muchos estudios relacionados con *C. gloeosporioides* (Daquioag y Quimo, 1978; Fitzell y Peak, 1984; Jeffries, et al., 1990; Dodd, et al., 1991; Bailey y Jerger, 1992; Prusky y Plumbley, 1992; Nieto-Angel, et al., 1997; Wattad, et al., 1997; Arauz, 2000; Kahmann y Basse, 2001), pero pocos histopatológicos con relación a la interacción mango-*C. gloeosporioides* (Ruiz, 2001).

Se ha observado que después de la inoculación de conidios de *C. gloeosporioides* sobre la cáscara de frutos de mango, se forma el tubo germinativo inicialmente, el cual se hincha para desarrollar el apresorio, más tarde se forma una punta de infección que penetra la cutícula y se desarrolla por debajo de la cutícula o dentro de las paredes de las células epidérmicas un pequeño estroma. El patógeno se mantiene por un período en estado de latencia (Simmonds, 1941, 1963; Daquioag y Quimo, 1978). Dodd y colaboradores (1992) y Prusky y Plumbley (1992) indican que la punta infectiva se mantiene en estado de latencia entre la cutícula y las células epidérmicas subyacentes (Prior *et al.*, 1992; Nieto, *et al.*, 1997). Por lo que el patógeno infecta de manera limitada el tejido del hospedante durante la etapa de quiescencia (Ruiz, 2001). *C. gloeosporioides* reanuda su desarrollo al inicio de la maduración del fruto (Droby *et al.*, 1986). En frutos infectados se anticipa el aumento en la tasa respiratoria y en la producción de etileno, ocasionando la maduración más rápida del fruto y el cambio de color se produce antes de lo normal (Schiffmann-Nadel *et al.*, 1984).

Ruiz (2001), observó que las alteraciones celulares que el hongo induce en los tejidos infectados son aumento y oxidación de polifenoles, acumulación de almidón y necrosis celular. Por lo que la infección sobre la epidermis de los frutos se manifiesta durante la maduración como lesiones de color café oscuro a negras con bordes indefinidos (Nieto *et al.* 1997; Arauz, 2000).

8.2. OBJETIVO

Evaluar la efectividad del ozono para la prevención postcosecha de antracnosis en frutos de mango.

8.3. MATERIALES Y MÉTODOS

8.3.1. Obtención, aislamiento y cultivo de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz.

Para el primer experimento (del año 2002), la cepa pura de *C. gloeosporioides* fue proporcionada por el laboratorio de Enfermedades Postcosecha del Colegio de Postgraduados. Mientras que la cepa que se utilizó para la repetición del experimento en el año 2003, fue aislada de frutos con síntomas de antracnosis en el laboratorio de Ecofisiología de la UAM – Iztapalapa siguiendo la metodología descrita en Agrios, 1998 y proporcionada por el Dr. Nieto Angel (Apéndices 10 y 11; comunicación personal, 2003). Una vez que se tuvieron los cultivos puros, el hongo se incrementó en cajas de Petri con 35 ml de PDA (Apéndice 9). La esporulación se desarrolló a los 10 días.

Posteriormente, se procedió a recuperar las esporas por arrastre, agregando 10 ml de detergente Tween 20 (polioxietilen sorbitan monolaurato) al 2%, a cada una de las cajas con cultivo, se agitó levemente durante 20 min. Las suspensiones se vertieron en un solo matraz para calcular el número de esporas con una cámara de Neubauer. La cámara se montó en el microscopio compuesto y se contaron las esporas de los cinco cuadros principales (C.P.) con el objetivo de 10X, el número de esporas por centímetro cúbico (cc) se estimó con la fórmula siguiente (French y Hebert, 1982):

$$\text{Suma de 5 C.P.} \times 2000 = \text{Número de esporas/cc}$$

Posteriormente se agregó 1 ml de la solución stock a tubos Ependorff. Se separaron las esporas del detergente por centrifugación (10 000 rpm durante 10 min).

8.3.2. Evaluación de la germinación de esporas a diferentes concentraciones de ozono

Se constituyeron 3 lotes: lote control y dos lotes con esporas tratadas a 2 concentraciones de ozono: 0.8 y 2.0 mg. L⁻¹ durante 15 minutos a temperatura menor a 20 °C. Se separaron las esporas de cada lote por centrifugación a 10 000 rpm durante 10 min y se desechó el sobrenadante para resuspender la pastilla en agua destilada estéril. A partir de agua destilada a 7°C, se obtuvo agua ozonada con un equipo generador de ozono (Pacific Technology Ozone modelo L21) en un sistema cerrado de burbujeo constante y las concentraciones se midieron con el método de trisulfato índigo de potasio y Kit Colorimétrico marca Hach.

El porcentaje de germinación se evaluó con las esporas colocadas en los tubos Ependorff con agua destilada estéril a las 24, 48 y 72 horas después del contacto con ozono, utilizando una cámara de Neubauer. El criterio utilizado para considerar que los conidios habían germinado fue la emergencia del tubo germinativo. Posteriormente, de cada tratamiento se apartaron porciones de muestra para fijarlas en glutaraldehído al 6% con buffer de fosfatos para su procesamiento con técnicas de microscopía electrónica.

8.3.3. Evaluación de crecimiento micelial

Inmediatamente después de que las esporas fueron tratadas con ozono y se resuspendieron en agua destilada estéril, se tomó una alícuota de la suspensión de cada uno de los tubos y se colocó individualmente sobre placas de PDA, se incubaron a 25 ± 2°C. El crecimiento micelial se midió diariamente hasta que el hongo llenó la caja de Petri. El crecimiento se midió en mm por unidad de tiempo (mm/día).

8.3.4. Esporulación

Una vez que las colonias llenaron las cajas de Petri, del borde de las colonias se tomó un disco de medio de cultivo con un sacabocados, conteniendo micelio del hongo, el disco se

colocó en 2 ml de agua más Tween 20 al 2% y se agitó por 10 min, se cuantificó el número de conidios por ml con la ayuda de una cámara de Neubauer.

8.3.5. Evaluación de patogenicidad

Frutos de mango en estado sazón de las variedades ‘Haden’ y ‘Manila’ se inocularon las esporas tratadas con ozono y las control. Los nueve frutos de los lotes control fueron asperjados con 5 ml de agua destilada estéril. Los nueve frutos de los lotes 1 se asperjaron con 5 ml de suspensión de esporas sin tratamiento de ozono, los frutos del lote 2 fueron asperjados con 5 ml de solución de esporas tratadas con ozono a una concentración de 2.0 mg.L⁻¹; el tiempo de exposición para ambos lotes fue de 15 min. A un tercer lote, se les asperjó esporas sin tratamiento de ozono, después de 12 h los frutos se sumergieron en agua con ozono a una concentración mayor a 2.0 mg.L⁻¹ durante 15 min. Posteriormente todos los lotes se mantuvieron en cámara húmeda (charolas de plástico con papel absorbente humedecido con agua destilada estéril) y a temperatura ambiente (25 ± 2°C) durante 11 días. Se evaluó la incidencia y severidad de los síntomas, se cuantificó el número de manchas mayores a 1 cm provocadas por el hongo y el porcentaje de severidad se calculó con base a la superficie total del fruto. La severidad se determinó mediante una escala de ocho clases: 1 mancha = 0% de severidad; 2 = 1.44%; 3 = 2.77; 4 = 5.29%; 6 = 17.61%; 7 = 29.49%; 8 = 45% (Horsfall y Barratt, 1945) .

Se tomaron fracciones de 0.5 cm² del área inoculada (exocarpo y mesocarpo) de algunos frutos, a las 12, 24, 48, 72, 96, 120 y 216 h después de la inoculación y se fijaron en FAA para la obtención y observación de cortes para microscopía óptica y electrónica, de esta manera observar la interacción de los frutos de mango con *C. gloeosporioides*.

8.3.6. Preparación de muestras para microscopía de transmisión

Se obtuvieron secciones de 0.5 mm de grosor y hasta 0.5 cm de longitud, se siguió el mismo procedimiento que para microscopía de barrido hasta la deshidratación, después las muestras se incluyeron en soluciones graduales de óxido de propileno-Epon (Apéndice 7)

en proporciones 3:1, 2:1 durante 30 min, después un cambio 1:1, en el cual permanecieron durante una hora. Posteriormente las muestras pasaron por dos cambios de óxido de propileno durante 15 min el primero y toda una noche, el segundo. Se colocaron en moldes con Epon. La resina Epon con las muestras se polimerizaron a 60°C durante 48 h. A cada bloque de Epon se le hizo una piramide, de tal manera que la muestra quedó en el centro de la misma. Las muestras incluidas en Epon se cortaron en ultramicrotomo (Mod. RMC, MT-700), los cortes se hicieron seriados con un grosor de 60 a 90 nm. Se montaron en rejillas y se tiñeron con dos colorantes para dar contraste: acetato de uranilo al 2% en alcohol al 50% y citrato de plomo (Apéndice 8) (Bozzola, *et al*, 1991), se observaron al microscopio electrónico de transmisión (LEO 910) y se obtuvieron micrografías.

8.3.7. *Análisis estadístico*

Los datos se graficaron en los programas Excel y Statistica (Versión 4.5, USA), se realizaron análisis de varianza y comparación de medias por el método de Tukey.

8.4. RESULTADOS

8.4.1. *Evaluación de la germinación de esporas a diferentes concentraciones de ozono*

Al evaluar las esporas de *C. gloeosporioides*, se observaron conidios hialinos de una sola célula, cilíndricos o elípticos, con ápices redondeados, con un tamaño que varía entre 3.5 a 6 µm de ancho y de 12 a 18 µm de largo (Fig. 16a y 16b), estas características coinciden con lo reportado por Bayley y Jerger (1992).

Las esporas control germinaron en más de 97%, mientras que las esporas tratadas con ozono a una concentración de 2.0 mg.L⁻¹ germinaron en menos de 2%, la concentración de 0.8 mg.L⁻¹ de ozono resultó ser también muy eficaz, aunque menor que la de 2.0 mg.L⁻¹ (Gráfica 7).

Al observar las esporas que no germinaron en el microscopio óptico, solamente se percibió que presentaban pérdida de densidad citoplasmática, las observaciones realizadas con MET muestran cambios en la integridad de la ultraestructura de la pared y membrana celular. En las esporas control se observó una pared íntegra y definida. Antes de que las esporas germinen realizan algunos intercambios de pared, lo cual permite que la espora crezca y se mantenga a pesar de la presencia de condiciones de estrés. Previa a la germinación el citoplasma tiende a hialinizarse dejando al descubierto algunos organelos como las mitocondrias y ribosomas (Ponce de León, et al., 2001). La pared se observó un poco flácida, lo que probablemente le permita realizar la proyección del tubo germinativo y la formación del apresorio (fig. 16b).

Las esporas tratadas con 0.8 mg.L^{-1} de ozono, presentaron la formación de una gran cantidad de microcuerpos de almacenamiento de lípidos (cuerpos lipídicos) (Fig. 16c), dicho fenómeno se lleva a cabo en células eucarióticas en condiciones de estrés metabólico, se denomina sustitución de organelos y es una manera de almacenar nutrientes. En este estudio tal fenómeno se puede interpretar como una defensa preventiva ante el efecto oxidativo del ozono. Tal desorganización metabólica disminuye la capacidad fisiológica de germinar.

Las imágenes muestran que las esporas provenientes del tratamiento más agresivo (mayor a 2.0 mg.L^{-1} de ozono), no solo perdieron citoplasma, sino también la continuidad y forma en las paredes (Fig. 16d y 16e). El ozono ataca rápidamente las paredes gruesas de las esporas de *C. gloeosporioides* en una concentración alta. El proceso de intercambio de pared celular no es continuo, es decir, está desfasado, ya que la espora tiende a acumular el material de las primeras capas de pared como una respuesta de defensa al ozono, el poder oxidativo del ozono y la formación de radicales libres provocan: reducción del tamaño de las mitocondrias y ribosomas, sustitución de organelos por vacuolas de almacenamiento, degradación del citoplasma y de la membrana nuclear. En estas condiciones, la mayor parte de las esporas expuestas a 2.0 mg.L^{-1} no germinan y por lo tanto mueren.

8.4.2. Evaluación del Crecimiento Micelial

En la gráfica 8 se presenta la tasa de crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* después de 10 días de incubación (Fig. 16f), expuestas a dos concentraciones de ozono y esporas control. El tratamiento que presentó mejores resultados, es decir, que disminuyó considerablemente el crecimiento micelial, fue el de esporas expuestas a una concentración mayor a 2.0 mg. L⁻¹ de ozono. Las esporas expuestas a 0.8 mg. L⁻¹ de ozono, al encontrarse en un medio rico en nutrientes (medio de cultivo PDA), presentaron un crecimiento micelial más parecido al de las esporas control (F =3.13, P=0.001263). Lo cual, nos indica que el efecto del ozono a concentración de 0.8 mg.L⁻¹ no fue suficiente para evitar que las esporas continúen con su desarrollo.

8.4.3. Esporulación

Una vez que se midió el crecimiento micelial las esporas se recuperaron por arrastre con Tween 20, para evaluar la esporulación del micelio en las colonias de cada tratamiento. Los resultados obtenidos se presentan en la gráfica 9. Los cultivos que presentaron un mayor número de esporas, fueron los de las cajas control (aproximadamente 650,000 esporas por cm³), después los de las cajas con esporas tratadas con 0.8 mg. L⁻¹ de ozono (cerca de 400,000 esporas por cm³) y, los cultivos que esporularon más pobremente fueron los sembrados con esporas expuestas a 2.0 mg. L⁻¹ de ozono (menos de 60,000 esporas por cm³).

8.4.4. Evaluación de patogenicidad en frutos

La patogenicidad de las esporas de *C. gloeosporioides* se evaluó en frutos de las variedades 'Haden' y 'Manila', durante once días después de la inoculación.

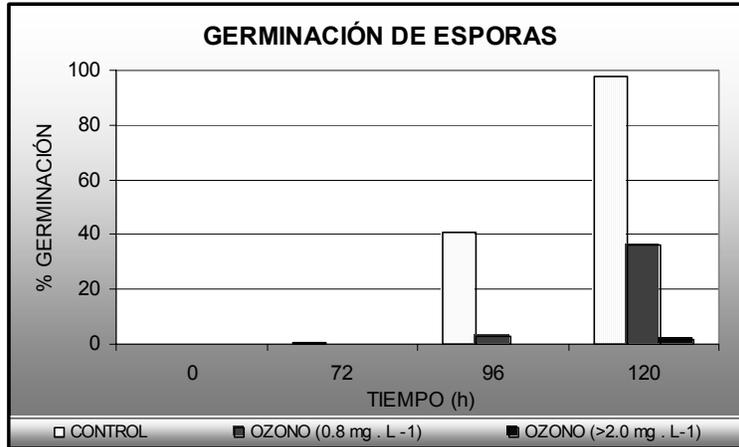
Los primeros síntomas ocasionados por *C. gloeosporioides* son lenticelas oscurecidas y lesiones de tamaños muy pequeños que aparecen en toda la superficie del fruto, en la variedad 'Manila' se presentaron 96 h después de la inoculación, mientras que 'Haden'

comenzaron a aparecer a las 120 h. Durante los primeros días las lesiones se limitaron a la cáscara del fruto, sin embargo, a los once días, el hongo invadió parte de la pulpa y se formaron hundimientos en la superficie del fruto y se produjeron masas de esporas. Después de once días de incubación las manchas se presentaron en casi el 45% de la superficie de los frutos de la var. 'Manila' (Gráf. 12; Fig. 18). Mientras que la severidad fue de 5.25% en 'Haden' (Gráf. 12; Fig. 17). Según Swinburne (1983), las diferencias en el desarrollo de la enfermedad se deben en parte a condiciones adversas impuestas por el hospedante, ya sea por la presencia de compuestos antifúngales preformados o inducidos (Green y Morales, 1967; Prusky *et al*, 1983), o bien, por los niveles inadecuados de nutrición en los frutos (Verhoeff, 1974). En el caso de las dos variedades estudiadas en este trabajo, también pueden influir las características morfológicas de cada cultivar, así como el proceso de desarrollo característico de cada variedad. En los frutos de la variedad 'Manila', se producen los eventos asociados a la madurez y senescencia de manera más acelerada que en los frutos 'Haden', y por lo tanto, se observa un ablandamiento de los tejidos más rápido, dicho ablandamiento está relacionado con la producción de etileno que puede ser una señal para que las esporas de *C. gloeosporioides* germinen y se desarrollen dentro del fruto.

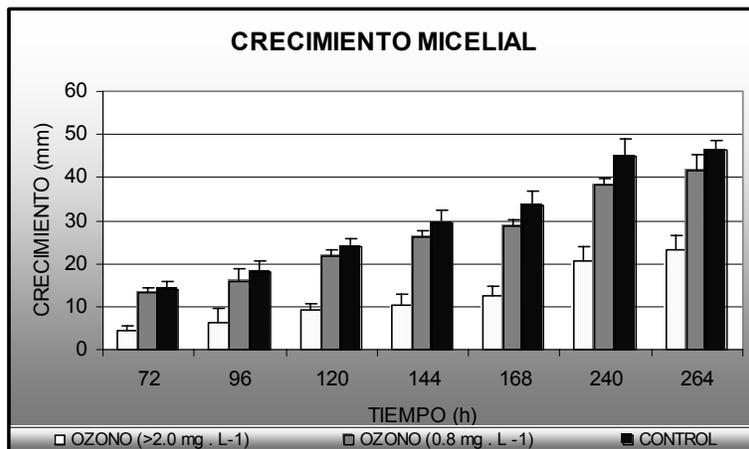
Las diferencias en el número de manchas necróticas provocadas por la infección, es mayor en los frutos inoculados con esporas de *C. gloeosporioides* sin tratamiento de ozono; después de 72 h de la inoculación inició la aparición de manchas en la var. 'Manila'; mientras que en los frutos tratados con ozono los síntomas se observaron hasta las 96 h. El lote en el cual se controló mejor la antracnosis, fue el de mangos inoculados con esporas tratadas con 2.0 mg. L⁻¹ de ozono durante 15 min, sólo se observó daño en un 5.25% en los mangos de la variedad 'Haden' y del 25% de severidad en la var. 'Manila'. El lote de mangos inoculados con esporas de *C. gloeosporioides* y tratados con ozono después de transcurridas 12 horas, presentó una área necrótica ligeramente inferior al lote de mangos inoculados y sin tratamiento de ozono, lo que indicó que las 12 horas posteriores a la inoculación, fueron determinantes para el desarrollo de la enfermedad y que no es posible controlar la infección sobre los frutos una vez que se encuentra bien establecida (Fig. 17 y 18).

El género *Colletotrichum* se ha clasificado como hemiotrófico (Mendengen y Hahn, 2002). Durante las primeras etapas de su desarrollo (adhesión, formación del apresorio y penetración), provoca daño mínimo a las células huésped, esto se debe a que la pared del hongo se encuentra separada del protoplasto celular por una matriz extracitoplásmica formada de glicoproteínas, ésta se conecta con el apoplasto de la célula en la interfase del estado biotrófico a necrotrófico. Uno o dos días después de la penetración, la membrana plasmática comienza a desintegrarse lo que lleva a la muerte de la célula. Posteriormente nuevas células son colonizadas por hifas primarias, por lo que se presenta una muerte celular masiva. Se desarrollan entonces, hifas secundarias y se pierde la matriz interfacial. Las paredes de las células huésped se rompen debido a que las hifas secundarias secretan grandes cantidades de enzimas hidrolíticas (endo y exopoligalacturonasas), para obtener nutrientes de las células de la planta y otras (pectato liasa y celobiohidrolasas) que reducen las reacciones de defensa del huésped (producción de oligosacaridos, epicatequinas, etc.) (Esquerré-Tugayé, *et al.*, 2000; Kahmann y Basse, 2001; Mendengen y Hahn, 2002).

Después de 11 días de haber inoculado los frutos, el desarrollo de la patogénesis avanza hasta su fase necrotrófica. La infección sobre la epidermis de los frutos se manifiesta en lesiones de color café oscuro a negras con bordes indefinidos y hundimientos en la superficie del fruto y necrosis en la pulpa. Se observa la colonización de los tejidos por hifas primarias y secundarias (micelio), que provocan diversas alteraciones celulares como rompimiento de paredes y pérdida de contenidos citoplasmáticos que constituyen zonas necróticas en epidermis, colénquima y parénquima (Fig. 19 y 20); se observa aumento considerable en la oxidación de polifenoles, principalmente en la zona del colénquima que resulta en los colores oscuros típicos de la sintomatología de la enfermedad, la producción de polifenoles es mayor en la variedad 'Haden'. El colapso y la degradación de las paredes celulares del parénquima se observó en menor grado en los frutos de la variedad 'Haden' (Fig. 19 y 20).



Gráfica 7. Germinación de esporas de *C. gloeosporioides* expuestas a diferentes concentraciones de ozono



Gráfica 8. Crecimiento micelial en colonias de esporas de *C. gloeosporioides* tratadas con diferentes concentraciones de ozono



Gráfica 9. Esporulación de colonias de *C. gloeosporioides* expuestas a diferentes concentraciones de ozono

Pie de figuras 16. **a)** Micrografía de barrido de una espora de *C. gloeosporioides* sin tratamiento de ozono (control), (1000x, barra = 3µm), **b)** Micrografía de transmisión de una espora sin tratamiento de ozono (control), (15000x, barra = 2 µm), se distinguen el núcleo y varias mitocondrias; **c)** Micrografía de transmisión de una espora tratada con 0.8 mg.L-1 de ozono (10000x, barra = 6µm), donde se observan cuerpos lipídicos, que se han cambiado por los organelos que se observan en la espora control; **d)** Micrografía de transmisión de esporas tratadas con 2.0 mg.L-1 de ozono (10000x, barra = 6µm), se observa degradación del citoplasma de las células; **e)** Acercamiento de la pared de la espora tratada con 2.0 mg.L-1 de ozono, donde se observa el proceso de cambio de pared (30000x, barra = 0.8 µm); **f)** cajas de Petri con micelio de *C. gloeosporioides* después de 10 días de incubación. **n** (núcleo), **m** (mitocondrias), **cl** (cuerpos lipídicos), **c** (citoplasma degradado), **cp** (cambio de pared).

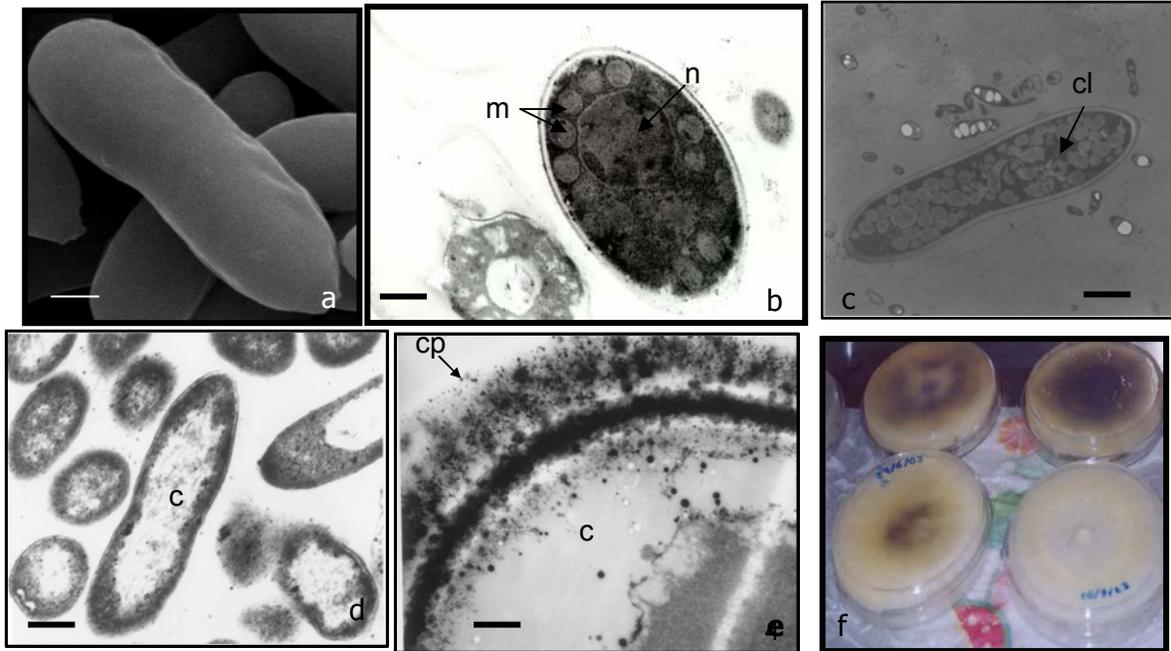


Fig. 16 a) Espora de *C. gloeosporioides* control, SEM (1000x, barra = 6 μ), b) control, TEM (15000x), c) 0.8 mg.L⁻¹ O₃ (10000x), (cp) cuerpos lipídicos; d) 2.0 mg.L⁻¹ O₃ (10000x), e) 2.0 mg.L⁻¹ O₃ (30000x), f) cajas de Petri con micelio de *C. gloeosporioides* después de 10 días de incubación.



Frutos inoculados con esporas tratadas con ozono



Frutos control



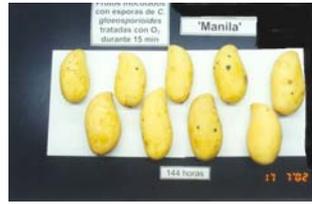
Frutos inoculados con esporas sin tratamiento y sumergidos en agua ozonada después de 12 h

Fig. 17. Frutos de la var.



Frutos inoculados con esporas de *C. gloeosporioides* sin tratamiento de ozono





Frutos inoculados con esporas tratadas con ozono



Frutos control



Frutos inoculados con esporas sin tratamiento y sumergidos en agua ozonada después de 12 h

Fig. 18. Frutos de la var. 'Manila'



6 días



10 días

Frutos inoculados con esporas de *C. gloeosporioides* sin tratamiento de ozono

Pies de figuras 19 y 20

Figura 19. Tejidos dañados de frutos maduros var. ‘Haden’, **a)** Epidermis de un fruto inoculado con esporas de *C. gloeosporioides* tratadas con 2.0 mg.L-1 de ozono antes de la inoculación, se observa degradación de las células epidérmicas e hipodérmicas; **b)** Mesocarpo de fruto inoculado con esporas de *C. gloeosporioides* tratadas con 2.0 mg.L-1 de ozono antes de la inoculación, se observa degradación de las paredes parenquimáticas más externas y la colonización del tejido por hifas primarias y secundarias; **c)** Mesocarpo de un fruto inoculado con esporas de *C. gloeosporioides* tratadas con 2.0 mg.L-1 de ozono antes de la inoculación, hay degradación de las células de parénquima más interno, pero no hay colonización del hongo; **d)** Epidermis de un fruto inoculado con esporas de *C. gloeosporioides* sin tratamiento de ozono, pero sumergido en agua ozonada (2.0 mg.L-1 de ozono) 12 h después de la inoculación, se observa degradación de las células epidérmicas e hipodérmicas; **e)** Mesocarpo de fruto inoculado con esporas de *C. gloeosporioides* sin tratamiento de ozono, pero sumergido en agua ozonada (2.0 mg.L-1 de ozono) 12 h después de la inoculación, se observa colonización del hongo en el parénquima más externo; **f)** Mesocarpo interno de fruto inoculado con esporas de *C. gloeosporioides* sin tratamiento de ozono, pero sumergido en agua ozonada (2.0 mg.L-1 de ozono) 12 h después de la inoculación, se observa degradación de paredes celulares; **g)** Epidermis de un fruto inoculado con esporas de *C. gloeosporioides* sin ningún tratamiento de ozono, se observa degradación de las células epidérmicas e hipodérmicas; **h)** Mesocarpo de un fruto inoculado con esporas de *C. gloeosporioides* sin ningún tratamiento de ozono, se observa colonización del hifas primarias y secundarias en las células más externas del mesocarpo; **i)** Células de parénquima interno de un fruto inoculado con esporas de *C. gloeosporioides* sin ningún tratamiento de ozono, se observa degradación de paredes celulares. La barra en las fotos equivale a **25 µm**. **epx** (epidermis externa), **cu** (cutícula), **cs** (canales secretores), **ch** (células hipodérmicas), **hi** (hifas), **pax** (células de parénquima colonizadas por hifas), **pa** (parénquima).

Figura 20. Tejidos dañados de frutos maduros var. ‘Manila’, **a)** Epidermis de un fruto inoculado con esporas de *C. gloeosporioides* tratadas con 2.0 mg.L-1 de ozono antes de la inoculación, se observa rompimiento de la epidermis y la cutícula por la formación de un acérvulo; **b)** Mesocarpo de fruto inoculado con esporas de *C. gloeosporioides* tratadas con 2.0 mg.L-1 de ozono antes de la inoculación, se observa degradación de las paredes parenquimáticas más externas y la colonización del tejido por hifas primarias y secundarias; **c)** Mesocarpo de un fruto inoculado con esporas de *C. gloeosporioides* tratadas con 2.0 mg.L-1 de ozono antes de la inoculación, hay degradación de las células de parénquima más interno, pero no hay colonización del hongo; **d)** Epidermis de un fruto inoculado con esporas de *C. gloeosporioides* sin tratamiento de ozono, pero sumergido en agua ozonada (2.0 mg.L-1 de ozono) 12 h después de la inoculación, se observa degradación de las células epidérmicas e hipodérmicas; **e)** Mesocarpo de fruto inoculado con esporas de *C. gloeosporioides* sin tratamiento de ozono, pero sumergido en agua ozonada (2.0 mg.L-1 de ozono) 12 h después de la inoculación, se observa colonización del hongo en el parénquima más externo; **f)** Mesocarpo interno de fruto inoculado con esporas de *C. gloeosporioides* sin tratamiento de ozono, pero sumergido en agua ozonada (2.0 mg.L-1 de ozono) 12 h después de la inoculación, se observa degradación de paredes celulares; **g)** Epidermis de un fruto inoculado con esporas de *C. gloeosporioides* sin ningún tratamiento de ozono, se observa degradación de las células epidérmicas e hipodérmicas; **h)** Mesocarpo de un fruto inoculado con esporas de *C. gloeosporioides* sin ningún tratamiento de ozono, se observa colonización del hifas primarias y secundarias en las células más externas del mesocarpo; **i)** Células de parénquima interno de un fruto inoculado con esporas de *C. gloeosporioides* sin ningún tratamiento de ozono, se observa degradación de paredes celulares. La barra en las fotos equivale a **25 µm**. **ac** (acérvulo con esporas de *C. gloeosporioides*), **epx** (epidermis externa), **cu** (cutícula), **cs** (canales secretores), **ch** (células hipodérmicas), **hi** (hifas), **pax** (células de parénquima colonizadas por hifas), **pa** (parénquima).

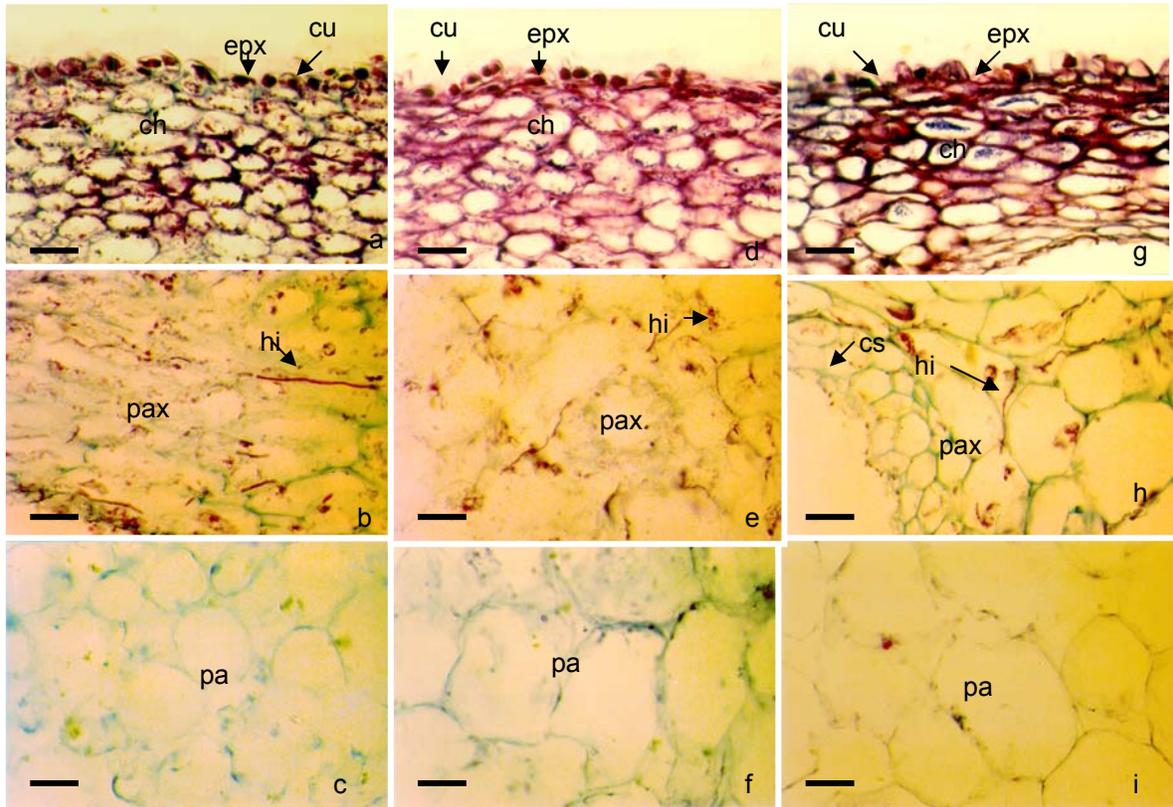


Fig. 19. Daños provocados por *C. gloesporioides* en epidermis y parénquima en frutos var. 'Haden' expuestos a diferentes tratamientos de ozono. Barra = 25 μ .

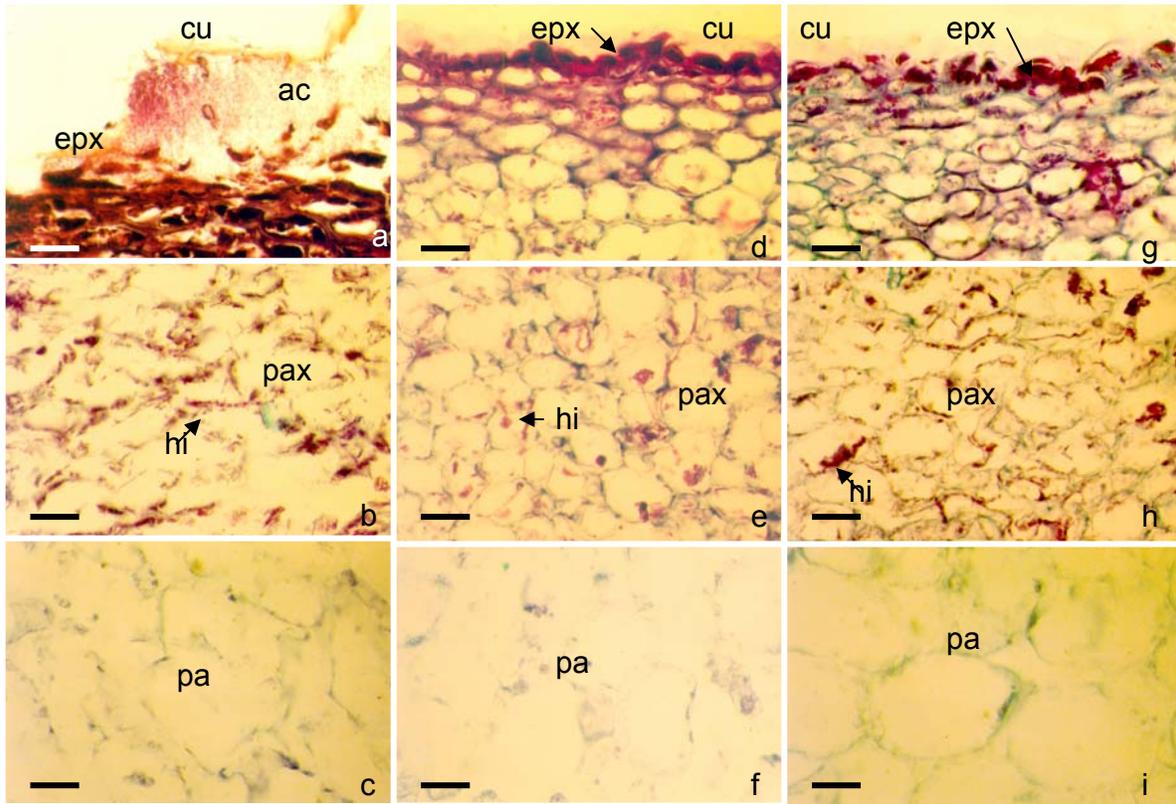
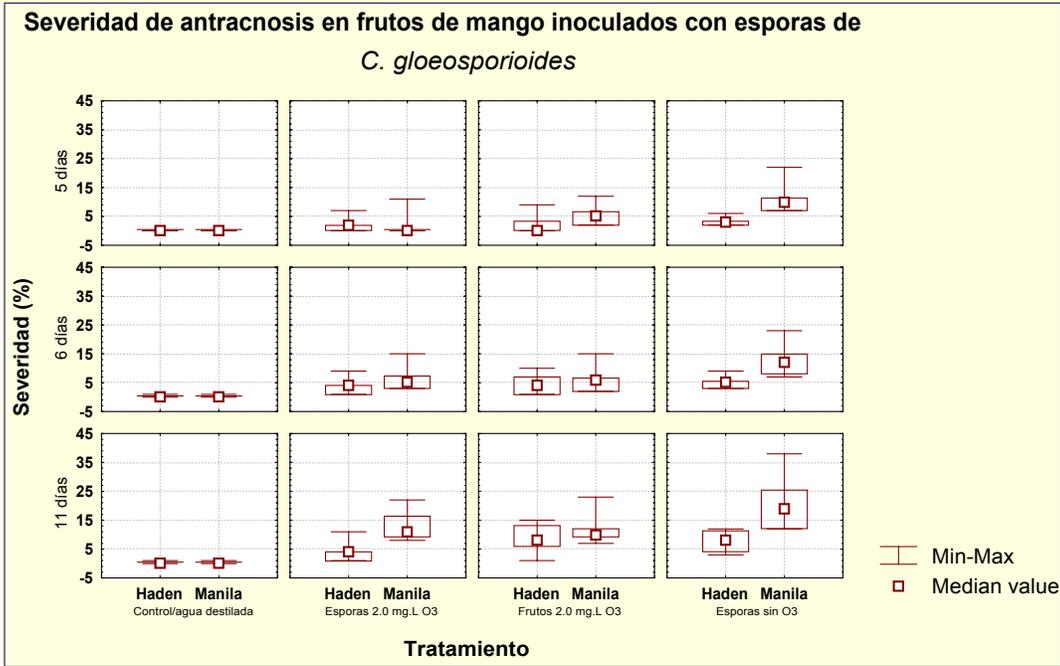


Fig. 20. Daños provocados por *C. gloesporioides* en epidermis y parénquima en frutos var. 'Manila' expuestos a diferentes tratamientos de ozono. Barra = 25 μ .



Gráfica 10. Severidad de antracnosis en frutos de mango var. 'Haden' y 'Manila' inoculados con esporas de *C. gloeosporioides* Penz.

8.5. DISCUSIÓN

El ozono representa una alternativa viable para la prevención de la antracnosis y no ofrece efectos adversos a la salud y al ambiente. El ozono puede ser incorporado en los empaques como un método de control para limitar el uso del control químico tradicional (benomil, tiabendazol, prochloraz, imazalil, etc.) y sus efectos: contaminación y generación de resistencia en *C. gloeosporioides* y otros patógenos. Cabe señalar que los funguicidas para prevenir antracnosis se aplican durante la floración, los resultados histológicos refuerzan esta práctica, ya que la flor y el fruto en etapa I presentan la cutícula más delgada y susceptible a la instalación del patógeno

En una concentración de 2.0 mg.L^{-1} , el ozono es eficaz para controlar la germinación de esporas de *C. gloeosporioides* en un medio acuoso; sin embargo cuando las esporas tratadas a diferentes concentraciones de ozono se sembraron sobre medio de cultivo PDA, el desarrollo de micelio se presentó en todos los casos, pero disminuyó considerablemente con respecto a los cultivos control en esporas tratadas con 2.0 mg.L^{-1} de ozono. La esporulación de los cultivos también disminuyó notablemente en esta concentración.

No se encontraron diferencias histológicas en los frutos inoculados con esporas de *C. gloeosporioides* con tratamiento y sin tratamiento de ozono, en todos los casos se desarrolló la enfermedad. Sin embargo, entre las dos variedades sí hubo diferencias notorias, tanto histológicamente como en los síntomas visibles.

Las diferencias histológicas de las dos variedades pueden explicar las variaciones en el desarrollo de la patogénesis de *C. gloeosporioides*. La mayor cantidad de sólidos solubles totales en la variedad 'Manila', permite que la degradación del parénquima sea más rápida y la infección del hongo llegue hasta su fase final con la formación de acérvulos y diseminación de esporas. Por otro lado, el número de capas de colénquima en la variedad 'Manila' es menor que en 'Haden' y además, las células del mesocarpo presentan un tamaño mayor y espacios intercelulares más abundantes, lo que también contribuye a que se facilite la infección en 'Manila'.

La infección se inició en los frutos cuando estos alcanzaron la madurez fisiológica, esto coincide con otros estudios donde se ha encontrado que el apresorio permanece latente hasta que el fruto alcanza la madurez fisiológica y posteriormente se realiza la penetración de la punta infectiva (Simmonds, 1941, 1963; Daquioag y Quimo, 1978; Jeffries *et al*, 1990; Prusky y Plumbley, 1992),

Se ha demostrado que el etileno también induce la germinación de esporas y formación del apresorio y por lo tanto, la probabilidad de que se presente la infección durante la maduración del fruto es más alta (Nieto *et al* 1997; Knogge, 1998; Arauz, 2000;). Cuando *C. gloeosporioides* reanuda su desarrollo al inicio de la maduración (Droby *et al*, 1986) en frutos infectados se anticipa el aumento en la tasa respiratoria y en la producción de etileno, el cual dispara la síntesis de poligalacturonasas, enzimas responsables del ablandamiento, ocasionando así la maduración temprana del fruto y el cambio de color se adelanta (Schiffmann-Nadel *et al*, 1984), como se observó en los frutos estudiados.

La producción de fenoles aumentó después de que se produjo la infección, según Agrios, (1995), la producción de fenoles en el fruto es estimulada por patógenos, agentes químicos o daño mecánico. En el caso de la var. 'Haden' se observó una mayor producción de polifenoles (taninos), lo cual pudo contribuir a retrasar el desarrollo de *C. gloeosporioides*.

8.6. CONCLUSIONES

El ozono es un germicida eficaz para inhibir la germinación de esporas de *C. gloeosporioides* y puede contemplarse como un buen método de prevención de antracnosis a una concentración de 2.0 mg.L⁻¹ de ozono, tiene la ventaja sobre los métodos tradicionales como el tiabendazol o el benomil de no dejar residuos tóxicos y sin que se reduzca sensiblemente la calidad de los frutos de mango.

Existen mecanismos de resistencia metabólicos y estructurales contra el estrés oxidativo generado por el ozono. Debido a que el ozono logra inhibir momentaneamente la

germinación de *C. gloeosporioides*, pero cuando las esporas se encuentran en un sustrato rico en nutrientes y logran establecerse para iniciar la infección o ésta se encuentra en estados de desarrollo avanzado, no se puede controlar la infección, por lo que el ozono debe verse como una alternativa de prevención y no como un tratamiento curativo de la antracnosis en frutos de mango.

9. BIBLIOGRAFIA

- Agrios, N.G. 1998. Fitopatología. UTEA. México. pp. 98-116.
- Alahakoon, P. W., A. E. Brown, y S. Sreenivasaprasad, 1994. Cross-infection potencial of genetic groups of *Colletotrichum gloeosporioides* on tropical fruits. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 44:93-103.
- Alexopoulos, C.J. y C.W. Mims. 1985. Introducción a la micología. Omega. Barcelona, pp. 327-338.
- Anderson, D.L., M. Seldglade, J.R.T. Short y A. J. Allchwood. 1982. Insect pollination of mango in Northern Australia. *Australian Journal of Agriculture Research* 33:541-548.
- Arauz, F.L. 2000. Mango anthracnose: economic impact and current options for integrate management. *Plant Disease Reporter* 84:600-611.
- Ardi, R., I. Kobiler, B. Jacoby, N. T. Keen y D. Prusky. 1998. Involvement of epicatechin biosynthesis in the activation of the mechanism of resistance of avocado fruit to *Colletotrichum gloeosporioides*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 53:5-6:269-285.
- Báez, S. R. 1998. Manejo y conservación del mango en postcosecha. Foro internacional de mango y otras frutas tropicales. Mazatlán, Sin., México, 16 y 17 de febrero de 1998. Abstract 9 pp.
- Bailey J. A. y M. J. Jerger. 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. En: *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Bailey, J.A. y M. J. Jerger (eds.) CAB International, Oxon, UK. pp:83-133.
- Barbosa, M.C., I.V. García, C.E. Jiménez, C.G. Hernández y G.L. Ponce de León. 1999. Histología de los verticilos florales de *Mangifera indica* L. var. 'Haden'. VIII Congreso de Horticultura. Manzanillo 25-30 abril 1999. *Horticultura Mexicana* 7(1): 4.
- Barbosa, M.C., G.L. Ponce de León, S.J. Sepúlveda, A.D. Nieto y G.E. Guillén, 1999. Agua ozonizada una tecnología para eliminar patógenos del mango en postcosecha. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha* 1(2):170-177.
- Barclay, H.J. 1987. Models for pests control: complementary effects of periodic releases of sterile pests and parasitoids. *Theoretical Population Biology* 32:76-89.

- Barth, M.M., Zhou, C., Mercier, J. y F.A. Payne, 1995. Ozone storage effects on anthocyanin content and fungal growth in blackberries. *Journal of Food Science* 60:1286-1288.
- Berger, A. y H. Hansen, 1965. Storage of strawberries in ozone-containing air. (DE, FR, EN). *Die Industrielle Obs-und Gemuseverwertung* 15:602-604.
- Bósquez, M.E. 1992. Manual de prácticas de laboratorio de fisiología postcosecha de frutas y hortalizas. UAM-Iztapalapa. México, D.F. (práctica no. siete).
- Bósquez-Molina, E., G.L. Ponce de León, F. Díaz de León, C. Lifshitz y L. Pérez-Flores. 1996. Fundamentos fisiológicos de la calidad postcosecha del mango. *Ciencia* 47:138-140.
- Botzenhart, K., G.M. Tarcon y M. Ostruschka. 1993. Inactivation of bacteria and coliphages by ozone and chlorine dioxide in a continuous flow reactor. *Water Science and Technology* 27:363-370.
- Bowes B. G. 1998. Atlas en couleur. Structure des Plantes. INRA Editor. Paris. 192 p.
- Bozzola J.J. y L.D. Russell. 1991. *Electron Microscopy: Principles and Techniques*. Jones and Bartlett Publishers, Inc. Boston, USA.
- Campbell, R.J. 1992. *Mangos: A guide to Mangos in Florida*. Fairchild Tropical Garden Publ. Miami 200 p.
- Chandler, N.H. 1966. *Frutales de hoja perenne*. Hispanoamericana. México. 657p.
- Chaudhury A.M., A. Kolrunow, T. Payne, M. Luo, M.R. Tucker, E.S. Dennis y W.J. Peacock. 2001. Control of the early development of the seed. *Annual Review Cell Development Biology* 17:677-699.
- Coates, L. M., Cooke, A. W., y J. R. Dean. 1997. The response of mango stem end rot pathogens. *Acta Horticulturae* 455(2):762-761.
- Crane, J.H., I.S.E. Bally y R. Mosqueda-Vazquez. 1997. Crop production. En: *The mango: botany, production and uses*. Litz, R.E. (ed.) CAB International, Oxon, UK. pp. 225.
- Cunningham, I.C. 1984. Mango insect pests. Australian Mango Research Workshop. CSIRO, Melbourne pp. 211-224.
- Daquioag, V.R. y T.H. Quimo. 1978. Latent infection in mango caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Philippine Journal of Phytopathology* 15:35-36.

- De los Santos, R. F. y V. R. Mosqueda. 1989. Comparación de 21 cultivares y 12 selecciones mexicanas de mango *Mangifera indica* L. en la zona central del estado de Veracruz. *Revista Chapingo* 63:63-68.
- Deising Holger B., Stefan Werner y Marcus Wernitz. 2000. The role of fungal appressorian infection. *Microbes and Infection* (2)13:1631-1641.
- Diczballis, Y. 1994. Irrigation affects dry matter. *Mango Care Newsletter* 12:6-7.
- Dodd, J.C., R. Bugante, I. Koomen, P. Jeffries y M.J. Jerger. 1991. Pre- and postharvest control of mango anthracnose in the Philippines. *Plant Pathology* 40:576-583.
- Dodd, J.C., A.B. Estrada, J. Matcham, P. Jeffries y M.J. Jerger. 1992. The effect of climatic on *Colletotrichum gloeosporioides*, causal agent of mango anthracnose in Philippines. *Plant Pathology* 40:568-575.
- Dodd, C.J., D. Prusky y P. Jeffrie. 1997. Fruti disease. En: *The Mango: Botany, Production and Uses*. Litz, R.E. (ed.). CAB International, Oxon, UK, pp: 257-279.
- Droby, S.D. Prusky, B. Jacoby y A. Goldman. 1986. The presence of an antifungal compound and its relation to the latency of *Alternaria alternata* in unripe peels of mango fruits. *Physiology Molecular Plant Pathology* 29:173-183.
- Espinosa-Osornio, G. y E.M. Engleman. 1998. Breve recopilación de anatomía de semillas. Colegio de Posgraduados. Edo. de México, México. 45 p.
- Esquerra E.B. y M.C.C. Lizada. 1990. The postharvest behaviour and quality of “carabao” mangoes subjected to vapor heat treatment. *ASEAN Food Journal* 5:6-11.
- Esquerré-Tugayé, M-T., G. Boudart y B. Dumas. 2000. Cell wall degrading enzymes, inhibitory proteins, and oligosaccharides participate in the molecular dialogue between plants and pathogens. *Plant Physiology and Biochemistry* 38:1-2:157-163.
- Ewell, A. W. 1938. Present use and future prospects of ozone in food storage. *Food Resource* 3:101-108.
- FAO, 1999. Statistics on mango production. FAOSTAT Database.
- FAO, 2000. Statistics on mango production. FAOSTAT Database.
- FAO, 2001. Statistics on mango production. FAOSTAT Database.
- Fitzell, R.D. y C.M. Peak. 1984. The epidemiology of anthracnose disease of mango: inoculum sources, spore production and dispersal. *Annals of Applied Biology* 104:53-59.

- Fitzell, R.D. 1979. *Colletotrichum acutatum* as a cause of anthracnose of mango in New South Wales. Plant Disease Reporter 63:1067-1070.
- French, R.E. y T.T. Hebert. 1982 Métodos de investigación fitopatológica. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. San José, Costa Rica. pp. 173-179
- Galán, S.V. 1998. Situación mundial de la cadena productiva de mango. Foro internacional de mango y otras frutas tropicales. Mazatlán, Sin., México, 16 y 17 de febrero de 1998. 20p.
- Galán Saúco, V. 1999. El cultivo de mango. Mundi Prensa, Madrid, España. 298 p.
- García-Ireta, V., C. Barbosa-Martínez, R. Lara-Marbán, M.E., Cruz-Pascual, G. Hernández-Cardenas, D. Nieto-Angel y L. Ponce de León-García. 1999. Avances sobre la histología de los verticilos florales de *Mangifera indica* L. variedades 'Haden' y 'Kent'. Simposio Latinoamericano de Mango. Brasil 23-27 agosto 1999. Memorias.
- Gooch, J. J. 1996. Handling Michigan's mighty apple. American Fruit Grower 4:278-280.
- Gordon, M.F. 1979. Purificación de aguas y tratamiento y remoción de aguas residuales. Limusa, México. pp. 403-435.
- Graham, D.M. 1997. Uses of ozone for food processing. Food Technology 51:72-75.
- Gray, P. 1964. Handbook of basic microtechnique. McGraw-Hill Book Company. 3ª ed. New York. 302 p.
- Green, L. Y C. Morales. 1967. Tannins as the cause of latency in anthracnose infections of tropical fruits. Turrialba 17:447-449.
- Gutiérrez, A.J.G. 2001. Manejo integrado de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) del mango (*Mangifera indica* L.) en postcosecha. Tesis de Doctorado. Programa de Fitopatología, Colegio de Postgraduados. 104p.
- Guzman, E.C., O.A. Ireta 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. 33p.
- Guzman, E.C., Mosqueda, V.R., Alcalde, B.S. 1997. Content and extraction of several nutrients by mango fruits of 'Manila' cultivar. Acta Hort. 455:465-471.

- Hampson B. C. 1985. FDA protocol for the treatment of fresh-market tomatoes with ozone. Submitted to the Office of Premarket Approval, Center for Food Safety & Applied Nutrition, U.S. Food and Drug Administration.
- Hari, B. K. 1999. Hystological and histochemical changes in the 'Alfonso' mango fruit during growth, development, storage and ripening with reference to "spongy tissue" a post harvest disorder. VI International Mango Symposium, 6-9 abril, Tailandia. Working Abstracts. 83p.
- Herianus, J.D. Lalel, Zora Singh y Soon Chye Tan. 2003. Aroma volatiles production during fruit ripening of 'Kensington Pride' mango. *Postharvest Biology and Technology* 27:3:323 -336.
- Horsfall, J.G. y W.R. Barratt. 1945. An improved grading system for measuring plant disease. *Phytopathology* 33:655.
- Hulme, A.C. 1971. The mango: the biochemistry of fruits and their products. Academic Press, London. pp: 233-253.
- Hwang, C.S. y P.E. Kolattukudy. 1995. Isolation and characterization of genes expressed uniquely during appressorium formation by *Colletotrichum gloeosporioides* conidia by the host surface wax. *Molecular Genetic* 247:282-294.
- Ireta, O.A. 1988. Cultivo de mango y aguacate en el Valle de Culiacán. SARH-INIFAP-CIFAP-CAEVAC. Folleto para productores. Núm. 24.
- Ito, T., K. Sasaki, e Y. Yoshida. 1997. Changes in respiration rate, saccharide and organic acid content during the development and ripening of mango fruit (*Mangifera indica* L. 'Irwin') cultured in a plastic house. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 66(3-4):629-635
- Jeffries P., J.C. Dodd, M.J. Jerger y R.A. Plumbley 1990. The biology control of *Colletotrichum* species in tropical fruits. *Plan Pathology* 39:343-366.
- Jiron, L. F. e I. Hedstrom, 1985. Pollination ecology of mango (*Mangifera indica* L.) (Anacardiaceae) In the Neotropic region. *Turrialba* 35:269-277.
- Johnson, G. I., Mead, A. J., Cooke, A. W. y J.R. Dean, 1992. Control of stem end rot pathogens - fruit infection by endophytic colonisation of the inflorescence and pedicel. *Annals of Applied Biology* 120:225-234.

- 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. 1933. Floral Morphology of the Mango (*Mangifera indica* L.) with special references to the Pico variety from the Philipines. *The Philippine Agriculturist* 21:449-472.
- Kahmann R. y C. Basse. 2001. Fungal gene expresión during patogénesis-related development and host plant colonization. *Current Opinión in Microbiology* 4:374-380.
- Knogge, W. 1998. Fungal pathogenicity. *Current Opinión in Plant Biology* 1:324-328.
- Kobel, F. 1954. *Lehrbuch des Obstbaus (Auf Physiologischer Grundlage)*. Springer-Verlag, Berlin.
- Koltunow, A.M., T. Hidaka y S.P. Robinson. 1996. Polyembryony in citrus –accumulation of seed storage proteins in seeds and in embryos cultured in vitro. *Plant Physiology* 110:599-609.
- Kuriant, R.M. y C.P.A. Iyer. 1993. Chemical regulation of tree size in mango (*Mangifera indica* L.) cv. “Alphonso II” effect of growth retardant on flowering and fruit seed. *Journal of Horticultural Science* 68:355-360.
- Lakshminarayana, S., Subhendra, N. y H. Subramanyan. 1970. Some aspects of the development physiology of the mango fruit. *Journal of Horticultural Science* 45:133-142.
- Lakshminarayana, S. 1980. Mango. *En: Tropical and subtropical fruits: Composition, propieties and uses*. Nagy, S. And P.E. Shaw (eds.). Israel pp: 309-327.
- Lam, P.F., Ng D.Omar, K.H., e Y. Talib. 1982. Physical, physiological and chemical changes of Golek after harvest. In: *Proc. Workshop on Mango and Rambutan*. ASEAN Postharvest Training and Research Center, University of the Philippines at Los Baños. College, Laguna, Philippines, 96-112.
- Liew, C.L. y R.K. Prange. 1994. Effect of ozone and storage temperature on postharvest diseases and physiology of carrots (*Daucus carota* L.). *Journal of American Society Horticultural Science* 119:563-567.
- Lilleland, O. 1930. Growth study of the apricot fruit. *Journal of American Society Horticultural Science* 27:237-245.

- Lim T.K., 1994. Gray leaf spot. En: Plotz Plotz, R.C., Zentmeyer, G.A., Nishijima, W., Rohbach K., and Ohr H.D. (eds.) Compendium of tropical diseases. APS Press, St Paul, 36p.
- Long, E.M. 1943. Developmental anatomy of the fruit of the Deglet Noor date. Botanical Gazette 104:426-436.
- Mandosa, D.B. and Suryanarayana, V., 1884. Factors affecting growth and development of mango. En: D.B. Mandosa and R.B.H. Wills (Eds.), Mango. ASEAN Publ. FHB. Kuala Lumpur, Malaysia, p. 29.
- Maheshwari, P. R.C. Sachar y R.N. Chopra. 1955. Embryological studies in mango (*Mangifera indica* L.) Proceedings of the 42nd Indian Scientific Congress, Baroda. p. 233.
- Maiti, S. C. 1973. Effect of gibberellic acid (GA₃) Sprays of sex-expression of mango (*Mangifera indica* L.) Science and Culture 39:150-151.
- Majumder, P. K. y S. K. Mukherjee. 1961. Estudios of the variability of sex-expression in mango (*Mangifera indica* L.). Indian Journal of Horticulturae 18:12-19.
- Manicom, B.Q. 1998. Control of mango field diseases. En: E.A. de Villers (ed.). Cultivation of mangoes. Institute for Tropical and Subtropical crops. ARC. LNR: Nelspruit, Sudáfrica:125-134.
- Mata, B. I. y V. R. Mosqueda, 1995. Cosecha y poscosecha. En: La producción del mango en México. Editorial Limusa, México. pp.135-147.
- Mendgen, K y M. Matthias. 2002. Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. Trends in Plant Science. DOI:1016/S1360-1385(02) 02297-5.
- Mendoza, D.B., 1981. Developmental physiology of 'Carabao' mango (*Mangifera indica* L.) fruits. PhD Thesis. University of the Philippines, College, Laguna Philippines.
- Mohyuddin, A.I. y R. Mahmood. 1993. Integrated control of mango pests in Pakistan. Acta Horticulturae 341:467-483.
- Mosqueda, V.R. y O.A. Ireta. 1993. Degree-days and base temperatures required for inflorescence and fruit development in Mango "Manila". Acta Horticulturae 341:232-239.
- Mosqueda, V. R., D. F. De los Santos, L.E.N. Becerra, M.H. Cabrera, Z.D.A. Ortega, 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. 130p
- Mukherjee, S.K. 1997. Chapter I. Introduction, Botany and Importance. En: Litz, R.E. (ed.). The Mango, Botany, Production and Uses. CAB Internacional. Wallingford. Oxon, UK. pp. 1-20.
- Nachiappan, R.M. y P. Baskaran. 1986. Field evaluation of certain insecticidal sprays against mango leaf-hoppers. *Pesticides* 20:41-44.
- Nieto-Angel D., O.D. Téliz y C.D. Noriega. 1997. Enfermedades del mango en postcosecha. En: Ponce de León L., M.E. Bosquez, B.J. Avena y S.R. Baez (eds.) Manejo Postcosecha de Mango. EMEX, A. C. pp. 87-92.
- Ogawa J.M., A.J. Feliciano y B.T. Manji. 1990. Evaluation of ozone as a disinfectant in postharvest dump tank treatments for tomato. *Phytopathology* 80:10-20.
- Oshero, N. y G. S. May. 2001. The molecular mechanisms of conidial germination. *FEMS Microbiology Letters* 199(2):153-160.
- Parisot, E. 1988. Étude de la croissance rythmique chez jeunes manguiers (*Mangifera indica* L.). Description, germination et conservation de graines polyembryonnées de manguier. *Fruits* 43 :97-105.
- Peña, J.E. y A.I. Mohyuddin. 1997. Insect pests. En: Litz, R.E. (ed.). The mango: botany production and uses. CAB International, pp. 327-362.
- Peña, J.E., Mohyuddin, A.I. y M. Wysoki. 1997. The current mango pests management in the tropics and subtropics. *Acta Horticulturae* 455:812-820.
- Ploetz, R.C. y O. Prakash. 1997. Foliar, floral and soilborne disease. En: Litz, R.E. (ed.). The Mango: Botany, Production and Uses. CAB Internacional Oxon UK, pp: 281-326.
- Ponce de León G.L., M.C. Barbosa, G.E. Guillén, S.J. Sepúlveda y I.V. García. 1999. Advances in the Early Mango's fruit development. VI International Mango Symposium, 6-9 abril, 1999 Tailandia. Working Abstracts. 173p.
- Ponce de León, G. Leticia, Marco A. Pérez y Claudia Barbosa, M. 2001. El Ozono en la prevención de Antracnosis en frutos. Congresos: IX SOMECH, XLVII ISTH, VIII AMEHOAC. 1-5 de octubre del 2001, Oaxtepec, Morelos, México. Memorias. 166p.

- Ponce de León, G.L. 1997. El fruto del mango. En: Baez, S.R. (comp.). Manejo postcosecha del mango. Empacadoras de Mango de Exportación. 94p.
- Ponce de León, G.L., Barbosa, M.C., Guillen, G.E., García, G.E., García, I.V., Sepúlveda, S.J. y C.G. Hernández. 2000. Advances in the development of early mango's fruit. *Acta Horticulturae* 509(1), 253-258.
- Ponce de León, G. L. 2003. Chapter 11. Crop Management and Postharvest Handdling of Horticultural Products. En: Ramdane D., R. Niskanen, y S. M. Jain (eds.) Volume II: Fruits and Vegetables. Development, Physiology and Postharvest Technology of Mango. Science Publishers, Inc. Enfield, USA.
- Popenoe, W. 1917. The pollination of the mango. US Department of Agriculture Bulletin No. 542.
- Prior, C.F. Elango y A. Whitwell. 1992. Chemical control of *Colletotrichum* infection in mangoes En: *Colletotrichum* Biology, pathology and control. British Society for Plant Pathology.
- Prusky, D. 2001. Local modulation of host pH by *Colletotrichum* species as a mechanism to increase virulence. *Molecular Plant-Microbe Interact.* 14:1105-1113.
- Prusky, D. y R. A. Plumbley. 1992. Quiescent infections of *Colletotrichum* in tropical and subtropical fruits. En: *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control.* Bailey, J. A. A. and M. J. Jeger (eds.) CAB International, Oxon, UK. Pp:289-307.
- Prusky, D., E. Falik, I. Kobiler, Y. Fuchs, G. Zauberman, E. Pesis, I. Rotha, Weksler, M. Akerman, O. Ykutiely, A. Wasblum, A. Keinan y G. Ofek. 1997. Hot water brush: a new method for the control of postharvest disease caused by *Alternaria* rot in mango. *Acta Horticulturae* 455(2):780-785.
- Prusky, D., N.T. Keen y I. Eaks. 1983. Further evidence for the involvement of performed antifungal compound in the latency of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Physiology Plant Pathology* 22:189-198.
- Prusky, D., Y. Fuch y G. Zauberman. 1981. A method for preharvest assessment of latent infections in fruits. *Annals of Applied Biology* 98:79-85.
- Ridley, J.D. y E.T. Sims. 1996. Preliminary investigation on the use of ozone to extend the shelf-life and maintain the marked quality of peach and strawberries. South Carolina

- Agricultural Experimental Station Research Series 70. South Carolina Agricultural Experimental Station, Clemson University, Clemson, SC. 22p.
- Roth I. 1977. Fruits of Angiosperms. Gebrüder Borntraeger, Berlin. 675p.
- Ruiz, P. E. 2001. Histopatología de frutos de mango (*Mangifera indica* L.) cv. Haden infectados por *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. y Sacc. Tesis de Maestría en Ciencias. Programa de Fitopatología, Colegio de Postgraduados. 64 p.
- Saaiman, W. C. 1997. Short wave infra-red radiations as an alternative to the hot water bath to control postharvest the decay in mangoes. *Acta Horticulturae* 455(2):773-779.
- Samra, J.S., Thakur, R.S. y Chadha, K.L. 1977. Effect of foliar application of urea and yield parameters mango. *Indian Journal of Horticulture* 244:26-29.
- Schiffmann-Nadel, M.H. Michaely, G. Zauberman e I. Chet. 1984. Physiological changes occurring in picked climacteric fruit infected with different pathogenic fungi. *Phytopathology* 113:277-284.
- Schnell R.J. y R.J. Jr. Knight. 1992. Frequency of zygotic seedlings from five polyembryonic mango rootstocks. *HortScience* 27:174-176.
- Schroeder, C.A. 1953. Growth and development of the Fuerte avocado fruit. *Journal of American Society of Horticultural Science* 61:103-109.
- Sciumbato, G. y C. Hegwood, Jr. 1978. Control of cucumber fruit rot. *Journal of the Mississippi Academy of Science* 23:9-15.
- Sharma, M.R., 1954. Studies in the family Anacardiaceae I: Vascular anatomy of the flower of *Mangifera indica* L. *Phytomorphology* 4:201-208.
- Simao, S. y Z.C. Maranhao. 1959. Os insectos como agentes polizadores de Mangaieira. *Annales of Agricultura. Universidad de Sao Paulo* 76:300-304.
- Simmonds, J.H. 1941. Latent infections in tropical fruits discussed in relation to the part played by species of *Gloeosporium* and *Colletotrichum*. *Journal of Royal Society Qd.* 52:92-120.
- Simmonds, J.H. 1963. Studies in the latent phase of *Colletotrichum* species causing rots of tropical fruits. *Queenslan Journal Agricultural Science* 20:373-424.
- Singh, L. B. 1968. The Mango - Botany, cultivation, and utilization. Leonard Hill, London. 439p.

- Singh, R. N., Majumder, P. K y D. K. Charma. 1966. Sex-expression in mango (*Mangifera indica* L.) with reference to prevailing temperature. Proceedings of the American Society for Horticultural Science 89:228-229.
- Spalding, D.H. y W.F. Reeder. 1986. Decay and acceptability of mangos treated with combinations of hot water, imazalil, and g-irradiation. Plant Disease Reporter 70:1149-1151.
- Spotts, R.A. y L.A. Cervantes. 1989. Evaluation of desinfectant-flotation salt-surfactant combinations on decay fungi of pear in a model dump tank. Phytopathology 79:121-129.
- Spotts, R.A. y L.A. Cervantes. 1992. Effect of ozonated water on post-harvest pathogens of pear in the laboratory and packinghouse test. Plant Disease Reporter 79:256-259.
- Swuinnburne, T.R. 1983. Quiescent infections in postharvest diseases. En: Dennis, C. (ed.). Postharvest pathology of fruits and vegetables. Academic Press, London. pp. 1-21.
- Tandon, R.N., U.S. Sisodia y K.S. Bilgramy. 1955. Pathological studies of *Pestalotia mangiferae*. Proceedings of the Indian Academy of Science. B 42.
- Téliz D. (Editor) GUIM (Grupo Interdisciplinario de Investigación en Mango). 1998. El Mango y su Manejo Integrado en Michoacán. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, México. 55p.
- Torres, J.P. 1931. Some notes on Carabao mango flower. Philippine Journal Agricultural 2:395-398.
- Tukey, H.B. 1936. Development of cherry and peach fruits as affected by destruction of the embryo. Botanical Gazette 98:1-24.
- Vega, A. 1994. Distribución, incidencia y severidad de la escoba de bruja en el Valle de Apatzingán. INIFAP-CIPAC. Folleto técnico. No. 20. 54 p.
- Verhoeff, K. 1974. Latent infections by fungi. Annual Review of Phytopathology 12:99-110.
- Vielle-Calzada, J.P., Baskar, y U. Grossniklaus. 2000. Delayed activation of the paternal genome during seed development. Nature 404:91-94.
- Wattad, C., A. Dinoor y D. Prusky. 1994. Purification of pectate lyase produced by *Colletotrichum gloeosporioides* and its inhibition by epicatechin: a possible factor

- involved in the resistance of unripe avocado fruits to anthracnose. *Molecular Plant Microbe Interaction* 7:293-297.
- Wattad, C., D. Kobilier, A. Dinoor y D. Prusky. 1997. Pectate lyase of *Colletotrichum gloeosporioides* attacking avocado fruits: cDNA cloning and involvement in pathogenicity. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 50:3:197-212.
- White, I. M. y M. Elson-Harris. 1992. Fruit flies of economic significance. CAB International Wallingford.
- Wysocki, M., Y. Ben-Dov, E. Swirski, e Y. Izhar. 1993. The arthropod pests of mango in Israel. *Acta Hort.* 341:452-466.
- Wong, U.J.M. 1998. Perspectivas de la comercialización del mango en el mercado internacional. Foro Internacional de Mango y Otras Frutas Tropicales. Mazatlán, Sin., México. 6p.
- Yack, Z., y M. B. Dickman. 1997. Regulation of cAMP y cAMP dependent protein kinase during germination and appressorium formation in *Colletotrichum trifolli*. *Physiological and Molecular Plant Patology* 50:2:117-127.
- Yakoby, N., D. Beno-Moualem, N.T. Keen, A. Dinoor, O. Pines, y D. Prusky. 2001. *Colletotrichum gloeosporioides* pelB is an important virulence factor in avocado fruit-fungus interaction. *Molecular Plant Microbe Interaction* 14:988-95.
- Yee, W. 1987. The mango in Hawaii. Cooperative Extension Service. University of Hawaii, Circular 388:19-22.

10.1. APÉNDICES

1. Preparación del fijador FAA (Formaldehído - ácido acético - alcohol)

Alcohol al 70%: 90 ml
Formaldehído al 40%: 7 ml
Acido acético: 3 g

2. Deshidratación

agua	50%
alcohol etílico	40%
alcohol terbutílico	10%
agua	30%
alcohol etílico	50%
alcohol terbutílico	20%
agua	15%
alcohol etílico	50%
alcohol terbutílico	35%
agua	5%
alcohol etílico	40%
alcohol terbutílico	55%
alcohol etílico	25%
alcohol terbutílico	75%
alcohol terbutílico	100%
alcohol terbutílico	100%
alcohol terbutílico	100%

Los tejidos permanecen en cada cambio un tiempo aproximado de 5 horas.

3. Desparafinación, deshidratación y tinción de contraste con safranina-verde fijo:

Xileno al 100%	5 min
Xileno al 100%	5 min
Xileno al 100%	5 min
Alcohol absoluto	5 min
Alcohol absoluto	5 min
Alcohol absoluto	5 min
Alcohol al 90%	5 min
Alcohol al 70%	5 min
3 lavados con agua destilada	5 min cada uno
Safranina	1 a 3 días
Lavado con agua corriente	15 a 20 min
Alcohol al 50%	5 min
Alcohol al 60%	5 min
Alcohol al 70%	5 min
Alcohol al 80%	5 min
Verde rápido	1 a 3 seg

Alcohol absoluto	5 min
Alcohol absoluto	5 min
Alcohol absoluto	5 min
Solución especial de aceite de clavo	10 min
Xileno al 100%	10 min
Xileno al 100%	10 min
Montaje con resina sintética	

Preparación de safranina:

Methyl Cellosolve 50 ml
 Alcohol al 95%: 25 ml
 Agua: 25 ml
 Acetato de sodio: 1 g
 Formaldehído al 40%: 2 ml
 Safranina: 0.1 g

Preparación Verde fijo (debe prepararse con tres meses de anticipación, ya que debe madurar):
 En 100 ml. de alcohol al 90%, agregar 0.1% de solución Verde rápido.

Solución de aceite de clavo:

Aceite de Clavo: 30 ml
 Alcohol absoluto: 30 ml
 Xileno: 30 ml

4. Desparafinación, deshidratación y tinción con rojo de aceite:

Xileno al 100%	5 min
Xileno al 100%	5 min
Xileno al 100%	5 min
Alcohol absoluto	5 min
Alcohol absoluto	5 min
Alcohol absoluto	5 min
Alcohol al 90%	5 min
Alcohol al 70%	5 min
Alcohol al 50%	5 min
Gotas de rojo de aceite	1.5-2 h
Alcohol al 50%	5 min
Montaje con jalea de glicerina	

Preparación de Jalea de glicerol:

Gelatina: 10 g
 Agua destilada : 95 ml
 Calentar hasta que se disuelva la gelatina y añadir:
 Glicerina: 70 ml
 Fenol: 1 ml

5. Preparación de glutaraldehído al 6% en buffer de fosfatos 0.02 M

Glutaraldehído solución al 50%
 Sacarosa cristales

Amortiguador de fosfatos 0.02 M, pH 7.2 (77% de fosfato dibásico de sodio 0.02 M y 23% de fosfato monobásico de sodio 0.02 M para obtener un pH 7.2)

Al amortiguador de fosfatos con 5 g de sacarosa se le incorpora la solución de glutaraldehído al 50%. Para incorporar el glutaraldehído dado que se utiliza una solución que viene en presentación al 50% se tomarán 12 ml de dicha solución y se mezclan con 88 ml de amortiguador de fosfatos. Se obtiene así una solución de glutaraldehído al 6% en amortiguador de fosfatos 0.02 M.

6. Preparación de la solución de tetraóxido de osmio al 2%

Ampolleta de 0.5 g de osmio

25 ml de amortiguador de fosfatos al 0.02 M., pH 7.2

La ampolleta debe tratarse con cuidado. El osmio está cristalizado, para hacer los cristales más pequeños y facilitar su disolución se procede a calentarla en baño maría, sin que hierva. En un frasco ámbar con tapa de cristal esmerilada se colocan 25 ml de la solución de amortiguador de fosfatos. Bajo la campana de extracción se introduce la ampolleta y su contenido en el frasco ámbar con buffer, la ampolleta se rompe teniendo cuidado de no cortarse ni tocar el vidrio usando servilletas de papel. Se deja disolver sola 48 h en el refrigerador o se utiliza el agitador de ultrasonido durante 10 min. Debe evitarse que pequeños pedazos de vidrio queden en la solución.

7. Proporciones para preparar 100 ml de resina epóxica:

EPON 812	45 ml
DDSA	30 ml
NMA	25 ml
BDMA (Benzil Dimetil Amino)	1 ml

Se mezclan los dos primeros con un agitador magnético durante 5 a 10 min, se agrega el NMA y se vuelve a mezclar durante otros 10 min. Finalmente se agrega el BDMA.

8. Preparación de acetato de uranilo al 2% en alcohol al 50%

Para 10 ml de solución:

0.2 g de acetato de uranilo

10 ml de etanol al 50%

Preparación de citrato de plomo

Para 10 ml de solución:

0.04 g de NaOH

0.05 g de citrato de plomo

10 ml de agua destilada

Ambas soluciones se centrifugan a 5 000 rpm durante 15 min.

9. Preparación del medio de cultivo PDA

Se suspenden 40 g de PDA en un litro de agua destilada en un matraz y se disuelven perfectamente. Se esteriliza durante 15 ó 20 min a 120 - 124°C ó 19 libras en autoclave.

Para evitar el crecimiento de bacterias se puede agregar al medio de cultivo 5 gotas de ácido láctico al 25% o 1 ml de tergitol por cada litro de agua, o bien antibióticos con las cantidades presentadas en la siguiente tabla:

	g/L
Sulfato de neomicina	0.025
Sulfato de estreptomicina	0.05
Clorotetraciclina	0.05

El medio de cultivo se deja enfriar un poco y posteriormente se vierte en cajas de Petri previamente estériles. Se esperan unas horas antes de sembrar para estar seguros de que no haya contaminaciones en las cajas de Petri.

10. Obtención de cultivos puros

- Se corta un trozo de tejido de aproximadamente 1 cm cuadrado, la mitad del corte debe estar infectada y la otra no, para asegurarnos de que el hongo está vivo.
- El corte se coloca en una caja de Petri con solución de hipoclorito de sodio al 1.5% durante minuto y medio o dos.
- Se enjuaga con agua destilada y estéril durante uno o dos minutos.
- Los cortes de tejido se ponen a secar en un papel absorbente o filtro estéril para eliminar el exceso de agua.
- Se colocan cuatro cortes por cada caja de Petri con medio de cultivo PDA. En total deben de hacerse 25 cajas para cuantificar frecuencia de aislamiento. Se debe de tener una frecuencia de aproximadamente 80%.
- Del borde de las colonias con un sacabocados se toma una parte y se siembran 5 ó 10 cajas de Petri con una sola colonia cada una.

11. Purificación mediante cultivos monoconidiales

- Se agrega un poco de agua destilada y estéril a una caja de Petri con la colonia del patógeno y se agita.
- En 10 tubos de ensayo se colocan 9 ml de agua destilada y estéril y se enumeran.
- Al primer tubo se le agrega 1 ml de la solución con esporas y se agita muy bien, al tubo 2 se le agrega 1 ml del tubo uno y así sucesivamente.
- Se toma una gota de solución del tubo 3 ó 4 para observarla al microscopio, cuando se observan solamente de 6 a 8 de los conidios del patógeno en el campo del microscopio se podrá sembrar una gota de solución en una caja de Petri.
- Una vez que se colocó la gota de solución en la caja de Petri se disemina con un triángulo de cristal estéril.
- De esta caja se resiembran 10 para obtener los cultivos monoconidiales, las muestras se toman con un sacabocados y aguja.
- De los cultivos monoconidiales se inoculan frutos sanos para reproducir los síntomas que provoca el patógeno.

10.2. Artículo derivado del trabajo de investigación de tesis