



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
FISIOLOGÍA VEGETAL

**POLIEMBRIONÍA E IDENTIFICACIÓN DE EMBRIONES
CIGÓTICOS Y NUCELARES DE MANGO (*Mangifera indica* L.)
CVS. MANILA Y ATAULFO**

ELISA DEL CARMEN MARTÍNEZ OCHOA

TESIS
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

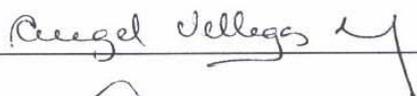
MAESTRA EN CIENCIAS

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO.
2010**

La presente tesis, titulada: **Poliembrionía e identificación de embriones cigóticos y nucelares de mango, cvs. Manila y Ataulfo**, realizada por la alumna: **Elisa del Carmen Martínez Ochoa**, con la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
FISIOLOGÍA VEGETAL**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO  _____

Dr. Angel Villegas Monter

Asesor  _____

Dr. Ernesto Gabriel Alcántar González

Asesor  _____

Dra. María Teresa Mejía Saulés

Montecillo, Texcoco, Estado de México; Julio de 2010.

POLIEMBRIONÍA E IDENTIFICACIÓN DE EMBRIONES CIGÓTICOS Y NUCELARES EN MANGO (*Mangifera indica* L.) CVS. MANILA Y ATAULFO

Elisa del Carmen Martínez Ochoa, MC.

Colegio de Postgraduados, 2010

Identificar el origen cigótico o nucelar de los embriones en semillas poliembrionicas de mango (*Mangifera indica* L.) facilitará la selección de híbridos y el mejoramiento genético, la reproducción clonal de portainjertos libres de enfermedades, y la renovación de clones viejos que han perdido el vigor híbrido. El objetivo de esta investigación fue estudiar las características de fruto, semilla y embriones en los cvs. Manila y Ataulfo y su relación con poliembrionía, e identificar plántulas cigóticas y nucleares originadas de embriones cultivados *in vitro* mediante marcadores RAPD. En cada cultivar fueron evaluadas las características morfológicas de 40 frutos, semillas y sus embriones. En ‘Manila’ y ‘Ataulfo’ se encontró correlación positiva entre el peso del fruto y el número de embriones por semilla ($r = 0.42$ y $r = 0.35$; $p \leq 0.05$), y peso de la semilla con endocarpo y el número de embriones por semilla ($r = 0.54$ y $r = 0.80$; $p \leq 0.01$). Además, también se observó variación en la localización y orientación de los embriones en la semilla; por lo tanto, la forma de sembrar la semilla debe ser diferente entre ‘Manila’ y ‘Ataulfo’. Si se consideran los porcentajes de poliembrionía obtenidos en ‘Manila’ (97.5 %) y ‘Ataulfo’ (95.0 %), y el número de embriones por semilla (de 2 a 7 y 2 a 5, respectivamente), ambos cultivares son de reproducción apomictica nucelar. También se comparó la germinación de 80 semilla de cada cultivar establecidas *in vitro* e *in vivo* (invernadero). En cultivo *in vitro* se presentaron mejores resultados, en 91 % de las semillas se obtuvieron de 2 a 5 plántulas; mientras que, en 47 % de las semillas cultivadas *in vivo* presentaron de 2 a 3 plántulas. Adicionalmente, en nueve semillas poliembrionicas y tres monoembrionicas de ‘Manila’, y siete semillas poliembrionicas de ‘Ataulfo’, en las cuales todos los embriones germinaron *in vitro*, se determinó el origen cigótico o nucelar de las plántulas desarrolladas con 14 iniciadores RAPD. Con los iniciadores OPA-04, OPA-11 y OPB-07 se identificaron mayor número de plántulas cigóticas en ‘Manila’, y con OPA-11 y SAP-01 en ‘Ataulfo’. En ambos cultivares se identificaron de 1 a 3 plántulas cigóticas originadas tanto de embriones pequeños ubicados en el micrópilo de la semilla como de embriones grandes próximos al mismo.

Palabras clave: *Mangifera indica* L., embriones sexuales, germinación *in vitro*, marcadores moleculares, polimorfismo.

POLYEMBRYONY AND IDENTIFICATION OF ZIGOTIC AND NUCELLAR EMBRYOS IN MANGO (*Mangifera indica* L.) CVS. MANILA Y ATAULFO

Elisa del Carmen Martínez Ochoa, MC.

Colegio de Postgraduados, 2010

Identifying the origin of the zygotic or nucellar embryos in polyembryonic seeds of mango (*Mangifera indica* L.) will facilitate the selection of hybrids and the genetic improvement, the clonal reproduction of disease-free rootstocks, and the renovation of old clones that have lost their hybrid vigor. The objective of this research was to study the characteristics of fruits, seeds, and embryos and their relationship with polyembryony in cvs. Manila and Ataulfo, and identify zygotic and nucellar seedlings originated by embryos cultivated *in vitro* using RAPD markers. In each cultivar, it was evaluated the morphology characteristics of 40 fruits, seeds and their embryos. In 'Manila' and 'Ataulfo', it was found positive correlation between the fruit weight and the number of embryos per seed ($r = 0.42$ y $r = 0.35$; $p \leq 0.05$), and the weight of the seed with endocarp and the number of embryos per seed. ($r = 0.54$ y $r = 0.80$, $p \leq 0.01$). Moreover, it was also observed differences in the localization and orientation of embryos in the seed, so the way of seed cultivation must be different between 'Manila' and 'Ataulfo'. If it is considered the percentage of polyembryony obtained in 'Manila' (97.5 %) and 'Ataulfo' (95.0 %), and the number of embryos per seed (from 2 to 7 and from 2 to 5, respectively), both cultivars have nucellar apomictic reproduction. It was also compared the germination of 80 seeds in each cultivar established *in vitro* and *in vivo* (greenhouse). *In vitro* culture showed better results than *in vivo*, where 91.0 % of the seeds cultivated *in vitro* had from 2 to 5 seedlings, and 47.0 % of the seeds cultivated *in vivo* had from 2 to 3 seedlings. Additionally, in nine polyembryonic seeds and three monoembryonic seeds of 'Manila', and seven polyembryonic seeds of 'Ataulfo', in which all embryos germinated *in vitro*, it was determined the zygotic or nucellar origin of the developed seedlings with 14 RAPD primers. With the primers OPA-04, OPA-11 and OPB-07, it was identified the greatest number of zygotic seedlings in 'Manila', and with OPA-11 and SAP-01 in 'Ataulfo'. In the two cultivars, it was identified from 1 to 3 zygotic seedlings originated either of small embryos localized in seed micropillar end or the big embryos next micropillar end.

Key words: *Mangifera indica* L., sexual embryos, sprouting *in vitro*, molecular markers, polymorphism.

A Dios: Porque al caer, me dio la fortaleza para poder levantarme y seguir.

A mis padres: Alonso y Carmen, porque nunca se limitaron al otorgarme su amor, su tiempo y sus valiosas enseñanzas.

A mi esposo: Julio César, por ser parte fundamental de este logro, por su apoyo, por su amor.

A mi hija: Romina que, sin saberlo, me dio ánimo con sus ojitos, con su sonrisa.

A mis hermanos: Que a pesar de estar lejos, siempre estuvieron al pendiente de mí.

A mis suegros: Por su cariño y apoyo desmedido.

A toda mi familia, Martínez-Ochoa y Buendía-Espinosa.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por financiar mis estudios de Maestría en Ciencias (Beca 208078).

Al proyecto SAGARPA-CONACYT (No. 48595) por el apoyo económico para realizar la presente investigación.

A la especialidad de Fisiología Vegetal del Colegio de Postgraduados por facilitar mi formación académica en sus aulas.

Al Dr. Angel Villegas Monter, por ser guía durante el desarrollo y perfeccionamiento de la investigación; por su paciencia, apoyo incondicional y amistad.

A la Dra. María Andrade Rodríguez, por el tiempo dedicado y sus invaluable enseñanzas que permitieron realizar gran parte de esta investigación; por su amistad.

Al Dr. E. Gabriel Alcántar González, por su valiosa colaboración en la realización del presente trabajo.

A la Dra. Ma. Teresa Mejía Saulés, por sus sugerencias para la elaboración de esta tesis; por su gran amistad.

A la Dra. Cristina López Peralta, por apoyarme al ser integrante del jurado en la presentación de mi examen de grado.

A los Profesores de Colegio de Postgraduados, por compartir sus conocimientos y fomentar mi formación académica.

Al Sr. Guillermo Arellano, a la Sra. Alejandra Herrera, y al Sr. Gabriel Vázquez, por auxiliarme durante la fase experimental; por su sincera amistad.

A mis amigos, Emma, Neli, Ale Ledesma, Nalle, Yolita, Ale Loyo, Yuri y Paty, por sus consejos, su respaldo y gran amistad.

A todas las personas que fueron partícipes en la realización de este logro.

CONTENIDO

	Pág.
ÍNDICE DE CUADROS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 El cultivo del mango	4
2.2 Embriogénesis en mango	6
2.3 Poliembrionía en mango	10
2.3.1 Ventajas y desventajas de la embriogénesis nucelar.....	14
2.4 Morfología de las semillas y embriones de mango	17
2.5 Marcadores genéticos aplicados en mango	20
2.5.1 Marcadores morfológicos.....	22
2.5.2 Marcadores bioquímicos.....	23
2.5.3 Marcadores moleculares.....	24
2.5.3.1 Extracción de ADN.....	25
2.5.3.2 Polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP).....	28
2.5.3.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	29
2.5.3.4 Amplificación inespecífica del polimorfismo del ADN (RAPD).....	32
2.5.3.5 Amplificación de fragmentos de longitud polimórfica (AFLP).....	34
2.5.3.6 Microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR).....	35
2.5.3.7 Inter-secuencias simples repetidas (ISSR).....	36
2.5.3.8 Comparación entre tipos de marcadores: Criterios de elección.....	37
2.5.4 Identificación de plántulas cigóticas y nucelares en mango.....	39

	Pág.
2.6	Resumen de la Revisión de Literatura 42
III.	MATERIALES Y MÉTODOS 46
3.1	Localización del sitio experimental 46
3.2	Material vegetal 46
3.3	Características morfológicas de frutos, semillas y embriones ... 46
3.3.1	Características morfológicas de frutos..... 47
3.3.2	Características morfológicas de semillas con endocarpo..... 47
3.3.3	Características morfológicas de semillas..... 48
3.3.4	Características morfológicas de embriones..... 49
3.3.5	Análisis de variables..... 50
3.4	Poliembrionía 51
3.4.1	Análisis de variables..... 51
3.5	Cultivo de embriones <i>in vitro</i> 52
3.5.1	Análisis de variables..... 54
3.6	Cultivo de semillas en invernadero 54
3.6.1	Análisis de variables..... 55
3.7	Identificación de plántulas cigóticas y nucelares mediante
	RAPD 56
3.7.1	Colecta y almacén del material vegetal..... 56
3.7.2	Extracción del ADN genómico..... 57
3.7.3	Determinación de la calidad y concentración del ADN genómico... 59
3.7.4	Selección de iniciadores..... 60
3.7.5	Identificación de las plántulas mediante RAPD..... 62
3.7.6	Análisis de datos moleculares..... 63
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN 64
4.1	Características morfológicas de frutos, semillas y embriones ... 64
4.1.1	Características morfológicas de frutos..... 70
4.1.2	Características morfológicas de semillas con endocarpo..... 71
4.1.3	Características morfológicas de semillas..... 73

	Pág.
4.1.4 Características morfológicas de embriones.....	78
4.2 Poliembrionía.....	84
4.3 Cultivo de embriones <i>in vitro</i>.....	88
4.4 Cultivo de semillas en invernadero.....	92
4.5 Identificación de plántulas cigóticas y nucelares mediante RAPD.....	95
4.5.1 Determinación de la calidad y concentración del ADN genómico...	95
4.5.2 Selección de iniciadores.....	98
4.5.3 Identificación del origen cigótico o nucelar de embriones en el cv. Manila.....	100
4.5.4 Identificación del origen cigótico o nucelar de embriones en el cv. Ataulfo.....	106
4.5.5 Identificación de embriones cigóticos.....	112
V. CONCLUSIONES.....	117
VI. LITERATURA CITADA.....	119
VII. ANEXOS.....	130
GLOSARIO.....	133

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Avances realizados en mango empleando herramientas moleculares.	21
Cuadro 2. Ventajas y desventajas de los diferentes marcadores moleculares.....	38
Cuadro 3. Plántulas de mango cvs. Manila y Ataulfo utilizadas para la extracción de ADN.....	57
Cuadro 4. Componentes de la mezcla de reacción para la amplificación mediante RAPD.....	61
Cuadro 5. Comparación de medias para peso, largo y ancho de frutos de mango cvs. Manila y Ataulfo.....	71
Cuadro 6. Comparación de medias para peso, largo y ancho de semillas con endocarpo de mango cvs. Manila y Ataulfo.....	72
Cuadro 7. Pérdida de agua en 48 h en semillas con endocarpo de mango cvs. Manila y Ataulfo.....	72
Cuadro 8. Comparación de medias para peso, largo y ancho de semillas de mango cvs. Manila y Ataulfo.....	74
Cuadro 9. Proporción (%) del fruto que tienen la semilla con endocarpo y la semilla de mango cvs. Manila y Ataulfo.....	74
Cuadro 10. Comparación de medias para peso, largo y ancho de embriones, de acuerdo a su posición en la semilla, de mango cvs. Manila y Ataulfo.....	79
Cuadro 11. Comparación de medias para peso, largo y ancho de embriones de acuerdo a su posición en la semilla de mango	80
Cuadro 12. Comparación de medias para peso, largo y ancho de ejes embrionarios en embriones de mango cvs. Manila y Ataulfo.....	81

	Pág.
Cuadro 13. Comparación de medias de las diferencias de peso, largo y ancho entre el par de cotiledones en los embriones de mango cvs. Manila y Ataulfo.....	82
Cuadro 14. Porcentaje de semillas con diferente numero de embriones en mango cvs. Manila y Ataulfo.....	84
Cuadro 15. Correlación de las características de frutos, semillas con endocarpo y semillas con el número de embriones por semilla, en mango cvs. Manila y Ataulfo.....	85
Cuadro 16. Número de embriones en semillas con endocarpo de diferente peso, de mango cvs. Manila y Ataulfo.....	86
Cuadro 17. Correlación de características de cada embrión con el número de embriones por semilla, en mango cvs. Manila y Ataulfo.....	87
Cuadro 18. Porcentaje de germinación y número de plántulas por semilla de mango cvs. Manila y Ataulfo, establecidas <i>in vitro</i>	88
Cuadro 19. Porcentaje y tiempo de germinación de embriones de mango cvs. Manila y Ataulfo, establecidos <i>in vitro</i>	89
Cuadro 20. Porcentaje y tiempo de germinación de embriones de diferente tamaño de mango cvs. Manila y Ataulfo, establecidos <i>in vitro</i>	90
Cuadro 21. Porcentaje y tiempo de germinación, y número de plántulas que desarrollan por semilla de mango cvs. Manila y Ataulfo, establecidas en invernadero.....	92
Cuadro 22. Tiempo de germinación de embriones en invernadero, según el orden de aparición de cada plántula (primera, segunda o tercera), de mango cvs. Manila y Ataulfo.....	93
Cuadro 23. Lecturas de calidad y concentración de ADN (ng μL^{-1}) extraído de diferentes tejidos de mango cvs. Manila y Ataulfo.....	95
Cuadro 24. Polimorfismo originado por 14 iniciadores RAPD en mango cv. Manila.....	100

	Pág.
Cuadro 25. Tamaño (pb) de los marcadores RAPD generados por 14 iniciadores que identificaron plántulas cigóticas de mango cv. Manila.....	102
Cuadro 26. Polimorfismo originado por 14 iniciadores RAPD en mango cv. Ataulfo.....	107
Cuadro 27. Tamaño (pb) de los marcadores RAPD generados por 14 iniciadores que identificaron plántulas cigóticas de mango cv. Ataulfo.....	109
Cuadro 28. Plántulas identificadas como cigóticas por análisis RAPD con 14 iniciadores, en mango cvs. Manila y Ataulfo.....	113
Cuadro 29. Plántulas identificadas como cigóticas por análisis RAPD con 14 iniciadores, en mango cvs. Manila y Ataulfo,	115

ANEXOS

Anexo B. Secuencias de bases (5'-3') de los iniciadores a seleccionar para ser empleados en la identificación de plántulas cigóticas y nucelares de mango cvs. Manila y Ataulfo mediante RAPD.....	132
--	-----

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Iniciación y desarrollo de los mecanismos de apomixis relacionados a eventos en el ciclo de vida de angiospermas (Bicknella y Koltunowb, 2004).....	7
Figura 2. Clasificación de la poliembrionía en angiospermas (Singh, 2003).....	11
Figura 3. Etapas de desarrollo de un óvulo anátropo con saco embrionario <i>Polygonium</i> (Batygina y Vinogradova, 2007).....	17
Figura 4. Fruto monoembriónico del cv. Paheri cinco semanas después de la fertilización: a) exocarpo, b) mesocarpo, c) funículo, d) embrión, e) endocarpo, f) lóculo (Kennard, 1955).....	17
Figura 5. Representación esquemática de los componentes básicos de la PCR y etapas de la reacción (Moody, 2007).....	30
Figura 6. Secado de semillas con endocarpo de mango cvs. Manila y Ataulfo.....	47
Figura 7. Semilla con endocarpo y sin endocarpo de mango cv. Manila.	48
Figura 8. Orientación de embriones en las semillas poliembriónicas de mango: a) OEP; b) OEF; c) OEoF; d) OEd.....	48
Figura 9. Embriones numerados con referencia al embrión ‘1’ (a), y presencia de protuberancia donde se inserta el funículo (b), en semillas poliembriónicas de mango.....	49
Figura 10. Corte transversal en la semilla poliembriónica de mango.....	51
Figura 11. Embriones de mango cv. Ataulfo a subcultivar <i>in vitro</i>	53
Figura 12. Forma de siembra de cuatro semillas de mango cv. Ataulfo en la maceta (con la parte ‘aplanada’ paralela al sustrato) (a). Aparición del primer brote de una semilla de mango cv. Ataulfo (b).....	55

	Pág.
Figura 13. Hojas jóvenes de mango empleadas para la extracción de ADN.....	56
Figura 14. Forma de los frutos de mango: a) Oblonga y b) Obovoide (IPGRI, 2006).	64
Figura 15. Forma de las semillas de mango: a) Oblonga y b) Reniforme (IPGRI, 2006).....	65
Figura 16. En la imagen se observa: a) la semilla con el endocarpo abierto; b) el endocarpo; c) la membrana blanca; d) la cubierta seminal con el funículo; y e) tres embriones agrupados (delimitados por líneas punteadas), de mango cv. Manila.....	66
Figura 17. a) Embriones envueltos totalmente por la cubierta seminal, se observa la rafe de color café oscuro en la semilla de mango cv. Ataulfo; b) Embriones envueltos parcialmente por la cubierta seminal, apreciado la región correspondiente a la antirrafe (línea punteada) en la semilla de mango cv. Manila.....	67
Figura 18. a) Embriones con ejes embrionarios (O) que estaban cubiertos por otros embriones de mango cv. Manila; b) Embriones (número 2, 3 y 4) aglutinados en la región del funículo, de mango cv. Ataulfo (el embrión 1 es el más grande); c) Plúmula en desarrollo de un embrión de mango cv. Ataulfo.....	68
Figura 19. Dos embriones con el par de cotiledones desiguales, de mango cv. Manila.....	69
Figura 20. Orientación y localización de embriones en las semillas de mango cvs. Manila y Ataulfo.	76
Figura 21. Distribución y orientación de embriones en las semillas de mango cvs. Manila (M) y Ataulfo (A).....	77
Figura 22. Presencia de protuberancia en el embrión 1, donde se insertó el funículo en la cubierta seminal de la semilla de mango cvs. Manila y Ataulfo.....	77
Figura 23. Diferencia de tamaño de cinco embriones de una semilla de mango cv. Ataulfo.....	78
Figura 24. Plántulas desarrolladas <i>in vitro</i> (a); Subcultivo y separación de plántulas en mango cv. Manila (b).....	91

	Pág.
Figura 25. Plántulas de mango cv. Manila desarrolladas en invernadero.....	94
Figura 26. Fotografía de un gel de agarosa para determinar calidad de ADN de plántulas de mango cvs. Manila (m) y Ataulfo (a).....	97
Figura 27. Patrón de bandeo producido por los iniciadores serie OPA-01 a 20 (Operon Technologies) en la plántula 8-3 de mango cv. Manila.....	98
Figura 28. Amplificación de ADN (patrón de bandeo) producido por el iniciador OPA-04 (5' AATCGGGCTG 3') de plántulas de mango cvs. Manila y Ataulfo.....	99
Figura 29. Amplificación de ADN de 17 plántulas de mango cv. Manila utilizando los iniciadores OPA-11 (5' CAATCGCCGT 3') y OPB-07 (5' GGTGACGCAG 3').....	105
Figura 30. Amplificación de ADN de 20 plántulas de mango cv. Ataulfo utilizando los iniciadores OPA-04 (5' AATCGGGCTG 3') y OPA-11 (5'CAATCGCCGT 3').....	111

ANEXOS

Anexo A. Posibles rutas de formación de embriones en las semillas poliembriónicas: (I) desde células de una saco embrionario y tejido circundante; (II) como resultado del desarrollo de dos sacos embrionarios; (III) como resultado del desarrollo de un saco embrionario apospórico adicional (Batygina y Vinogradova, 2007).....	131
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

Nombre	Abreviatura
Ácido desoxirribonucleico	ADN
Ácido etilen-diamino-tetracético	EDTA
Ácido ribonucleico	ARN
Adenina	A
Bromuro de cetil-trimetil-amonio	CTBA
Centímetro	cm
Citosina	C
Cultivar (es)	cv (s).
Coefficiente de Variación	CV
Grados centígrados	°C
Gramo	g
Guanina	G
Hora	hr
Kilobases = 10^3 pares de bases	Kb
Litro	L
Microgramo = 10^{-6} g	μ g
Microlitro	μ L
Micromol = 10^{-6} M	μ mol
Miligramo = 10^{-3} g	mg
Mililitro = 10^{-3} L	mL
Milímetro = 10^{-1} cm	mm
Minuto	min
Nanogramos = 10^{-9} g	ng
Pares de bases	pb
Picomol = 10^{-12} g	pmol
Polivinilpirrolidona	PVP
Potencial de hidrógeno	pH
Revoluciones por minuto	rpm
<i>Thermus aquaticus</i>	<i>Taq</i>
Timina	T
UV	Ultravioleta
Volumen en volumen	v/v

I. INTRODUCCIÓN

El mango es uno de los frutales más importantes en México, ya que es el cuarto productor a nivel mundial y el primero en exportación (Evans, 2008). Tanto los frutos del cv. Manila como del cv. Ataulfo, son ampliamente aceptados en el mercado nacional. Además, por las características del fruto de 'Ataulfo', éste muestra potencial para la exportación (Ángel y Rebolledo, 2008; SIAP, 2008).

La poliembrionía en mango es de tipo asexual, presentando por semilla un embrión sexual y varios embriones somáticos o nucelares (Viruel *et al.*, 2005; Cordeiro *et al.*, 2006; Vázquez *et al.*, 2006) que mantienen toda la constitución genética de la planta madre (Koltunow *et al.*, 2001; Grossniklaus *et al.*, 2001). Los cultivares poliembriónicos se prefieren para la propagación de portainjertos, porque se cree que de las plántulas que emerjan la más vigorosa será nucelar.

Para poder aprovechar las ventajas de la poliembrionía es necesario identificar el origen cigótico o nucelar de los embriones en etapas tempranas del desarrollo. Entre las ventajas está el poder elegir al híbrido resultado de la cruce en programas de mejoramiento genético; así mismo, al identificar a los embriones nucelares se permitirá reproducir portainjertos que mantengan la homogeneidad del huerto, rejuvenecer clones viejos que han perdido el vigor por la constante propagación vegetativa, y obtener plantas libres de virus, viroides, fitoplasmas y bacterias en programas de saneamiento y certificación (Villegas y Andrade, 2008).

Los cítricos son el género modelo de embriogénesis nucelar (Koltunow, 1993) y poliembrionía para frutales como el kiwi (*Actinidia chinensis*), durazno (*Prunus persica*), almendro (*Prunus dulcis*) e incluso el mango, acerca del cual hay pocas investigaciones. Por lo que, hace falta ampliar los estudios sobre poliembrionía y embriogénesis en mango.

Comúnmente en la propagación a partir de semilla de mangos poliembriónicos, los productores seleccionan la planta más vigorosa y asumen que es nucelar. Sin embargo, en investigaciones con marcadores moleculares, se comprobó que las plántulas más vigorosas no siempre son las nucleares (Schnell y Knight, 1992; Degani *et al.*, 1993; Cordeiro *et al.*, 2006). Así mismo, sólo en la investigación de Cordeiro *et al.* (2006) relacionaron el origen cigótico con la ubicación de los embriones, pero no establecieron la posible relación con el tamaño.

Los marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphics DNA) son una técnica que ha sido efectiva para identificar plántulas cigóticas en mango (Cordeiro *et al.*, 2006), y en cítricos (Andrade-Rodríguez *et al.*, 2005; Nageswara *et al.*, 2007). Andrade-Rodríguez *et al.* (2005) indican que para identificar a todos los embriones en la semilla se debe asegurar su sobrevivencia mediante cultivo *in vitro*.

Realizar estos estudios en mango y especies frutales, además de generar conocimiento teórico, pretende generar conocimiento práctico para identificar los embriones cigóticos y nucleares en la semilla al relacionarlos con su ubicación y tamaño. Esta práctica permitiría aplicar métodos de selección más económicos por efectuarse en etapas tempranas (Villegas y Andrade, 2008).

Por lo antes expuesto se plantearon los siguientes **objetivos**:

1. Describir las características morfológicas de frutos, semillas y embriones, y correlacionarlas con poliembrionía en mango cvs. Manila y Ataulfo.
2. Identificar mediante RAPD plántulas cigóticas y nucleares originadas por embriones cultivados *in vitro*.
3. Establecer la relación del origen cigótico o nucelar de las plántulas con la posición y tamaño de los embriones en la semilla.

Las **hipótesis** de trabajo con la cuales se desarrollo la investigación, fueron:

1. La poliembrionía se relaciona con las características morfológicas de los frutos, semillas y embriones.
2. El cultivo *in vitro* favorece la germinación de los embriones.
3. Los marcadores RAPDs son útiles para identificar las plántulas cigóticas y nucelares.
4. La plántula de origen cigótico es aquella que desarrolla del embrión de menor tamaño próximo al micrópilo de la semilla.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 El cultivo del mango

El mango tiene más de 6 mil años de domesticación, tiempo durante el cual se extendió desde la región Indo Birmánica de Asia, a más de 100 países de los trópicos y subtrópicos. Actualmente, es uno de los cultivos más cotizados por su creciente demanda en el mercado, siendo en la producción mundial el tercer frutal en importancia, después de los cítricos y el banano (FAOSTAT, 2007).

Fue introducido en nuestro país por los españoles en 1779 a través de navíos chinos, en donde se trajeron las primeras plantas de las islas Filipinas (de Manila), llegó al puerto de Acapulco y se distribuyó principalmente en Veracruz. Posteriormente hubo otras introducciones: la de mangos monoembriónicos traídos desde las Antillas en el siglo XIX, que dan origen a los criollos; y la de cultivares traídos de Florida ('Haden', 'Keitt', 'Kent', 'Irwin', 'Sensation') en la década de los 50 por viveristas de Guerrero (Galán, 1999; Plan Rector Sistema Nacional Mango, 2005; Villegas, 2007).

México es el cuarto productor a nivel mundial (1, 679, 000 ton), India es el primero (10, 800, 000 ton), seguido de China (3, 673, 000 ton), y Tailandia (1, 800, 000 ton) (Evans, 2008). En el 2005, las exportaciones mundiales de mango alcanzaron 912,853 toneladas, valoradas en 543.10 millones de dólares americanos; México dominó el mercado de exportación con 22.6 % del total (Evans, 2008). El principal destino de la exportación nacional es Estados Unidos.

Los mayores rendimientos por hectárea no se presentan en los países de mayor producción; la República de Cabo Verde (islas en el océano Atlántico) obtiene 45 t ha⁻¹, mientras que en México el rendimiento promedio es de 9.96 t ha⁻¹ (SIAP, 2008). Para superar estas cifras es necesario mejorar el manejo de los huertos, incrementar las densidades de plantación, adoptar tecnologías (ej. riego), introducir nuevas variedades, incrementar la calidad y homogeneidad de las plántulas empleadas como portainjertos e injertos, aplicar las

normas de sanidad e inocuidad, formar y recurrir a técnicos capacitados, entre otras alternativas (Plan Rector Sistema Nacional Mango, 2005; Villegas, 2007).

En México, después de café, la caña de azúcar y la naranja, el mango ocupa el cuarto lugar en superficie sembrada dentro de los cultivos perennes (SIAP, 2008). Las principales zonas productoras (89.8 % de la producción nacional) se ubican en regiones costeras, por lo que se considera que el 91% por ciento de la superficie cultivada se localiza en los estados de Sinaloa, Chiapas, Guerrero, Michoacán, Veracruz, Nayarit, y Oaxaca (Plan Rector Sistema Nacional Mango, 2005; SIAP, 2008). La mayoría de la producción nacional se consume en el mercado interno, exportándose únicamente el 13.8%. La producción empieza en el sureste del país en Chiapas, con el cvs. Ataulfo, recorriéndose las temporadas de cosecha con el aumento de latitud hacia el norte, hasta tener la cosecha más tardía en Sinaloa y pequeñas áreas de Sonora con cultivares de Florida; el 70% de la producción de mango se concentra entre mayo y junio (Ángel y Rebolledo, 2008).

‘Manila’, ‘Ataulfo’, ‘Criollos’, ‘Haden’, ‘Keitt’, ‘Kent’, ‘Manililla’, ‘Obo’, ‘Oro’, ‘Paraíso’ o ‘Petacón’ y ‘Tommy Atkins’, son los principales cultivares en México (SIAP, 2008). ‘Manila’, ‘Ataulfo’, ‘Haden’ y ‘Tommy Atkins’ representan el 77 % de la superficie plantada (Villegas, 2007). Guzmán (1998) citado por Sánchez *et al.* (2008), reporta que en México para la propagación de portainjertos se emplean semillas de cultivares poliembriónicos tipo Manila, y en menor grado se usa el cv. Piña.

Como portainjerto, el cv. Manila presenta las ventajas de poliembrionía y tolerancia a estrés salino (Sánchez *et al.*, 2008), y como productor de frutos tiene gran aceptación en el mercado nacional, tanto para consumo en fresco como industrial, por su atractivo color amarillo, cáscara delgada, pulpa amarilla, firme, dulce y bajo contenido de fibra (Plan Rector Sistema Nacional Mango, 2005). No obstante, a pesar de su excelente sabor en ‘Manila’ existe la tendencia a reducir la superficie plantada, sucediendo lo contrario con el cv. Ataulfo (Villegas, 2007).

‘Manila’ principalmente se consume en el mercado nacional; mientras ‘Ataulfo’ no solo se consume en el mercado interno, sino también se destina a la exportación (Ángel y

Rebolledo, 2008; SIAP, 2008) por presentar mayor tolerancia al manejo durante el transporte, así como mayor vida de anaquel. En la actualidad, la aceptación de ‘Ataulfo’ va creciendo por tener demanda en el mercado exterior y nacional, mostrando mejor precio que los cultivares tradicionales, lo que ha ocasionado el establecimiento de plantaciones nuevas e incluso la reconversión de huertos reinjertando cultivares floridianos con ‘Ataulfo’ (Vázquez *et al.*, 2006).

Un aspecto importante a considerar en el cv. Ataulfo, es que presenta alta incidencia de frutos partenocárpicos (“Mango niño”), éste último es un tipo de espermostenocarpia causada por el aborto embrionario (Gehrke, 2008).

2.2 Embriogénesis en mango

El género *Mangifera* pertenece a la familia *Anacardiaceae*, comprende 69 especies originarias del sureste de Asia y las islas circundantes, excepto *M. africana* que es nativa de África (Gálvez, 2006). Otras especies de importancia económica de esta familia son el pistache, el anacardo y diversas ciruelas tropicales (Plan Rector Sistema Nacional Mango, 2005).

Durante la reproducción sexual (Figura 1, ruta amarilla) el saco embrionario se forma seguido de una secuencia de eventos: diferenciación de la célula madre del nucelo, división por meiosis en la célula madre de la megaspora (megasporogenesis), selección de la megaspora, desarrollo del saco embrionario por mitosis (megagametogénesis), migración nuclear y celularización, maduración del saco embrionario y doble fertilización (Bhat *et al.*, 2005), la doble fertilización es requerida para estimular el desarrollo del huevo y de la célula central, en el embrión cigótico y en endospermo (Koltunow *et al.*, 2001; Singh, 2003). En contraste, la apomixis inicia cuando las células somáticas del óvulo se someten a mitosis para formar el saco embrionario, evitando el proceso esencial de división meiótica para la reducción cromosomal, o también cuando comienzan a formarse paralelamente embriones a partir de tejido nucelar o integumentario (Koltunow *et al.*, 2001; Singh, 2003). Estudios citológicos han revelado que los procesos apomícticos siempre se desvían de la ruta de reproducción sexual en más de un paso (Kultunow, 1993).

En la práctica, muchos investigadores definen a la apomixis como agamosperma o producción de semillas asexualmente, dividiéndose en dos procesos: apomixis gametofítica y embrionía adventicia (Crane, 2001; Grossniklaus *et al.*, 2001). La apomixis gametofítica es el proceso de dos pasos que envuelve la producción de $2n$ megagametofitos, cuyo óvulo desarrolla sin la fusión con el núcleo espermático; este proceso se divide en diplosporia (Figura 1, ruta morada) y aposporia (Figura 1, ruta roja). La embrionía adventicia (Figura 1, ruta verde) es la formación de embriones somáticos de tejido ovular externo al saco embrionario (Dhillon *et al.*, 1993), donde el endospermo en el saco embrionario usualmente es necesario para soportar su maduración, resultando embriones somáticos que a veces compiten con el embrión cigótico dentro del mismo óvulo (Crane, 2001; Bicknella y Koltunow, 2004).

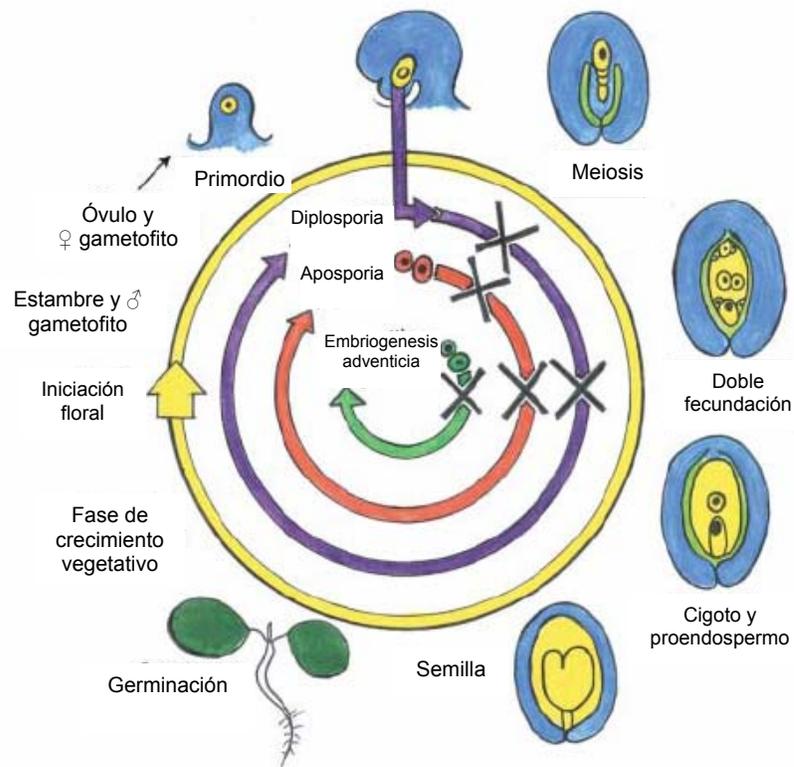


Figura 1. Iniciación y desarrollo de los mecanismos de apomixis relacionados a eventos en el ciclo de vida de angiospermas (Bicknella y Koltunowb, 2004).

Cada uno de los mecanismos de la apomixis difiere en el tiempo de inicio, durante el cual principia el desarrollo del óvulo (Kultonow, 1993), la embriogénesis adventicia es iniciada en el óvulo más tarde que los otros procesos apomícticos efectuándose usualmente en óvulos maduros (Kultonow, 1993; Bhat et al., 2005)

La apomixis ha sido descrita en más de 400 taxas de angiospermas, incluyendo 33 familias representativas (Carman, 1997, citado por Salomão y Allen, 2001). De estas, la mayoría que presenta apomixis gametofítica son poliploides, mientras que aquellas con embrionía adventicia son diploides (Salomão y Allen, 2001), como muchas *Anacardiaceas* incluyendo al mango.

La embrionía adventicia se divide en nucelar y embrionía integumentaria dependiendo del tejido que forme los embriones asexuales, ambos son externos al proceso de desarrollo del megagametofito (Naumova y Vielle-Calzada, 2001) o formación de saco embrionario (Villegas y Andrade, 2008). La primera se origina de células que se diferencian del tejido nucelar, como en mango, y la segunda de células de los integumentos. Los mecanismos de inducción para el desarrollo del embrión cigótico y de los adventicios son desconocido; pero en el desarrollo de estos últimos debe ocurrir mitosis repetida (Crane, 2001) y ausencia de meiosis, por lo que, los embriones nucleares e integumentarios llevan toda la constitución genética de la planta madre, formando un clon estable (Koltunow *et al.*, 1996; Grossniklaus *et al.*, 2001). Las células nucleares o integumentarias destinadas a originar embriones adventicios se llaman embriocitos, las cuales inician su diferenciación después de la megagametogénesis y al dividirse invaden la célula central donde se forma el saco embrionario; los embriocitos generalmente se caracterizan por su denso citoplasma, forma irregular del núcleo, pared celular gruesa, ausencia de plasmodesmo y mayor volumen que el resto de las células de la nucela (Esen y Soost, 1977; Naumova y Vielle-Calzada, 2001).

La poliembrionía es frecuente en la mayoría de los casos de embrionía adventicia, siendo necesaria la fertilización del núcleo polar y del subsiguiente desarrollo del endospermo para la formación de semillas maduras y viables desde el conjunto de embriones nucleares, aunque la iniciación de embriones nucleares es usualmente independiente de la polinización (Crane, 2001; Grossniklaus *et al.*, 2001; Naumova y Vielle-Calzada, 2001). Como lo comprobaron en

cítricos Esen y Soost (1977) y Wakana y Eumoto (1987), quienes señalan que el desarrollo completo de los embriones nucelares es dependiente de la triple fusión y subsiguiente formación del endospermo, porque la falta de fertilización o degeneración de este originan anomalías en el desarrollo de los embriones, no obstante, aclaran que estos procesos no se necesitan para el desarrollo inicial de los embriones adventicios porque la nucela es la fuente nutricional directa. A pesar de los avances, actualmente la interacción entre el desarrollo de embriones y del endospermo en plantas apomícticas aún es pobremente entendida (Bicknell y Koltunow, 2004).

Existen varias técnicas para identificar, examinar y entender los diversos mecanismos apomícticos, tales como las técnicas que involucran la morfología, citología, histoquímica, y los marcadores moleculares (Bhat *et al.*, 2005).

En mango, el megagametofito o saco embrionario usualmente se desarrolla cerca del micrópilo, éste se rodea por tejido nucelar denso que sirve como nutriente (Sturrock, 1967; Thongplave *et al.*, 1983). En cultivares poliembriónicos de mango la nucela puede ser vista con muchas células desintegrándose, así como otras células en contacto con el endospermo del saco embrionario que van creciendo, llenándose de citoplasma denso y volviéndose redondas; al final del desarrollo la nucela restante es absorbida (Sturrock, 1967; Thongplave *et al.*, 1983). En cultivares poliembriónicos de *Citrus* el proceso es semejante, algunos embriones nucelares se desarrollan a partir de células adyacentes al saco embrionario en la mitad del micrópilo, y ocasionalmente desde células en el extremo calazal (estas no completarán su desarrollo) (Esen y Soost, 1977; Wakana y Eumoto, 1987). Esporádicamente en mango los embriones adventicios se pueden desarrollar en el extremo calazal de la nucela (Juliano, 1934 citado por Wakana y Eumoto, 1987).

La morfología y el grado de desarrollo de los embriones adventicios son similares a la del cigoto hasta que se inicia la forma globular (Koltunow *et al.*, 1996; Costa *et al.*, 2004; Sánchez *et al.*, 2006), inclusive ambos en las primeras etapas del desarrollo presentan suspensor (Esen y Soost, 1977; Wakana y Eumoto, 1987). En estadios tempranos, la localización del embrión cigótico en el micrópilo es lo que podría diferenciarlo de los

embriones adventicios, antes de que éstos proliferen (Esen y Soost, 1977; Wakana y Eumoto, 1987). Sánchez *et al.* (2006) encontraron para los portainjertos *Citrus reshni*, *C. volkameriana* y *C. amblicarpa*, que al desarrollar los embriones nucelares se ubicaron en el extremo micropilar del saco embrionario y en las áreas laterales cercanas al micrópilo, por lo que, ubicar el micrópilo no es un indicador confiable para diferenciar el origen de los embriones; además, determinaron que la morfología de los embriones tampoco es un parámetro efectivo para identificar el origen de los embriones.

Asimismo, la formación y desarrollo de los embriones adventicios es independiente y asincrónica dentro del mismo óvulo, presentando diferentes estados de crecimiento originando competencia y efecto de ‘empaquetamiento’ que puede afectar su morfología y tamaño (Parisot, 1988; Koltunow *et al.*, 1996; Batygina y Vinogradova, 2007). La diferenciación funcional y acceso a los nutrientes del endospermo entre la calaza y micrópilo es la explicación de la diferencia en el desarrollo de embriones adventicios entre ambas regiones (Esen y Soost, 1977; Wakana y Eumoto, 1987). El desarrollo asincrónico de los embriones origina que en semillas maduras se pueda presentar embriones inmaduros, que no son aptos para germinar (Costa *et al.*, 2004).

2.3 Poliembrionía en mango

La apomixis está representada en las siguientes especies de importancia agrícola: *Citrus*, *Euphorbia*, *Mangifera*, *Malus*, *Ribes*, *Beta*, y en los forrajes tropicales *Panicum*, *Brachiaria*, *Dichanthium*, y *Pennisetum*. (Singh, 2003; Bicknella y Koltunow, 2004). No obstante, el proceso apomíctico, así como las estructuras y desarrollo los embriones ha sido investigada sólo en algunos aspectos para algunas especies (Naumova, 1993, citado por Naumova y Vielle-Calzada, 2001).

Entre los frutales destaca la ocurrencia de poliembrionía en el kiwi (*Actinidia chinensis*), mango, durazno (*Prunus persica*), almendro (*Prunus dulcis*), y cítricos (Martínez-Gómez *et al.*, 2004), de estas especies, los cítricos son los que poseen la mayoría de los estudios sobre embriogénesis y poliembrionía, con más de 63 investigaciones (Bacchi *et al.*, 1943; Esen y Soost, 1977; Wakana y Eumoto, 1987; Koltunow, 1993; Bastianel *et al.*, 1998; Domínguez *et*

al., 1998; García *et al.*, 1999; Ribeiro *et al.*, 1999; Koltunow *et al.*, 2001; Soares-Filho *et al.*, 2002; Darlan *et al.*, 2006; Sampaio *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2006; Pérez-Tornero y Porras, 2008). Por lo que, se considera al género *Citrus* como modelo de embriogénesis nucelar (Koltunow, 1993) y de poliembrionía para otros frutales. Mientras que en mango se encontraron 10 trabajos al respecto: Wester (1912), Arndt (1935), Juliano (1937), Kennard (1955), Sachar y Chopra (1957), Sturrock (1967), Prasad y Prasad (1972), Thongplave *et al.*, (1983), Parisot (1988) y Mo *et al.* (2005).

La forma nucelar de la embriogénesis adventicia es la más común y estudiada, considerando recientemente al género *Citrus* como el sistema modelo para el proceso de embriogénesis nucelar (Kultonow, 1993).

La poliembrionía fue descubierta por A. Leewenhoek en 1719, quién analizó el desarrollo de dos plántulas emergidas de la misma semilla en *Citrus* (Prasad y Prasad, 1972). En mango, el primer reporte lo efectuó Schacht en 1859 (Sturrock, 1967). La poliembrionía es el desarrollo de dos o más embriones en una semilla (Dhillon *et al.*, 1993). Se clasifica en simple o múltiple, de acuerdo al número de sacos embrionarios presentes en el óvulo (Batygina y Vinogradova, 2007 – Anexo A-), y en asexual, si se genera mediante apomixis como en mango (Sachar y Chopra, 1957, citado por Ravishankar *et al.*, 2004), o sexual si se genera por fisión del embrión cigótico o la presencia de más de un cigoto en el óvulo (Figura 2; Singh, 2003).

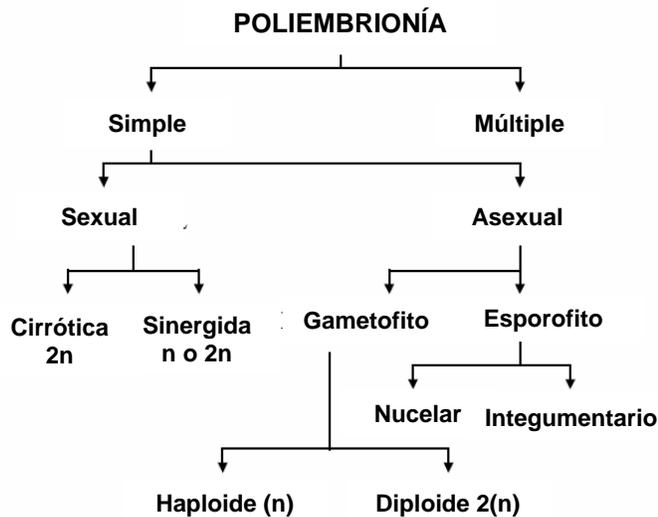


Figura 2. Clasificación de la poliembrionía en angiospermas (Singh, 2003).

Basándose en el número de embriones presentes en la semilla, los cultivares de mango se pueden dividir en monoembriónicos y poliembriónicos. Los cultivares monoembriónicos son de origen hindú, de zonas subtropicales, con cáscara coloreada (mezclas de rojo, morado y/o amarillo), contienen un embrión cigótico que generará un híbrido resultado de la fusión del gameto femenino y el masculino (Eiadthong *et al.*, 1999; Vázquez *et al.*, 2006). El otro grupo son los poliembriónicos, de origen tropical, de Indochina, Tailandia, Malasia, Indonesia y Filipinas, con cáscara de tonalidades que van del verde a verde claro o amarillo; las semillas producen un embrión cigótico y de uno a seis embriones nucelares que generalmente reproducen el genotipo de la planta madre (Viruel *et al.*, 2005; Cordeiro *et al.*, 2006; Vázquez *et al.*, 2006), excepto cuando hay mutación o variación somática (Dhillon *et al.*, 1993). Esta característica permite, dependiendo del grado de poliembriónía, la reproducción vegetativa de las especies a partir de semilla y a la vez posibilita la obtención de individuos diferentes (cigóticos) con lo cual asegura la perpetuación de la especie (Villegas y Andrade, 2008). En ambos grupos se incluyen las variedades de mango que se cultivan en nuestro país (Villegas, 2007).

Muchos de los genes que controlan el desarrollo sexual también se responsabilizan de la inducción de la poliembriónía, siendo expresados en la nucela en diferentes momentos, alterando la expresión espacial y temporal necesaria para la reproducción sexual normal (Koltunow *et al.*, 2001). Los actores y genes que permiten a las células en el óvulo ser ‘switch’ para iniciar la apomixis aún se desconocen (Bicknella y Koltunow, 2004).

Las fitohormonas, como parte de la expresión de los genes, juegan un rol significativo en la aparición de la poliembriónía; tal es el caso de las auxinas, donde el transporte polar de estas pueden afectar el desarrollo del embrión y determinar su simetría (Batygina y Vinogradova, 2007).

Tanto los cultivares monoembriónicos como los poliembriónicos de mango pueden intercruzarse y la poliembriónía del híbrido resultante será gobernada por un gen simple dominante (Aron *et al.*, 1998; Ravishankar *et al.*, 2004) que originará diferentes grados de poliembriónía.

La apomixis es controlada genéticamente por un *locus* Mendeliano dominante, interactuando con factores ambientales o externos a la planta (Aron *et al.*, 1998; García *et al.*, 1999; Singh, 2003). La frecuencia de embriones en algunas especies apomícticas es influenciada por fotoperiodo, temperatura, sales inorgánicas y nivel nutrimental, y elementos que afectan la polinización (Kultonow, 1993; García *et al.*, 1999). Por lo tanto, algunos factores que afectan la polinización, fertilización y desarrollo de la semilla también afectan el porcentaje de poliembrionía y número de embriones por semilla (Schnell y Knight, 1991; Andrade-Rodríguez *et al.*, 2004). Así, las semillas de *Mangifera indica* pueden expresar mayor o menor grado de poliembrionía en distintos hábitat, incluso mostrar monoembrionía (Juliano, 1937, citado por Batygina y Vinogradova, 2007).

Cabe indicar que entre cultivares y en cada cultivar de mango poliembriónico varía el número de embriones por semilla, y estos son desiguales en tamaño y forma, siendo algunos demasiado pequeños (Arndt, 1935; Parisot, 1988; Mo *et al.*, 2005). La poliembrionía se relaciona con escasa germinación y bajo vigor de las plántulas procedentes de los embriones pequeños, ya que al incrementar el número de embriones disminuye su tamaño y aumenta la competencia por espacio y nutrientes (Andrade-Rodríguez *et al.*, 2004; Mo *et al.*, 2005; Darlan *et al.*, 2006). Al germinar semillas poliembriónicas se debe considerar que habrá variación en el tiempo de emergencia y en el desarrollo de las plántulas (Arndt, 1935).

El número de embriones puede ser determinado por conteo directo o por conteo del número de plántulas emergidas en el semillero (Schnell y Knight, 1992). El primer método usualmente determina el número total de embriones; mientras que, el segundo muestra el número de embriones capaces de germinar en condiciones de semillero (Pio *et al.*, 1984, citado por Andrade-Rodríguez *et al.*, 2004), ya que no todos los embriones, generalmente los más pequeños, cuentan con las reservas nutritivas para su crecimiento o pueden sufrir deshidratación y morir. En muchos casos, por la competencia entre embriones, las plántulas cigóticas probablemente degeneren o no se desarrollen (Sachar y Chopra, 1957, citado por Cordeiro *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2004).

Algunos autores aseveran que las plántulas nucelares en vivero pueden ser fácilmente identificables, por presentar uniformidad en vigor y características morfológicas semejantes a la planta madre (Dhillon *et al.*, 1993). Para la propagación de plantas de mango, los productores comúnmente conservan una planta por semilla y eliminan a las menos vigorosas, considerando que la planta será nucelar y por lo tanto presentará uniformidad (Galán, 1999; Cordeiro *et al.*, 2006). Sin embargo, en investigaciones donde se ha llevado a cabo esta práctica, y al aplicar marcadores genéticos para identificar el origen de los embriones, se ha encontrado que las plantas con mayor vigor pueden ser cigóticas; Cordeiro *et al.* (2005) hallaron 90 % de plantas cigóticas en plántulas de mango seleccionadas por ser las más vigorosas.

Gálvez (2006) evaluó la variación genética entre 112 individuos en México, encontró incluso variación genética en el cv. Ataulfo, posiblemente debido a que se ha propagado mediante semilla a lo largo del país.

Por lo anterior, para asegurar homogeneidad al propagar mangos poliembriónicos mediante semilla se debe considerar el porcentaje de plantas nucelares que emerjan en relación a las cigóticas (Koltunow *et al.*, 2001), ya que si la planta seleccionada se emplea como patrón tendrá efectos en el vigor y rendimiento de la planta (Schnell y Knight, 1991). Andrade-Rodríguez (2002) en estudios realizados con *Citrus volkameriana*, *C. reshni* y *C. amblycarpa*, concluyeron que sólo los portainjertos *C. reshni* y *C. amblycarpa* son de reproducción apomíctica nucelar, por lo que, pueden ser propagados a través de semilla sin perder la homogeneidad genética.

2.3.1 Ventajas y desventajas de la embriogénesis nucelar

Las especies poliembriónicas muestran las ventajas de las plantas apomícticas (Goldenberg y Shepherd, 1998, citado por Costa *et al.*, 2004), al poseer mayor capacidad para colonizar ambientes inhóspitos y presentar distribución más amplia que las especies no apomícticas.

Los cultivares poliembriónicos, como ‘Manila’ y ‘Ataulfo’, comúnmente se propagan por semilla obteniendo en su mayoría plantas idénticas a la planta madre, sí proceden de embriones nucelares (Galán, 1999). El empleo de plantas nucelares asegura menor variabilidad, al considerar que el patrón y el injerto ejercen influencia en la altura, rendimiento del árbol ($t\ ha^{-1}$ y $frutos\cdot m^2$) y características del fruto (Vargas *et al.*, 2004).

Los cultivares poliembriónicos de mango también se eligen como patrones por ser más productivos que los cultivares monoembriónicos, tal vez por el estímulo originado del desarrollo de frutos jóvenes con varios embriones nucelares (Sturrock, 1967; Aron *et al.*, 1998).

Como forma de reproducción vegetativa, la poliembriónía presenta otras ventajas: rejuvenecer clones viejos que han perdido el vigor debido a la propagación vegetativa continua, ya que pueden ser renovados mediante líneas nucelares del clon afectado (Koltunow *et al.*, 2001; Villegas y Andrade, 2008). También se pueden obtener plantas libres de virus, viroides, fitoplasmas y bacterias que pueden ser de utilidad en la planeación de programas de saneamiento y certificación (Bicknella y Koltunow, 2004; Villegas y Andrade, 2008).

Para poder aprovechar los beneficios de la poliembriónía en mango es necesario superar algunos inconvenientes. Durante la germinación, se presenta crecimiento simultáneo de varias plantas de una semilla, lo que origina competencia y puede ocasionar deformaciones en la región de unión tallo-raíz (Galán, 1999), o inclusive que las plantas crezcan unidas (Barbosa *et al.*, 2009), impidiendo el adecuado desarrollo de las mismas. En la propagación de especies frutales muchas veces se presenta la limitante de que las plántulas apomícticas expresan características juveniles y largo periodo juvenil (Domínguez *et al.*, 1998), como retraso en la floración; sin embargo, esto se puede superar mediante injertos.

La importancia de identificar a los embriones nucelares y a el cigótico, es la posibilidad de implementar programas de mejoramiento genético al poder elegir en etapas tempranas el híbrido resultado de la cruce (Domínguez *et al.*, 1998; Andrade-Rodríguez *et al.*, 2005; Villegas y Andrade, 2008), además permite elegir a los embriones nucelares para la propagación de

portainjertos e injertos sin enfermedades. La técnica para poder identificar de forma más precisa el origen de las plántulas, son los marcadores genéticos. En mango sólo se han reportado cinco trabajos: con isoenzimas, Gazit y Knight (1989), Schnell y Knight (1992), Degani *et al.* (1993), y Mo *et al.*, 2005, y con marcadores RAPD, Cordeiro *et al.* (2005). Estas investigaciones son escasas si se comparan con lo realizado en el género *Citrus*, con más de 48 trabajos para identificar el origen cigótico o nucelar de los embriones mediante marcadores genéticos (Xiang y Roose, 1988; Bastianel *et al.*, 1998; Domínguez *et al.*, 1998; García *et al.*, 1999; Ribeiro *et al.*, 1999; Ruíz *et al.*, 2000; Cristofani *et al.*, 2001; Soares-Filho *et al.* 2002; Andrade-Rodríguez *et al.*, 2005; Nageswara *et al.*, 2007).

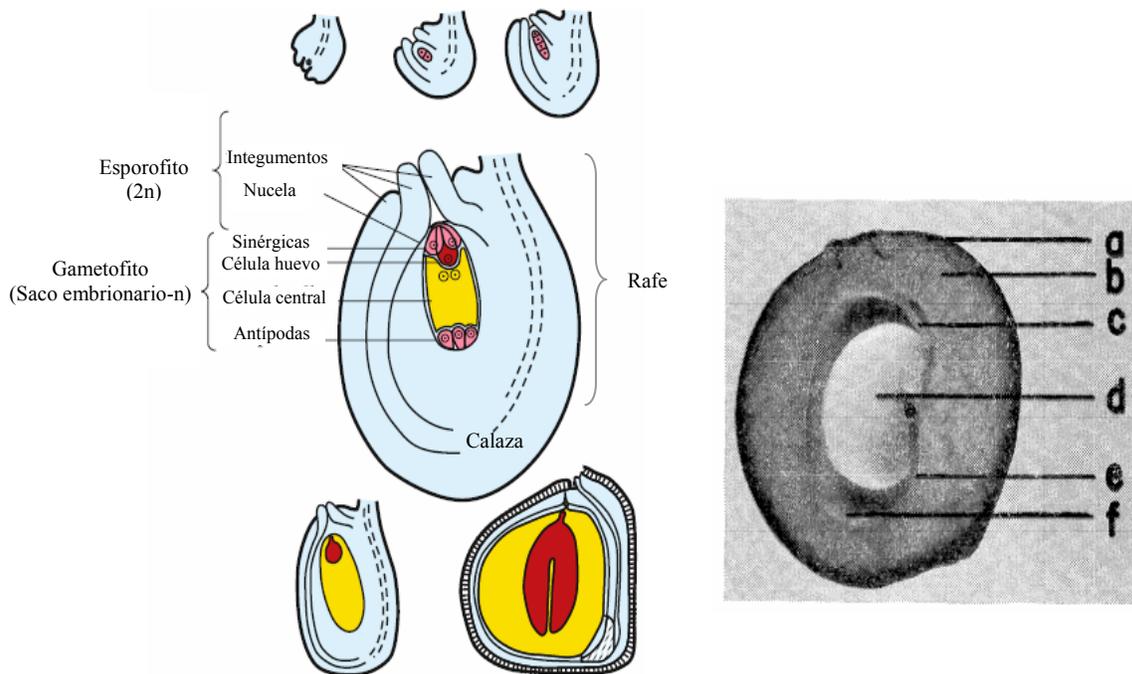
Sólo la investigación de Cordeiro *et al.* (2006) ha relacionado el origen cigótico con la ubicación de los embriones en la semilla de mango, numerando al posible embrión cigótico como 1 y ubicándolo cerca del lado basal (lado convexo) de la semilla (tomaron como referencia lo indicado por Sachar y Chopra, 1957), el resto de los embriones los numeraron de acuerdo a la cercanía con el embrión 1; sus resultados muestran que no siempre el embrión cigótico se encuentra en la posición 1 (donde debiera estar el micrópilo). En cítricos, entre los trabajos para ubicar al embrión cigótico destacan los de Andrade-Rodríguez *et al.* (2005), quienes numeraron a los embriones en sentido opuesto al de las manecillas del reloj, por tamaño y con referencia a la cercanía con el micrópilo de la semilla (detectable en las semillas de cítricos); concluyen que en *Citrus reshni* las plántulas cigóticas se originaban siempre de los embriones pequeños localizados cerca o en el extremo micropilar, mientras que en *C. volkameriana*, dichos embriones no siempre fueron los cigóticos. Ribeiro *et al.* (1999) también estudiaron a los embriones cigóticos y nucelares de semillas de cítricos; en los híbridos de *C. sinensis* Osb. y *Poncirus trifoliata* (L.) determinaron que la mayoría de los embriones cigóticos se localizaban próximos a la región micropilar (el resto estaban hacia el interior de la semilla) en estadios globular y codiforme.

En esta investigación en mangos poliembriónicos, no sólo se buscaron relacionar al embrión cigótico con la ubicación en la semilla, sino también con su tamaño. Estas referencias podrían otorgar conocimiento práctico para identificar los dos tipos de embriones

directamente en la semilla, permitiendo aplicar métodos de selección más económicos (Villegas y Andrade, 2008).

2.4 Morfología de las semillas y embriones de mango

Morfológicamente el mango presenta un ovario, el cual es súpero, globoso, y contiene un solo óvulo bitegumentado (Sturrock, 1967; Galán, 1999). Característicamente las Anacardiaceas, y el mango, poseen por ovario un óvulo de tipo anátropo ascendente, crasinucelado (con nucelo grande), y con saco embrionario derivado de megasporogénesis tipo *Polygonium* (Figura 3), al constar de una ovocélula, dos sinérgicas, tres antípodas y dos núcleos polares (Niembro, 1988; Piennar y Teichma, 1998; Batygina y Vinogradova, 2007). En la Figura 4 se observa el ovario maduro o fruto de mango.



a

Figura 4. Fruto monoembrionario del cv. Paheri cinco semanas después de la fertilización: a) exocarpo, b) mesocarpo, c) funículo, d) embrión, e) endocarpo, f) lóculo (Kennard, 1955). El pedúnculo se ubica en la parte superior.

El óvulo anátropo consta de nucelo grueso y recto (cuerpo central con células vegetativas) rodeado por dos tegumentos, funículo o filamento que conecta al óvulo con la placenta, y calaza o región donde confluyen los tegumentos y nucelo; se observa la rafe, región periférica que se ubica en el plano mediano constituida por uno o dos haces vasculares que recorren desde el funículo hasta la calaza. El micrópilo es el orificio que queda en las terminaciones de los tegumentos y esta cercano al funículo (Esau, 1982; Espinosa y Engleman, s/a).

De manera similar al óvulo, en la semilla podemos encontrar diferentes regiones que permiten describirla, tales como: la rafe que puede aparecer como un ligero reborde, la calaza o zona donde los tegumentos se unen a la calaza, el micrópilo que es rara vez visible, y la cubierta seminal constituida por tegmen (tegumento interno) y testa (tegumento externo) (Esau, 1982; Espinosa y Engleman, s/a).

La semilla de mango es ovoide, oblonga, alargada y se encuentra recubierta por un endocarpo duro, fibroso, aplanado, alargado, abultado hacia el lado basal a lo largo del cual hay una ranura con múltiples y largas fibras introducidas en el mesocarpo o pulpa (Parisot, 1988). La semilla presenta una testa delgada, blanca, de consistencia semejante al papel, adherida al endocarpo y no a los embriones; y un tegumento de color café que está fijado a los embriones (Parisot, 1988). En semillas maduras, el embrión llena completamente el endocarpo (Kennard, 1955).

Durante la embriogénesis se va formando el cuerpo de la planta, que consiste en el epicótilo (sobre la base de los cotiledones), los cotiledones, el hipocótilo (entre la base cotiledonar y la radícula), la radícula y el meristemo de la radícula. Si el epicótilo se encuentra suficientemente desarrollado y muestra rudimentos de las primeras hojas verdaderas, es llamado plúmula (Arndt, 1935; Laux *et al.*, 2004; Batygina y Vinogradova, 2007).

Cada embrión de mango comprende dos cotiledones y un epicótilo, con raras excepciones en las que pueden compartir cotiledones, presentar 3 cotiledones o 2 plúmulas (Mo *et al.*, 2005). En el caso de que la semilla sea monoembriónica los cotiledones son

usualmente idénticos y complementarios, capaces de ocupar la cavidad interna del endocarpo o sólo una parte (Parisot, 1988); en semillas poliembriónicas, el volumen, peso y forma de los cotiledones puede variar de un embrión a otro, y en el mismo embrión (Arndt, 1935; Parisot, 1988; Costa *et al.*, 2004).

Las diferencias morfológicas entre embriones es causada principalmente por la competencia de espacio dentro de las semillas (Parisot, 1988; Costa *et al.*, 2004), así como por la independencia en los tiempos de desarrollo (Kultonow, 1993). Entre embriones también se presenta distintos grados de maduración (Costa *et al.*, 2004).

El eje embrionario comprende al epicótilo, hipocótilo y radícula; su orientación apical-basal está generalmente alineada al eje calazal-micropilar del óvulo, sugiriendo que la polaridad del embrión es guiada por el tejido maternal o nucela (Laux *et al.*, 2004). En mango, Parisot (1988) y Mo *et al.* (2005) describen como la orientación de los embriones es generalmente hacia el micrópilo que esta dispuesto hacia el pedúnculo floral. Asimismo, Parisot (1988) describe como los embriones comúnmente se localizan hacia la región del micrópilo, aunque dependiendo de la variedad, rara vez se pueden ubicar en el extremo opuesto o punto de inserción del funículo.

Pocos son los reportes realizados referentes a las características morfológicas de los embriones en mangos poliembriónicos, sin existir referencias en los cvs. Manila y Ataulfo, u otro cultivar de importancia en México.

2.5 Marcadores genéticos aplicados en mango

Los marcadores son características distintivas que se manifiestan de manera constante en un organismo o población, estos marcadores generalmente se emplean para la discriminación y clasificación de genotipos. Hay tres tipos de marcadores genéticos: los morfológicos, los bioquímicos y los moleculares (ADN y ARN).

Los marcadores genéticos visualizan diferencias tangibles entre las secuencias homólogas del ADN de los organismos; dichas diferencias resultan de cambios o reorganizaciones entre los pares de bases que conforman este tipo de moléculas, como las translocaciones, inversiones, inserciones o deleciones (Valadez y Kahl, 2005).

Los marcadores tienen que presentar las siguientes características para ser considerado eficiente y poder utilizarse como herramienta genética: ser polimórfico (multialélico), tener codominancia, no ser epistático (se puede leer el genotipo a partir del fenotipo, independientemente del genotipo de otros *loci*), presentar neutralidad (las sustituciones alélicas no tiene otros efectos fenotípicos), y ser insensible a los efectos del ambiente (Nuez *et al.*, 2000).

Las herramientas moleculares ofrecen diferentes alternativas para el mejoramiento genético de mango, al ser empleadas para caracterizar la diversidad y relaciones genéticas en diferentes especies y cultivares de mango, identificar genes de interés comercial, mejorar especies a través de la tecnología de transferencia genes, crear variación en cultivares desarrollados *in vitro*, determinar etiológicamente enfermedades, entre otros beneficios (Krishna y Singh, 2007). En el Cuadro 1 se aprecia la importancia de los marcadores moleculares en el desarrollo del cultivo de mango.

Cuadro 1. Avances realizados en mango empleando herramientas moleculares.

Herramientas Biotecnológicas	Título de la Investigación	Referencia
Marcadores Moleculares		
Isoenzimas	Evaluación de variación genética en mango usando marcadores isoenzimáticos	Gan <i>et al.</i> (1981)
	Identificación de diferentes <i>loci</i> con 17 alelomorfismos en 41 cultivares	Degani <i>et al.</i> (1990)
	Identificación de mangos híbridos resultantes de cruzas	Jintanawongs y Changtragoon (2000)
Marcadores de ADN		
RAPD	Caracterización de mutantes tolerantes a toxinas fúngicas	Jayasankar <i>et al.</i> (1998)
	Reconocimiento de la diversidad genética en mango cv. Kensington	Bally <i>et al.</i> (1996)
	Evaluación de la diversidad genética en razas y cultivares	Karihaloo <i>et al.</i> (2003)
	Agrupación de variedades basándose en sus similitudes y divergencias	Saouza y Lima (2004)
RFLP	Confirmación de relaciones filogenéticas y distribución geográfica de <i>Mangifera</i> spp. en Tailandia	Eiadthong <i>et al.</i> (1999)
	Estimación de relaciones genéticas en algunos cultivares poli- y mono-embriónicos	Kumar <i>et al.</i> (2001)
VNTR	Huellas de ADN y análisis genético de algunos genotipos e híbridos de mango	Adato <i>et al.</i> (1995)
ISSR	Identificación de secuencias de iniciadores mostrando polimorfismo entre cultivares de Australia	González <i>et al.</i> (2002)
SSR	Identificación y variación genética en cultivares de mango de Tailandia	Eiadthong <i>et al.</i> (1999)
	Evaluación de diversidad en germoplasma de mango	Duval <i>et al.</i> (2005)
AFLP	Estimación de la relación genética y diversidad de especies de mango	Yamanaka <i>et al.</i> (2006)

Fuente: Krishna y Singh (2007).

2.5.1 Marcadores morfológicos

Los marcadores morfológicos emplean las diferencias fenotípicas en el análisis genético; sólo se pueden usar como marcadores si son controlados por un *locus* y si su expresión es reproducible en cualquier ambiente (Vázquez *et al.*, 2000).

Tradicionalmente los cultivares comerciales de mango se identifican empleando características de hoja, panícula, fruta y semilla con endocarpo (Vasanthaiyah *et al.*, 2007), sin embargo, estas características pueden cambiar entre ambientes, por lo que se puede poner en duda identificaciones previas de algunos cultivares, que frecuentemente tiene distintos nombres en diferentes áreas (Krishna y Singh, 2007). Además, los marcadores morfológicos en frutales tropicales presentan la desventaja de que generalmente se evalúan a nivel de toda la planta y cuando esta llega a estado adulto; esto significa esperar durante varios años (Azofeifa-Delgado, 2006).

A pesar de que en muchos casos los marcadores moleculares son preferidos con relación a los marcadores morfológicos, estos siguen siendo de utilidad, como lo demostraron Singh *et al.* (2009), quienes evaluaron la diversidad genética de cinco cultivares de mango con importancia comercial (Banganapalli, Dashehri, Langra, Amrapali y Mallika) empleando marcadores morfológicos y moleculares (ISSR). Encontraron variación intracultivar en los 5 cultivares al usar 17 marcadores morfológicos, no obstante, con los ISSR no hallaron variación en Amrapali ni en Dashehri, por lo que determinan que estos cultivares son estables genéticamente.

Gálvez (2006) caracterizó morfológica y molecularmente (AFLP y SSR) mangos criollos de Chiapas (incluyendo 'Ataulfo'), y determinó sus relaciones genéticas con mangos criollos y mejorados de otras partes de México y del mundo. De las 53 variables morfológicas, eligió 9 (longitud, ancho, grosor, peso, contenido de pulpa, cantidad de fibra y longitud de fibra en fruto, y ancho y longitud de hoja) por ser las más descriptivas. Halló variabilidad morfológica significativa entre los mangos de Chiapas, donde el cv. Ataulfo y dos mangos

criollos de Tuxtla Chico ('Ajo' y 'Sin nombre-2') presentaron las mejores características de fruto, indicando su potencial en el mejoramiento genético.

2.5.2 Marcadores bioquímicos

Las isoenzimas y el ADN empleados como marcadores, presentan claras ventajas sobre los marcadores morfológicos, por ser abundantes en el estudio de una población segregante, ser neutros, con mínimo o nulo efecto epistático o pleiotrópico. Además, superan las limitantes de los marcadores morfológicos: su escasez en las poblaciones, su estacionalidad temporal, la dependencia de los estadios de desarrollo de la planta, y los posibles efectos deletéreos (ej. Albinismo) (Nuez *et al.*, 2000; Krishna y Singh, 2007). No obstante, las isoenzimas también tienen la desventaja de ser afectadas por el estado de desarrollo y tipo de tejido empleado.

Como marcadores bioquímicos pueden emplearse las isoenzimas y/o las proteínas de semillas. Las isoenzimas son diferentes formas moleculares de la misma enzima que cataliza una reacción química específica. Las isoenzimas codificadas por los alelos en la mayoría de los loci, son codominantes (distingue los individuos heterocigóticos y homocigóticos), y no producen efectos deletéreos en homocigosis recesiva ni a través de efectos pleiotrópicos y/o epistáticos (Vázquez *et al.*, 2000)

Para obtener los extractos vegetales, en principio se puede emplear cualquier tipo de tejido u órgano, encontrando en menor o mayor grado suficiente cantidad de proteína; no obstante, en los cotiledones, plántulas, polen y hojas jóvenes, metabólicamente muy activas, se puede hallar la concentración proteica más alta y gran actividad enzimática (Vázquez *et al.*, 2000).

Para la electroforesis de proteínas, los medios de soporte utilizados pueden ser papel, acetato de celulosa, agarosa, almidón y poliacrilamida, siendo los dos últimos lo más comunes (Vázquez *et al.*, 2000).

Degani *et al.* (1990) examinaron a partir de tejido foliar, los sistemas de enzimas: fosfoglucosa isomerasa (PGI; EC 5.3.1.9), triosafosfata isomerasa (TPI; EC 5.3.1.1), leusina aminopeptidasa (LAP; EC 3.4.11.1), específica-NAPD isocitrato deshidrogenasa (IDH; EC 1.1.1.42), fosfoglucomutasa (PGM; EC 2.7.5.1) y aconitasa (ACO; EC 4.2.1.3). Identificaron seis *loci* con 17 alelomorfismos en 41 cultivares de mango originados de polinización abierta y autopolinización; como resultado determinaron el origen de algunos cultivares producto de la cruce, y en otros cultivares refutaron los supuestos orígenes que previamente se habían reportado.

2.5.3 Marcadores moleculares

Los marcadores de ADN representan un avance cuantitativo al añadir a las cualidades de las isoenzimas (no ser influenciados por el ambiente y tener interacción nula o identificable con otros marcadores) la de poder encontrarse en número prácticamente ilimitado, y de acceder a mayor rango de variabilidad (exones e intrones) (García-Mas *et al.*, 2000).

Los marcadores de ADN son secuencias genómicas localizadas en un mismo *locus* pero que difieren en su secuencia de bases nitrogenadas (Valadez y Kahl, 2005). Las variaciones en los marcadores de ADN no se muestran por sí mismas en el fenotipo, porque a veces dichas variaciones son diferentes en un nucleótido del gen (Velasco, 2005).

Para obtener marcadores del ADN se emplean diferentes métodos agrupados en tres categorías: A) Híbrido tipo “Southern”, explora variaciones de longitud de fragmentos de ADN ocasionados por la restricción del genoma con alguna endonucleasa específica (ej. RFLP); B) Reacción de Polimerización en Cadena o PCR, utiliza secuencias de oligonucleótidos (aleatorias, semialeatorias o específicas) que inician la síntesis *in vitro* de fragmentos de ADN de longitudes variables, no mayores de 6 kb (ej. RAPD, AFLP); C) PCR o producto de su amplificación combinada con la Hibridación tipo “Southern”, permite la optimización de un ensayo de tipificación, con los resultados de la PCR se detecta un patrón particular de fragmentos “primera generación”, que se híbridan con alguna sonda radioactiva

que detecte microsátélites, revelando otro patrón totalmente diferente o la “segunda generación” (Valadez y Kahl, 2005).

Cualquier molécula de proteínas, de ARN o ADN empleadas como marcador, es monitoreada al visualizar su disociación y observar bandas originadas por los fragmentos separados, por medio de electroforesis en una matriz porosa, generalmente gel de agarosa o poliacrilamida (García-Mas *et al.*, 2000). La electroforesis tiene como principio la aplicación de un campo eléctrico a una molécula cargada (proteínas, aminoácidos y ácidos nucleicos) que se encuentra sobre un medio de soporte más o menos inerte, en una solución con cierto pH; por citar, la molécula de ADN está cargada negativamente y por lo tanto migran hacia el ánodo (+) (Azofeifa-Delgado, 2006). Las diferencias en las cargas o las relaciones carga/peso molecular son la base para la migración diferencial al someterse al campo eléctrico (Vázquez *et al.*, 2000). También se debe considerar que la composición de la solución buffer empleada en el gel y en los electrodos, influyen en la migración de las moléculas (García-Mas *et al.*, 2000).

Los marcadores son codominantes si cada individuo heterocigoto tiene otro alelo situado en otra posición del gel, correspondiente a un fragmento de ADN con un número de bases distinto. Los marcadores son dominantes si sólo hay dos genotipos, el que presenta una banda y el que no la tiene; la presencia de banda es dominante sobre su ausencia (García-Mas *et al.*, 2000).

2.5.3.1 Extracción de ADN

El mango al ser un frutal tropical, presenta problemas para lograr aislar suficiente ADN de calidad (sin degradación y sin contaminantes) por la presencia de polisacáridos, que inhiben la actividad enzimática durante el procesamiento para obtención y análisis del ADN, y por los fenoles, que inhiben las reacciones de PCR (Ramírez *et al.*, 2004; Krishna y Singh, 2007). Los polisacáridos y muchos tipos de metabolitos secundarios de árboles tropicales forman complejos insolubles con los ácidos nucleicos durante la extracción (Pandey *et al.*, 1996, citado por Ramírez *et al.*, 2004).

Saldaña y Salazar (2007) estudiaron la eficiencia de las metodologías de extracción de ADN utilizadas en mango, a partir de tejido foliar de los cvs. Haden, Smith, Tommy Atkins y Kent. Probaron 4 técnicas: Dellaporta *et al.* (1983) con modificaciones, Bahl y Pfenninger (1996), Porebski *et al.* (1997), y Doyle y Doyle (1990) con modificaciones. De las cuatro metodologías, la mejor fue la de Doyle y Doyle (1990) con modificaciones, permitiendo aislar la mayor cantidad de ADN genómico intacto. Además, concluyen que lo mejor es emplear 250 g de tejido para la extracción, aplicar PVP y metasulfito de sodio como antioxidante, usar el buffer de extracción con 2X CTAB y Tris-base, así como liofilización antes de resuspender el “pellet” en TE y tratar con ARNasa.

El protocolo de Doyle y Doyle (1990) basado en el método CTBA también fue aprobado por Ramírez *et al.* (2004), entre otros protocolos que evaluaron para extracción y purificación de ADN de mango con calidad para utilizarse en la PCR.

El primer paso para la extracción consiste en la pulverización del tejido, generalmente con nitrógeno líquido o hielo seco, para romper la pared celular y liberar los constituyentes celulares (Rogers y Bendich, 1988; Velasco, 2005). En el siguiente paso, se homogeneiza el tejido con un tampón de extracción para romper la membrana celular, y se desarrolla un procedimiento de purificación del ADN. Algunos de los compuestos empleados en la extracción son:

- **Tris:** Es un tampón biológico, cuya función es mantener constante el pH de la solución (pH 7.0-8.0) (García-Mas *et al.*, 2000; Velasco, 2005).
- **Agentes quelantes** (EDTA, EGTA y Fenantrolina): Inhibe acción de ARNasas y otras nucleasas para proteger el ADN, mediante la captura de cationes libres que son cofactores para su actividad, como el ión magnesio o calcio (Rogers y Bendich, 1988; García-Mas *et al.*, 2000; Velasco, 2005).
- **Sal (Cloruro de sodio, acetato de potasio, acetato de sodio):** Se emplean altas concentraciones para prevenir la contaminación de la muestra con polisacáridos; la separación de los polisacáridos del ADN se logra por su solubilidad diferencial en presencia de altas concentraciones (aumentan el poder iónico de la solución), ocasionando la precipitación del ADN (Velasco, 2005). El cloruro de sodio inhibe la actividad de

algunas enzimas como polimerasas, ligasas y endonucleasas de restricción (Velasco, 2005).

- **Detergente:** Facilita la ruptura de las membranas celulares y nucleares; y también inhibe la actividad de enzimas (Valadez y Kahl, 2005).
- **SDS o dodecil sulfato sódico y/o acetato de potasio (detergente aniónico):** Separa el ADN de las proteínas y restos celulares, evitando que el ADN quede atrapado en los residuos celulares; manteniendo el ADN en suspensión y precipitando los residuos por centrifugación (Rogers y Bendich, 1988; González *et al.*, 1995; Velasco, 2005).
- **Lauril-sarcosine (detergente aniónico):** Semejante al SDS, que inhibe las hexoquinasas.
- **CTBA o bromuro de hexadeciltrimetilamonio (detergente catiónico):** Se adhiere fuertemente al ADN, desplaza las proteínas y previene la degradación del ADN; limita la contaminación por polisacáridos, aunque sin mucha eficacia (Rogers y Bendich, 1988; García-Mas *et al.*, 2000).
- **Bisulfito sódico o Metasulfito de sodio:** Es un antioxidante que escinde enlaces disulfuro; ayuda en la desnaturalización de estructuras ricas en GC, por lo que se emplea en plantillas que tengan largas secuencias de G y C. También es un agente reductor y estabilizador de enzimas (Salazar y Saldaña, 2007).
- **2-mercaptoetanol:** Evita la oxidación del tejido al romper enlaces disulfuro de modo reversible y forma disulfuros mixtos con las cadenas laterales de las proteínas (Velasco, 2005).
- **PVP (polivinilpirrolidona):** Inhibe la acción de polifenoloxidasas (González *et al.*, 1995; Rogers y Bendich, 1988; Velasco, 2005).

La mezcla del tejido con el buffer de extracción se incubaba a 65 °C desnaturalizando las proteínas. Para retirar las proteínas desnaturalizadas y la mayoría de los polisacáridos, se agrega una sal como el acetato de potasio frío o alcohol frío, como isopropanol. El proceso de centrifugación separa el tejido, membranas, polisacáridos y proteínas de los ácidos nucleicos, los cuales quedan en el sobrenadante (Velasco, 2005). El alcohol isoamílico actúa como agente antioxidante, impidiendo o disminuyendo la formación de interfase durante la extracción de ADN (González *et al.*, 1995).

El cloroformo o el fenol desnaturalizan las proteínas y las separa del ADN (Rogers y Bendich, 1988). El fenol hidroliza las uniones peptídicas desnaturalizando las proteínas, purifica el ADN porque las proteínas tienen mayor afinidad por la fase fenólica que por la fase acuosa (González *et al.*, 1995). El cloroformo es un solvente que evita la precipitación de proteínas desnaturalizadas de tipo hidrofóbicas, remueve residuos orgánicos como clorofila e hidroxifenoles (González *et al.*, 1995), permite obtener ADN menos sensible a la degradación, y remueve el CTBA y fenol (González *et al.*, 1995; Valadez y Kahl, 2005).

El ADN en disolución es concentrado y purificado por precipitación con etanol o isopropanol, al reducir la constante dieléctrica del solvente. Posteriormente el ADN es resuspendido en tampón TE o agua. El etanol también permite precipitar el ADN, además de remover residuos de CTBA y sales (Rogers y Bendich, 1988; Saldaña y Salazar, 2007)

2.5.3.2 Polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP)

Los marcadores RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphisms”) detectan polimorfismo producido al digerir ADN con enzimas de restricción particulares (endonucleasas), empleando sondas específicas que hibriden una parte de los fragmentos de ADN obtenidos. El polimorfismo a nivel de dianas de restricción será observado como un polimorfismo en la longitud de los fragmentos detectados. No depende de la reacción PCR para detectar el polimorfismo, ni necesitan ser previamente secuenciados para usarse (García-Mas *et al.*, 2000).

Para la detección de los RFLP se debe aislar el ADN, purificarse y cortarse con una o más endonucleasa de restricción. Los fragmentos resultantes se separan mediante electroforesis en gel de agarosa y se transfieren a una membrana de nailon o nitrocelulosa (“Shouthern blotting”). La subsecuente hibridación con alguna sonda marcada (secuencia definida de ácido nucleico marcada) y detección con autorradiografía, luminografía o quimioluminiscencia hará visible un fragmento de ADN específico, que puede ser comparado con el fragmento resultante de otros genomas tratados de la misma forma (Valadez y Kahl, 2005).

Ravishankar *et al.* (2004) complementaron el uso de RFLP con ADN de cloroplastos y RAPD para clasificar cultivares poliembriónicos y monoembriónicos de la India. En el dendrograma que obtuvieron observaron que los cultivares se separan en dos grandes grupos, cultivares poli- y monoembriónicos, concluyen que tienen bases genéticas diferentes que fueron reconocidas por los RAPD y RFLP. Asimismo, sugieren que los cultivares poliembriónicos pudieron ser introducidos de otras partes del suroeste de Asia, ya que fueron diferentes de los originados en la India.

2.5.3.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR (“Polimerase Chain Reaction”) es una técnica comúnmente empleada en la biología molecular moderna, su principio base se desarrolló en la década de los 80’s. La PCR se conforma por tres fases de reacciones cíclicas: desnaturalización del ADN, primera alineación, y extensión con nucleótidos, resultando en un incremento exponencial de una secuencia de ADN blanco (Moody, 2007) (Figura 5). El proceso de PCR ha sido extensamente modificado y adaptado a diversas aplicaciones: amplificación cuantitativa de ARN y ADN, introducción de mutaciones específicas, mapeo del polimorfismo de genomas, identificación de mutaciones somáticas de baja frecuencia, discriminación de ADN metilado o no metilado, amplificación de genomas enteros, etc. (Moody, 2007).

La amplificación del ADN por PCR consta de tres pasos esenciales: la **desnaturalización**, paso en el que la molécula de doble hélice de ADN se separa en cadenas sencillas por temperatura (90 o 95 °C), que servirán como molde para la síntesis de los fragmentos respectivos; en la **alineación** la temperatura se reduce para permitir el reconocimiento de los iniciadores a las cadenas molde (la temperatura variará entre 25-65 °C dependiendo del contenido de C-G y longitud del iniciador); la **extensión** o **alargamiento** del iniciador por la ADN-polimerasa, generalmente entre 70 a 75 °C. La temperatura de los ciclos debe ser tolerada por la ADN-polimerasa. Los tres pasos se repiten en el termociclador para poder obtener de manera exponencial los fragmentos sintetizados a partir de la cadena molde del ADN (Valadez y Kahl, 2005). La eficiencia y especificidad de la reacción de amplificación variará con la temperatura y tiempo de incubación.

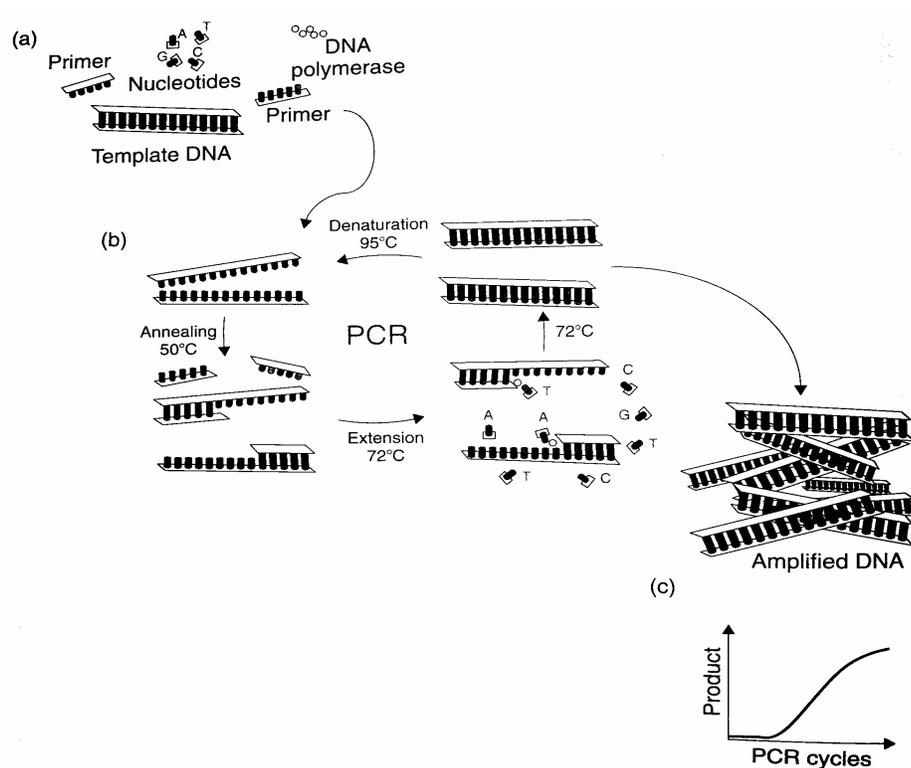


Figura 5. Representación esquemática de los componentes básicos de la PCR y etapas de la reacción. Los cinco componentes básicos de la PCR son combinados (a) y sometidos a tres reacciones cíclicas con fases térmicas: desnaturalización (separación de cadena de ADN), alineación (unión de los iniciadores para complementar la cadena), y extensión (adición de nucleótidos por la enzima polimerasa para complementar la cadena de ADN comenzada por el iniciador) (b), obteniendo un incremento exponencial de las secuencias de ADN blanco (c) (Moody, 2007).

La reacción de PCR tiene cinco componentes: iniciadores o “primer” (oligonucleótidos), ADN-polimerasa resistente a fluctuaciones de temperatura (*Taq* polimerasa), buffer de reacción (incluyendo $MgCl_2$), dNTPs, y ADN molde. La concentración y calidad de estos componentes afecta a la amplificación de los fragmentos de ADN:

- **Iniciadores:** Cada PCR tiene como punto de inicio un par de iniciadores con longitud entre 10 a 30 bases (Valadez y Kahl, 2005), que seguidos de la ADN-polimerasa permiten la incorporación de los dNTPs. Los iniciadores son direccionales y complementarios a la región a amplificar, y proveen la especificidad para la reacción (Innis y Gelfand, 1990). En la mayoría de las reacciones es suficiente emplear entre 0.1 a 1.0 μM de cada iniciador (concentración final de la reacción de 25 μM). Una baja concentración del iniciador

provoca lentitud en la reacción de amplificación, y una concentración alta favorece amplificaciones inespecíficas, así como la formación de dímeros entre los iniciadores (<1 μM de cada iniciador por 50 μM de reacción) (Innis y Gelfand, 1990; Moody, 2007).

- **ADN-polimerasa:** Estas enzimas catalizan la síntesis de largas cadenas de polinucleótidos al incorporar monómeros de dextrorribonucleótidos trifosfato. La elección de la enzima depende del objetivo de la investigación, y la concentración de la cantidad de ADN molde y de los iniciadores (Innis y Gelfand, 1990). La concentración comúnmente usada es entre 1 y 2.5 unidades por 100 μL de reacción (Valadez y Kahl, 2005), altas concentraciones de la enzima pueden causar baja especificidad en los productos de la PCR, y bajas concentraciones hacen que la reacción produzca poca amplificación (Innis y Gelfand, 1990).
- **Buffer de Reacción (Incluye al MgCl_2):** La función del buffer de reacción (10-75 mM Tris, 10-100 mM KCl o 10-30 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) es mantener constante el pH de la reacción, entre 8-9, para permitir la polimerización (Innis y Gelfand, 1990; Moody, 2007). El KCl del buffer facilita la alineación de los iniciadores. La concentración correcta de iones de magnesio (entre 0.5 y 2.5 mM) es esencial para la actividad de la enzima en la PCR; la concentración de magnesio puede afectar: la alineación de los iniciadores, la temperatura necesaria para disociar la cadena del ADN molde y de los productos de PCR, la especificidad de la reacción, la formación de dímeros a partir de los iniciadores, así como la fidelidad y actividad enzimática (Innis y Gelfand, 1990; Valadez y Kahl, 2005; Moody, 2007). La concentración de iones de magnesio no solo depende de la cantidad de MgCl_2 , sino también de iones de magnesio dentro de las moléculas de ADN, dNTPs, contaminantes en el ADN (proteína), etc., la presencia de residuos de EDTA o de otros relatos en la muestra de ADN molde, también puede interferir (Innis y Gelfand, 1990; Moody, 2007).
- **dNTPs:** Estos son dextrorribonucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) que proporcionan la energía y materia prima para la extensión de las moléculas amplificadas. Se debe adicionar a la mezcla de reacción cantidades equivalentes de cada dNTP para evitar incorporaciones erróneas; normalmente se emplean de 50 a 200 μM de dNTPs, pero si son altas las concentraciones promueven falsas incorporaciones por la ADN-polimerasa (Innis y Gelfand, 1990; Valadez y Kahl, 2005).

- **ADN molde:** Es el elemento cuya calidad, cantidad y pureza influye en mayor grado la reacción de PCR (Moody, 2007). El segmento de ADN amplificado a partir del molde, puede tener hasta 10 kb de longitud, aunque lo más típico y sencillo son amplificaciones de 100 a 1000 pb (Valadez y Kahl, 2005).

Para incrementar la reproducibilidad de la PCR se debe optimizar la metodología, ajustando la temperatura de alineación, la concentración del iniciador, la concentración de la polimerasa (Innis y Gelfand, 1990; Schnell *et al.*, 1995).

2.5.3.4 Amplificación inespecífica del polimorfismo de ADN (RAPD)

Los marcadores RAPD (“Random Amplified Polimorphisms DNA”) se obtienen mediante amplificación por PCR (“Polimerase Chain Reaction”) del ADN genómico usando un iniciador o cebador, normalmente de 10 nucleótidos de longitud. Con esta técnica se amplifica y duplica, de forma exponencial y aleatoria, el genoma de un individuo en aquellas zonas en las que los iniciadores hibridan con el ADN molde en ambas cadenas y en direcciones opuestas. La amplificación se producirá si los iniciadores están situados entre si a una distancia corta (200-2000 pb), entre el rango de tamaño amplificable por la *Taq* polimerasa (García-Mas *et al.*, 2000; Valadez y Kalh, 2005).

Las diferencias se visualizan en el polimorfismo de ADN (un RAPD), cuando un fragmento determinado que está presente en un individuo no está en otro (García-Mas *et al.*, 2000). El polimorfismo se debe a mutaciones puntuales, a inserciones o deleciones, lo que resulta en la presencia o ausencia de fragmentos amplificados o bandas; por lo que, los RAPD son marcadores tipo dominante. El número de fragmentos amplificados por cada iniciador depende de su secuencia, y será mayor cuanto mayor sea el tamaño del genoma de la especie estudiada (García-Mas *et al.*, 2000).

La especificad de la reacción de amplificación y productos que se amplifican se ven afectados por la temperatura y tiempo de cada etapa de la PCR, por la concentración del

iniciador, concentración y tipo de la polimerasa, cambio en los niveles de cloruro de magnesio, y concentración y pureza del ADN (Innis y Gelfand, 1990; Schnell *et al.*, 1995).

Schnell *et al.* (1995) pusieron a prueba la eficacia de los marcadores RAPD en la identificación de cultivares y validación de relaciones genéticas, al emplear 16 clones elegidos al azar y 9 clones con pedigree conocido. Indicaron que los RAPD fueron útiles para identificar y agrupar los cultivares; sin embargo, Schnell *et al.* tuvieron que ‘optimizar’ el proceso para la amplificación y la concentración de MgCl₂, iniciadores y ADN molde, así como asegurar la reproducibilidad de los resultados al realizar dos bloques de reacción para cada iniciador y una replica de cada electroforesis.

Aron *et al.* (1998) determinaron que la poliembriónía en mango es controlada por un gen dominante; llegaron a esta conclusión al obtener patrones de segregación empleando RAPD (251 iniciadores del kit de la A a M: Operon Technologies, Alameda, California) de individuos procedentes de la cruce de varios cultivares monoembriónicos y una línea poliembriónica. Reportan que todas la plantas originada de cultivares monoembriónicos fueron monoembriónicas, pero la segregación que obtuvieron a partir de líneas poliembriónicas fue de una plántula monoembriónica y tres poliembriónicas. De los iniciadores que evalúan, sólo 226 fueron informativos, pero ninguno de ellos estuvo relacionado con la mono y poliembriónía.

Torres-de los Santos *et al.* (2005) estudiaron la variación molecular entre los árboles que constituyen el Huerto Padre del cv. ‘Ataulfo’ (individuo “A”, “B”, “D”, “E”, “F”, “G” y “H”) en Chiapas, México, utilizando marcadores RAPD. El análisis demostró 95.7 % de similitud entre los individuos analizados. Los siete individuos se clasificaron en dos grupos: el grupo principal lo constituye el individuo “B” que es el más alejado genéticamente; el otro grupo muestra ramificaciones, donde un subgrupo lo conforma “D”, otro subgrupo es “A”, y el tercer subgrupo son “E”, “F”, “G” y “H”. Concluyó que dicha variación dentro del cv. Ataulfo se debió a la propagación por semillas originadas de polinización abierta.

Skroch y Nienhuis (1995) evaluaron la reproducibilidad de los marcadores RAPD en 10 variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) mediante la estimación de la distancia genética generada por 50 iniciadores. Encontraron que en promedio el error fue de 2 % en los datos obtenidos, y la reproducibilidad de las bandas fue de 76 % para las replicas efectuadas. Por lo que, la reproducibilidad de los RAPD depende de la uniformidad de las condiciones entre experimentos.

2.5.3.5 Amplificación de fragmentos de longitud polimórfica (AFLP)

Los AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphisms”) se basan en la combinación de los RFLP y la PCR, y consisten en la amplificación por PCR de fragmentos de ADN previamente digeridos por dos enzimas de restricción y ligados a dos adaptadores específicos de las enzimas utilizadas. Dos iniciadores complementarios a los adaptadores permiten la amplificación sin necesidad de un conocimiento previo de las secuencias del genoma a estudiar. Posteriormente, en la siguiente reacción sólo se amplifica un subconjunto de los fragmentos usando iniciadores a los que se ha añadido en el extremo 3’ una o más bases (selectivas) al azar (García-Mas *et al.*, 2000; Valadez y Kalh, 2005).

En estudios realizados por Yamanaka *et al.* (2006) en 35 individuos de *Mangifera* (8 cultivares y 3 criollos de *M. indica* L., 11 criollos de *M. odorata* Griff., 7 criollos de *M. foetida* Lour., y 6 criollos de *M. caesia* Jack.) con marcadores AFLP, obtuvieron con 8 combinaciones de iniciadores un total de 518 bandas, 499 (96.3%) de las cuales fueron polimórficas. Lo que indica el alto número de bandas polimórficas obtenidas con los AFLP. Mediante estudios de agrupamiento, pudieron concentrar los 35 individuos en los 4 grupos correspondientes a las 4 especies, así como revelar su relación genética. Concluyen que los marcadores AFLP son efectivos para realizar estudios taxonómicos.

El método de AFLP fue empleado por Kashkush *et al.* (2001) para identificar cultivares y construir un mapa genético de las relación de 16 cultivares de mango y 7 portainjertos. Con los AFLP detectaron elevado número de bandas reproducibles en poco tiempo y determinaron que el 85 % de las bandas polimórficas son transmitidos en forma mendeliana. Entre cultivares

y portainjertos se encontró en promedio 83 % y 80 % de bandas compartidas, lo que indicó parentesco.

2.5.3.6 Microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR)

A los microsatélites también se le llama como SSR (“Simple Sequence Repeats”) o STRs (“Short Tandem Repeats”), son secuencias cortas de ADN constituidas por motivos de 1 a 6 nucleótidos repetidos en tándem; son marcadores codominantes. Estas secuencias son abundantes, uniformes en la mayoría de los organismos eucariotes, y no se transcriben a ARN (García-Mas *et al.*, 2000).

El número de repeticiones es variable, y en general, el grado de polimorfismo aumenta con la longitud total del microsatélite (no sobrepasa las 0.1 kb). El diseño de iniciadores específicos para las secuencias únicas que rodean el motivo repetido, permite la amplificación por PCR de la región repetitiva y visualización de todos los alelos posibles para un *locus* microsatélite, debido a la frecuente variación en el número de repeticiones del motivo (García-Mas *et al.*, 2000; Valadez y Kahl, 2005).

Uno de los trabajos más extensos realizados con microsatélites en mango se llevó a cabo por Olano *et al.* (2005), quienes comprobaron el pedigree de los cultivares de Florida, descritos históricamente como híbridos de cultivares procedentes de la India y del sureste de Asia. Usaron 25 microsatélites para evaluar la relación y origen genético de 63 cultivares de Florida, así como de 129 cultivares procedentes de India, Asia y otras locaciones. Realizaron el análisis de parentesco con los microsatélites basándose en los reportes y datos previos. El pedigree resultante mostró que los cultivares de Florida son más cercanos a los de India, que a los del sureste de Asia, y que no son más diversos que sus progenitores. Concluyen que los cultivares floridianos son un grupo único, con la característica de poseer producción estable y capacidad de adaptación.

De igual manera, Duval *et al.* (2009) estudiaron la diversidad genética de 304 accesiones de India, sureste de Asia, Florida, África, Centro América y el Caribe. Del total de

accesiones, sólo se encontraron 207 genotipos que fueron diferentes, por lo que el resto de accesiones presentaron sinonimias, al ser nombrados de diferentes formas entre regiones o países. Los 207 genotipos fueron agrupados de acuerdo con su origen geográfico, pudiendo conocer también su posible distribución histórica.

Viruel *et al.* (2005) reportan la secuencia y parámetros de variabilidad de 16 pares de iniciadores de microsatélites que produjeron dos bibliotecas genómicas en mango. Posteriormente evaluaron el polimorfismo revelados por los microsatélites en 28 cultivares de diferente origen (incluyendo a los cvs. Manila y Ataulfo). Los autores obtuvieron 88 fragmentos, con promedio de 5.5 bandas por SSR. Los cultivares estudiados fueron identificados y agrupados de acuerdo a su origen y a su clasificación como poli- o monoembrionicos, permitiendo revelar su pedigree y el movimiento geográfico que ha tenido el germoplasma de mango. Viruel *et al.* (2005) encontraron fragmentos exclusivos de ‘Ataulfo’, cuatro específicos de cultivares filipinos, uno exclusivo de ‘Ataulfo’ y ‘Manila’, dos exclusivos de ‘Manila’ y ‘Carabao’, y uno presente en ‘Ataulfo’, ‘Manila’ y ‘Carabao’, lo que mostró entre estos tres cultivares similaridad de hasta el 60 %. Santos *et al.* (2008) llegaron a resultados similares, pero con los AFLP obtuvieron más información por tratarse de un marcador que muestra más polimorfismo, y concluyen que el porcentaje de similitud entre los cvs. Ataulfo, Manila y Carabao fue de 68 %.

2.5.3.7 Inter-secuencias simples repetidas (ISSR)

Los ISSR (“Inter-Simple Sequence Repeats”) o SPAR (“Single Primer Amplification Reaction”) se basan en la amplificación por PCR de las regiones de ADN contenidas entre dos microsatélites, empleando un iniciador de aproximadamente 20 bases que contienen las repeticiones de di-, tri- y tetranucleótidos habitualmente presentes en los microsatélites. El iniciador amplifica varios fragmentos de ADN al mismo tiempo, siempre las repeticiones se encuentren a una distancia adecuada para la *Taq* polimerasa (García-Mas *et al.*, 2000). Este marcador es de naturaleza dominante.

En 70 cultivares de mango de la India, Pandit *et al.* (2007) utilizó 33 ISSR para el análisis genético. Con este marcador no pudieron separar los cultivares del norte y del sur de la India, ni pudieron clasificar en su totalidad los cultivares poliembriónicos de los monoembriónicos. No obstante, obtuvieron 420 bandas siendo 408 polimórficas (97.14 %), así como 12 bandas diferentes y específicas de 6 cultivares, lo cual determinó la efectividad de los ISSR para el análisis de diversidad genética.

2.5.3.8 Comparación entre tipos de marcadores: Criterios de elección

Existen diversos marcadores, sin haber por ahora un marcador superior a los demás en todos los aspectos (García-Mas *et al.*, 2000). La eficacia del marcador en los resultados obtenidos depende de sus características (polimorfismo, número, expresión dominante o codominante), su costo, rapidez de la metodología, el nivel de conocimiento y familiaridad, la infraestructura requerida y presupuesto de funcionamiento, y sobretodo del objetivo de la investigación. En el Cuadro 2 se describen brevemente las ventajas, desventajas y los principales usos de algunos de los marcadores moleculares.

La selección de la técnica depende del objetivo de la investigación y de la disponibilidad de los recursos necesarios para ejecutar un sistema de marcadores moleculares (Velasco, 2005). Entre los factores más importantes a considerar están el contenido de información, número de alelos que pueden ser detectados por el marcador en un grupo de individuos, radio múltiple, y número de marcadores que pueden ser generados en una simple reacción (Cornide M.T., 2000, citado por Velasco, 2005).

Entre las investigaciones que comparan la aplicación de marcadores, Capote *et al.* (2003) evaluó las isoenzimas, AFLP y ISTRs ('Inverse Sequence-Tagged Repeat') para estimar el nivel de polimorfismo, su capacidad de discriminación (probabilidad de que dos individuos escogidos al azar presentes patrones de bandas diferentes) y la información obtenida de 30 genotipos de mango. Con los AFLP e ISTR obtuvieron el mayor polimorfismo y los valores más altos de discriminación, y de los tres sistemas enzimáticos evaluados el que mostró mayor polimorfismo fue la Anhidrasa carbónica.

Cuadro 2. Ventajas y desventajas de los diferentes marcadores moleculares.

Marcadores	Ventajas	Desventajas	Aplicaciones principales
RFLP	Es codominante, genera resultados claros, determina completa e inequívocamente el genotipo.	Técnica muy laboriosa, requiere de grandes cantidades de ADN de buena calidad, su información es limitada, y es una técnica costosa. Emplea marcadores radioactivos [³² P]	Construcción de mapas, análisis de caracteres cuantitativos, comparación de mapas
RAPD	Abundantes en el genoma, obtención de gran número de bandas polimórficas, costo de funcionamiento e infraestructura relativamente bajo, simplicidad de la técnica. No se requiere mucho ADN y no necesita ser muy puro.	Poco indicados para la construcción de mapas (al ser dominantes) y construcción de pedigríes. Presentan poca reproducibilidad entre laboratorios.	Estudios de variabilidad, búsqueda de marcadores estrechamente ligados a genes o su clonaje posicional.
AFLP	Es dominante, detecta elevado número de bandas polimórficas en un gran número de <i>loci</i> . Tienen mayor reproducibilidad que los RAPD.	Su metodología es complicada. Los AFLP tienen patentado el método. Necesita ADN de alta pureza.	Estudios de variabilidad, búsqueda de marcadores estrechamente ligados a genes o su clonaje posicional, construcción de mapas.
ISSR	Obtención de gran número de bandas polimórficas, costo de funcionamiento e infraestructura relativamente bajo, simplicidad de la técnica. Tienen mayor reproducibilidad que los RAPD.	Poco indicados para la construcción de mapas (al ser dominantes) y construcción de pedigríes.	Estudios de variabilidad, búsqueda de marcadores estrechamente ligados a genes o su clonaje posicional, validación de parentescos, caracterización de portainjertos.
Microsatélites o SSR	Se localizan en todo el genoma, son codominantes, altamente polimórficos, altamente reproducibles, requieren poco ADN, son sencillos de analizar.	Se necesita el paso previo de identificar y desarrollar los marcadores o microsatélites.	Útiles en la transferencia de marcadores de unas poblaciones a otras, indicados en especies poco polimórficas, en identificación de cultivares, análisis genealógico, en programas de mejoramiento genético.

Fuente: García-Mas *et al.* (2000); Valadez y Kahl (2005); Azofeifa-Delgado (2006); Krishna y Singh (2007); Vasanthaiah *et al.* (2007).

En nueve accesiones de *Anacardium occidentale* L. (Anacardiaceae), Archak *et al.* (2003) compararon las técnicas de RAPD, ISSR y AFLP para detectar variación genética. Los resultados indicaron que los AFLP exhiben la máxima eficiencia en discriminación y un índice marcador (estimado con el promedio de bandas informativas) 10 veces mayor que los RAPD y ISSR. No obstante, todos los marcadores pudieron diferenciar las accesiones.

En los trabajos realizados por Ravishankar *et al.* (2004) y Viruel *et al.* (2005) en mango, los RAPD y microsatélites pudieron separar a los cultivares monoembriónicos y poliembriónicos en su totalidad; mientras que, en las investigaciones de Eiadthong *et al.* (1999) y Pandit *et al.* (2007) los marcadores AFLP o ISSR no pudieron separar todos los cultivares. En general, los RAPD son los más empleados en los estudios para determinar relaciones genéticas y variabilidad en frutales tropicales (Azofeifa-Delgado, 2006).

2.5.4 Identificación de plántulas cigóticas y nucelares en mango

Como los cultivares poliembriónicos de mango tienen un embrión cigótico y varios embriones nucelares (Eiadthong *et al.*, 1999; Viruel *et al.*, 2005; Cordeiro *et al.*, 2006), es difícil lograr identificarlos en la semilla madura porque no poseen alguna característica específica. Posiblemente la única forma de hacerlo de forma directa, es en estadios tempranos del desarrollo del óvulo, cuando el embrión cigótico está en el micrópilo antes de que proliferen los embriones nucelares (Esen y Soost, 1977; Wakana y Eumoto, 1987). Pero no es posible darle seguimiento al crecimiento del embrión cigótico y determinar a que plántula dio origen.

Los viveristas buscan obtener plántulas nucelares para la propagación de portainjertos, ya que las cigóticas presentan desarrollo impredecible (Degani *et al.*, 1993). Tradicionalmente, los viveristas seleccionan la plántula más vigorosa entre todas las plántulas que emergen de la semilla poliembriónica, al suponer que son de origen nucelar (Galán, 1999). Sin embargo, Cordeiro *et al.* (2006) emplearon RAPD para identificar el origen genético de plántulas del cv. Rosinha seleccionadas por el método tradicional de elegir a la más vigorosa, encontraron que hasta 90 % de las plántulas eran cigóticas. Por lo que, esta

forma de selección no es segura para propagar plantas nucelares o clones que proporcionen homogeneidad en las plantaciones comerciales de mango.

En el mejoramiento genético es indispensable identificar las plántulas de origen híbrido en etapas tempranas, porque se ahorraría tiempo y reducirían costos (Oliveira *et al.*, 2002; Villegas y Andrade, 2008). Por lo tanto, lo ideal sería ubicar los embriones nucelares o el cigótico en la semilla madura de mango, ya que no todas las plántulas que emerjan pueden identificarse morfológicamente en esta etapa (Degani *et al.*, 1993) y para diferenciarlas con certeza se necesitaría esperar varios años hasta que llegaran al estado adulto (Azofeifa-Delgado, 2006). Además, los marcadores morfológicos están influenciados por condiciones ambientales, son limitados (Viruel *et al.*, 2005) y pocas especies los expresan en etapas tempranas, como en *Brassica* o maíz (Vázquez, *et al.*, 2000).

Recientemente se ha empleado en la identificación de plántulas cigóticas y nucelares marcadores moleculares, no sólo en mango, sino también en otros frutales (Viruel *et al.*, 2005). Entre los primeros trabajos en *Mangifera* está el de Schnell y Knight (1992), quienes emplearon cinco sistemas de enzimas (IDH, LAP, GPI, PGM, TPI) para identificar el origen de plántulas (seleccionadas por tener mayor vigor) en cinco portainjertos de mango. Detectaron 64 % de plántulas cigóticas en ‘Golek’, 36 % en ‘Madoe’, 24 % en ‘Turpentine’, 4 % en ‘Sabre’ y ninguna en ‘13-1’, así como diferencia significativa entre cultivares ($\chi^2 = 35.53$, $P < 0.01$) para los porcentajes de plántulas cigóticas y nucelares identificadas.

Degani *et al.* (1993) también emplearon isoenzimas (IDH, GPI, PGM, TPI) para detectar plántulas cigóticas en los portainjertos de mango Turpentine y 13-1, obtenidos de polinización abierta, y en el descendiente de la cruce de ‘Turpentine x 13-1’. Encontraron 22, 20 y 13 % de plántulas cigóticas en ‘Turpentine’, ‘13-1’ y en su híbrido, respectivamente. De las plántulas emergidas de los embriones cigóticos de ‘13-1’ y de ‘Turpentine’, hallaron que el 37 % y el 5.3 % procedía de la cruce con un progenitor externo y no de la autopolinización.

No todos los embriones son capaces de germinar en condiciones de semillero (Pio *et al.*, 1984, citado por Andrade-Rodríguez *et al.*, 2004), por lo tanto, para permitir la germinación

de la totalidad de embriones se debe recurrir al cultivo *in vitro*, ya que puede proporcionar las condiciones para sobrevivir y permitir incrementar el porcentaje de embriones cigóticos y nucelares identificado (Bastianel *et al.*, 1998; Soares-Filho *et al.*, 2002; Andrade-Rodríguez *et al.*, 2005). Andrade-Rodríguez (2002) identificaron mediante RAPD embriones separados y cultivados *in vitro* de 25 semillas poliembriónicas y 6 monoembriónicas de *Citrus reshni*, de 25 semillas poliembriónicas y 8 monoembriónicas de *Citrus volkameriana*, y de 11 semillas monoembriónicas de Robinson (*C. clementina* x Tangelo Orlando). El cultivo *in vitro* de los embriones, les permitió determinar en *C. reshni* y *C. volkameriana* el origen sexual en 16.6 % y 25.9 % de plántulas de semillas poliembriónicas, y el 83.3 % y 87.5 % de plántulas de semillas monoembriónicas; mientras que, en Robinson comprobaron que todas fueron cigóticas.

Sólo la investigación de Cordeiro *et al.* (2006) ha relacionado el origen cigótico con la ubicación de los embriones en la semilla de mango, numerando al posible embrión cigótico como '1' y ubicándolo cerca del lado basal (lado convexo) de la semilla (tomaron como referencia lo indicado por Sachar y Chopra, 1957), el resto de los embriones los numeraron de acuerdo a su cercanía. Sus resultados muestran que no siempre el embrión cigótico se encuentra en la posición '1' (donde debiera estar el micrópilo). En cítricos destaca el trabajo de Andrade-Rodríguez *et al.* (2005) para ubicar al embrión cigótico, estos autores numeraron a los embriones en sentido opuesto al de las manecillas del reloj, por tamaño, y con referencia a la cercanía con el micrópilo de la semilla (detectable en las semillas de cítricos); concluyen que en *Citrus reshni* las plántulas cigóticas se producían siempre por los embriones pequeños localizados cerca o en el extremo micropilar, mientras que en *C. volkameriana*, dichos embriones no siempre fueron los cigóticos. Ribeiro *et al.* (1999) también estudiaron el comportamiento de los embriones cigóticos y nucelares en cítricos, en los híbridos de *C. sinensis* Osb. y *Poncirus trifoliata* (L.) determinaron que la mayoría de los embriones cigóticos se localizaban próximos a la región micropilar (el resto estaban hacia el interior de la semilla) y en estadios globular y codiforme.

Los criterios de posición y de tamaño del embrión son considerados en este trabajo, ya que podría otorgar conocimiento práctico y de disponibilidad para identificar los dos tipos de

embriones directamente en la semilla, permitiendo aplicar métodos de selección más económicos (Villegas y Andrade, 2008).

De los marcadores moleculares empleados, los RAPD (Random Amplified Polymorphics DNA) tienen la ventaja de no necesitar información genética previa para aplicarlos y ser una técnica práctica que ha sido efectiva en la identificación de plántulas cigóticas en mango (Cordeiro *et al.*, 2006), y en cítricos (Nageswara *et al.*, 2007). Por tal motivo, se eligió como la técnica para identificar el origen cigótico y nucelar de las plántulas de mango.

Para poder identificar todas las plántulas que se originen de una semilla poliembriónica, es necesario que germinen todos los embriones. Para lograr lo anterior, el cultivo *in vitro* (Andrade-Rodríguez *et al.*, 2005) es una técnica que permite el desarrollo y sobrevivencia de los embriones.

2.6 Resumen de la Revisión de Literatura

En general, los cultivares de mango se clasifican considerando el número de embriones presentes en la semilla, dividiéndose en monoembriónicos, de origen Hindú, y en poliembriónicos, originarios de Indochina, Tailandia, Malasia, Indonesia y Filipinas (Eiadthong *et al.*, 1999; Vázquez *et al.*, 2006). Dentro del último grupo se encuentran los cvs. Manila y Ataulfo, que son los principales cultivares poliembriónicos en México (Galán, 1999; Ángel y Rebolledo, 2008). Los frutos de ‘Manila’ y los de ‘Ataulfo’ son ampliamente aceptados en el mercado nacional; además, por las características de su fruto, ‘Ataulfo’ muestra potencial para la exportación (Ángel y Rebolledo, 2008; SIAP, 2008).

La apomixis está representada en las siguientes especies de importancia agrícola: *Citrus*, *Euphorbia*, *Mangifera*, *Malus*, *Ribes*, *Beta*, y en forrajes tropicales como *Panicum*, *Brachiaria*, *Dichanthium*, y *Pennisetum*. (Singh, 2003; Bicknella y Koltunow, 2004). Se divide en dos procesos: apomixis gametofítica y embrionía adventicia (Crane, 2001; Grossniklaus *et al.*, 2001). Un caso de embrionía adventicia es la poliembrionía asexual

(Crane, 2001; Grossniklaus *et al.*, 2001), proceso en el que se desarrollan más de dos embriones de una semilla (Dhillon *et al.*, 1993), un embrión cigótico y dos o más embriones somáticos formados a partir del tejido ovular externo al saco embrionario (Dhillon *et al.*, 1993).

Las semillas poliembriónicas de mango presentan por semilla un embrión sexual y varios embriones somáticos (Eiadthong *et al.*, 1999; Viruel *et al.*, 2005; Cordeiro *et al.*, 2006). Los embriones somáticos se originan de células de la nucela que rodean el saco embrionario (Sturrock, 1967), mediante mitosis repetida y ausencia de meiosis (Koltunow, 1993). Por lo tanto los embriones nucelares contienen toda la constitución genética de la planta madre (Sturrock, 1967; Koltunow, 1993).

El grado de poliembriónía y número de embriones por semilla varía entre cultivares, debido a que, aún cuando es controlada genéticamente por un *locus* dominante (Aron *et al.*, 1998; Singh, 2003) es afectada por factores ambientales o externos a la planta (Aron *et al.*, 1998; García *et al.*, 1999; Singh, 2003) como: agentes que afecten la polinización, fotoperiodo, temperatura, sales inorgánicas y nivel nutrimental (García *et al.*, 1999; Schnell y Knight, 1992; Kulonow, 1993; Andrade-Rodríguez *et al.*, 2005).

Comúnmente se relaciona la poliembriónía con bajo vigor de las plántulas procedentes de los embriones pequeños, ya que al incrementar el número de embriones disminuye su tamaño y aumenta la competencia (Andrade-Rodríguez *et al.*, 2004; Mo *et al.*, 2005; Darlan *et al.*, 2006). Además, al germinar semillas poliembriónicas se debe considerar que habrá variación en el tiempo de germinación y en el desarrollo entre las distintas plántulas (Arndt, 1935).

Entre los frutales destaca la ocurrencia de poliembriónía en el kiwi, mango, durazno, almendro y cítricos (Martínez-Gómez *et al.*, 2004), de estas especies, los cítricos son los que poseen la mayoría de los estudios sobre embriogénesis y poliembriónía, con más de 63 investigaciones (Bacchi *et al.*, 1943; Esen y Soost, 1977; Bastianel *et al.*, 1998; Domínguez *et al.*, 1998; Wakana y Eumoto, 1987; García *et al.*, 1999; Ribeiro *et al.*, 1999; Koltunow *et al.*,

2001; Darlan *et al.*, 2006; Sampaio *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2006; Soares-Filho *et al.* 2002). Por lo que, se considera al género *Citrus* como modelo de embriogénesis nucelar (Koltunow, 1993) y de poliembrionía para otros frutales. Mientras que en mango se encontraron 10 trabajos al respecto: Wester (1912) citado por Thongplave *et al.* (1983), Arndt (1935), Juliano (1937) citado por Wakana y Eumoto (1987), Kennard (1955), Sachar y Chopra (1957) citado por Cordeiro *et al.* (2006), Sturrock (1967), Prasad y Prasad (1972), Thongplave *et al.*, (1983), Parisot (1988) y Mo *et al.* (2005).

Las especies poliembriónicas muestran las ventajas de las plantas apomícticas (Goldenberg y Shepherd, 1998, citado por Costa *et al.*, 2004), al poseer mayor capacidad para colonizar ambientes inhóspitos y presentar distribución más amplia que las especies no apomícticas. Por otra parte, los propagadores al emplear plantas nucleares obtienen las ventajas de: asegurar menor variabilidad (Galán, 1999), rejuvenecer clones viejos que han perdido el vigor por la propagación vegetativa constante (Koltunow *et al.*, 2001; Villegas y Andrade, 2008), y obtener plantas libres de virus, viroides, fitoplasmas y bacterias que pueden ser de utilidad en la planeación de programas de saneamiento y certificación (Bicknella y Koltunow, 2004; Villegas y Andrade, 2008). Asimismo, las plantas que muestran altos grados de poliembrionía pueden reproducirse vegetativamente a partir de semilla (Villegas y Andrade, 2008).

La importancia de identificar a los embriones nucleares y a el cigótico, es la posibilidad de implementar programas de mejoramiento genético al poder elegir en etapas tempranas el híbrido resultado de la cruce (Domíngues *et al.*, 1998; Andrade-Rodríguez *et al.*, 2005; Villegas y Andrade, 2008), además de permitir la selección a los embriones nucleares para la propagación de portainjertos e injertos sin enfermedades. La técnica para poder identificar de forma más precisa el origen de las plántulas, son los marcadores genéticos. En mango sólo se han reportado cinco trabajos: con isoenzimas, Gazit y Knight (1989), Schnell y Knight (1992), Degani *et al.* (1993), y Mo *et al.*, 2005, y con marcadores RAPD, Cordeiro *et al.* (2005). Estas investigaciones son escasas si se comparan con lo realizado en el género *Citrus*, con más de 48 trabajos para identificar el origen cigótico o nucelar de los embriones mediante marcadores genéticos (Xiang y Roose, 1988; Bastianel *et al.*, 1998; Domíngues *et al.*, 1998; García *et al.*,

1999; Ribeiro *et al.*, 1999; Ruíz *et al.*, 2000; Cristofani *et al.*, 2001; Soares-Filho *et al.* 2002; Andrade-Rodríguez *et al.*, 2005; Nageswara *et al.*, 2007).

A pesar de los estudios realizados con marcadores moleculares en mango, sólo Cordeiro *et al.* (2006) relacionaron el origen genético con la ubicación de los embriones, pero no establecieron la posible relación con el tamaño. Ambos criterios son importantes, ya que pueden otorgar conocimiento práctico y disponible para identificar los dos tipos de embriones en la semilla, permitiendo aplicar métodos de selección económicos (Villegas y Andrade, 2008).

De los marcadores moleculares empleados, los RAPD (Random Amplified Polymorphics DNA) tienen la ventaja de no necesitar información genética previa para aplicarlos y ser una técnica práctica que ha sido efectiva en la identificación de plántulas cigóticas en mango (Cordeiro *et al.*, 2006), y en cítricos (Nageswara *et al.*, 2007). Por tal motivo, se eligió como la técnica para identificar el origen cigótico y nucelar de las plántulas de mango.

Para poder identificar todas las plántulas que se originen de una semilla poliembriónica, es necesario que germinen todos los embriones. Para lograr lo anterior, el cultivo *in vitro* (Andrade-Rodríguez *et al.*, 2005) es una técnica que permite el desarrollo y sobrevivencia de los embriones.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización del sitio experimental

La investigación se efectuó durante mayo de 2007 a mayo de 2010. Los estudios de poliembrionía y desarrollo de embriones se realizaron en el Laboratorio de Cultivo *in vitro*, Transformación Genética y Genética Molecular, Postgrado de Recursos Genéticos y Productividad, Fruticultura, *Campus* Montecillo, edo. de México, y en el invernadero del mismo programa. El análisis para diferenciar el origen de embriones mediante marcadores RAPD, se llevo a cabo en el Laboratorio no.2 del Centro de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

El experimento se dividió en cinco fases: ‘Características morfológicas de frutos, semillas y embriones’, ‘Poliembrionía’, ‘Cultivo de embriones *in vitro*’, ‘Cultivo de semillas en invernadero’ e ‘Identificación de plántulas cigóticas y nucelares mediante RAPD’.

3.2 Material vegetal

En el Mpio. Santiago Ixcuintla, Nayarit, México se recolectaron frutos elegidos al azar de un mismo árbol (planta madre) del cv. Manila y del cv. Ataulfo. Los frutos fueron cosechados en madurez fisiológica y fueron producto de polinización abierta. Para las primeras fases del experimento, se recolectaron 100 frutos de cada cultivar en mayo de 2008 y 100 frutos en junio de 2008. Para la última fase se recolectaron 20 frutos de cada cultivar en mayo de 2009.

3.3 Características morfológicas de frutos, semillas y embriones

Se tomo como referencia los ‘Descriptores para caracterización’ del IPGRI (2006) al detallar características del fruto, semillas con endocarpo y semilla de los cvs. Manila y Ataulfo; dichos descriptores son altamente heredables, fácilmente visibles, y se expresan por igual en todos los ambientes.

3.3.1. Características morfológicas de frutos

En esta fase se toman 20 frutos de cada cultivar por cada fecha de colecta (40 frutos), se numeraron y se evaluaron los siguientes parámetros (IPGRI, 2006): 1) Peso (g); 2) Largo (cm), la longitud se midió desde la base correspondiente al pedúnculo hasta el extremo opuesto; 3) Ancho (cm), se midió desde la parte más ancha incluyendo el lado convexo o abultado.

3.3.2. Características morfológicas de semillas con endocarpo

Después de eliminar el mesocarpo de los frutos, se cuantificó en las semillas con endocarpo (IPGRI, 2006): 1) Peso de materia fresca (g) (**PMF**); 2) Peso de materia seca (g) (**PMS**); 3) Largo (cm), la longitud se midió desde la base orientada al pedúnculo hasta el extremo opuesto; 4) Ancho (cm), se midió desde la parte más ancha abarcando el lado convexo.

Con la finalidad de cuantificar la pérdida de agua, de 100 semillas con endocarpo se tomó peso de materia fresca (**PMF**) y peso de materia seca (**PMS**). Para secar las semillas, se colocaron durante 48 horas a temperatura ambiente en un estante de metal que permitió la circulación de aire (Figura.6).

Se calculó el porcentaje de pérdida de agua con la siguiente fórmula:
$$\frac{(PMF - PMS) \times 100}{PMF}$$



Figura 6. Secado de semillas con endocarpo de mango cvs. Manila y Ataulfo.

3.3.3. Características morfológicas de semillas

Con tijeras de podar se abrió cuidadosamente el endocarpo por la parte ‘abultada’ o convexa, extrayendo la semilla (embriones envueltos por la cubierta seminal). De las semillas (Figura 7) se evaluaron (IPGRI, 2006): 1) Peso (g); 2) Largo (cm), la longitud se midió desde la base orientada al pedúnculo hasta el extremo opuesto; 3) Ancho (cm), se midió desde la parte más ancha incluyendo el lado convexo.

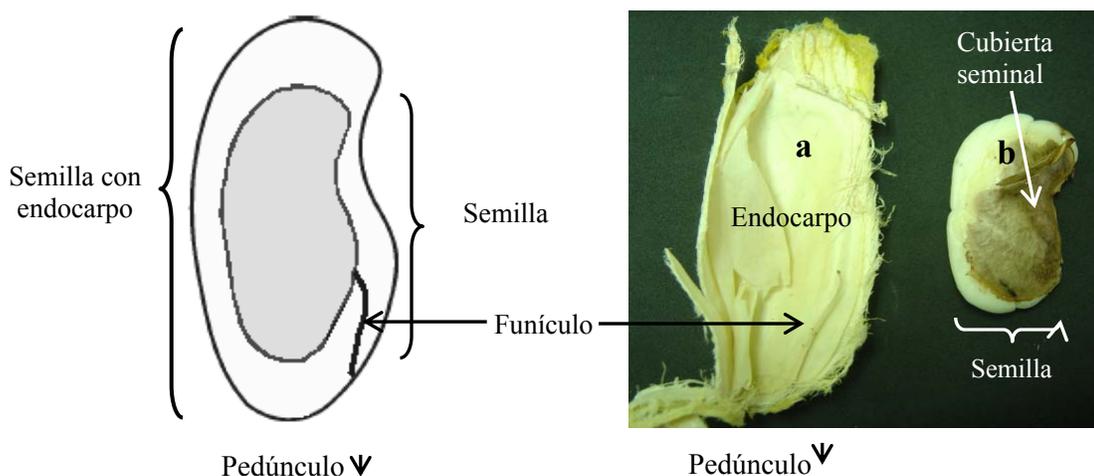


Figura 7. Semilla con endocarpo y sin endocarpo de mango cv. Manila. En la imagen de la derecha se observa: a) El endocarpo y funículo; b) La semilla con los embriones envueltos por la cubierta seminal.

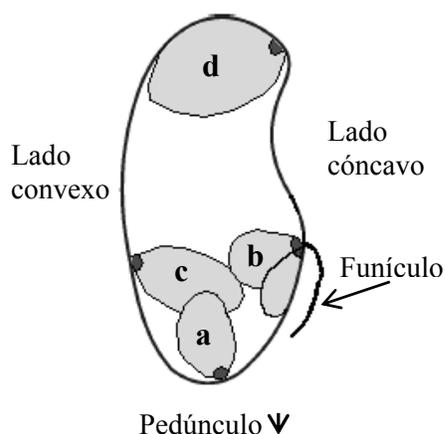


Figura 8. Orientación de embriones en las semillas poliembriónicas de mango: a) OEP; b) OEF; c) OEoF; d) OEd.

Se retiró la cubierta seminal de cada semilla con pinza y navaja para poder evaluar: 1) Número de embriones por semilla (**NES**), se contó el total de embriones en cada semilla; 2) Orientación de embriones en la semilla, se cuantificó si la mayoría de radículas se orientan hacia el pedúnculo (**OEP**), funículo (**OEF**), lado opuesto del funículo (**OEoF**) o con orientación diferente (**OEd**) (Figura 8); 3) Localización de embriones en la semilla, se determinó si la mayoría de los embriones se ubicaban hacia el pedúnculo (**LEP**), funículo (**LEF**),

lado opuesto del funículo (**LEoF**) o localización diferente (**LEd**).

Se numeraron los embriones: el embrión donde se insertó el funículo se denominó como embrión '1' (Figura 9 a), y el resto de los embriones se numeraron de acuerdo a su cercanía considerando el sentido de las manecillas del reloj. Del embrión '1' se evaluó la presencia o ausencia de protuberancia (Figura 9 b).

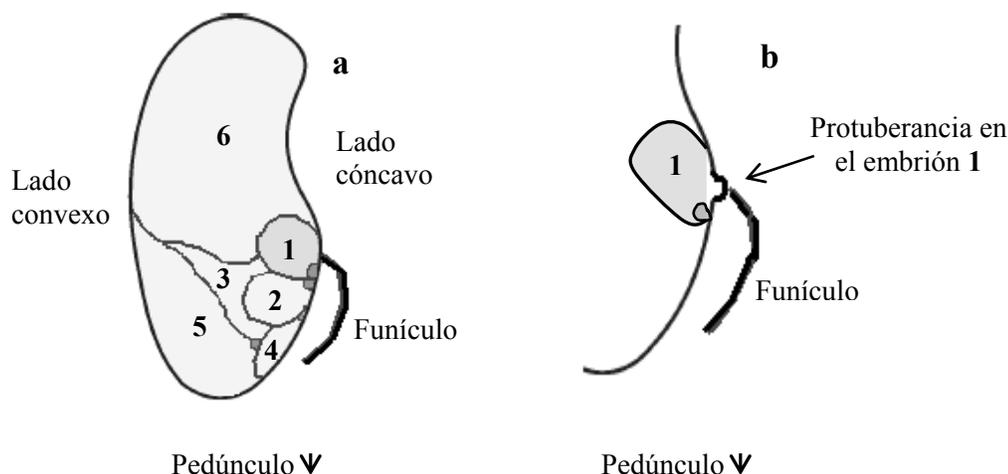


Figura 9. Embriones numerados con referencia al embrión '1' (a), y presencia de protuberancia donde se inserta el funículo (b), en semillas poliembrionadas de mango.

Con el peso del fruto, peso de materia fresca de semilla con endocarpo (**PMF**) y peso de semilla de los 40 ejemplares de cada cultivar, se determinó el espacio ocupado de 'semilla con endocarpo en fruto', y 'semilla en fruto'.

3.3.4. Características morfológicas de embriones

Los embriones de las 40 semillas de cada cultivar se separaron cuidadosamente con ayuda de pinzas y bisturí. Posteriormente en cada uno se evaluó: 1) Peso (mg); 2) Largo (mm), la longitud se midió desde la punta de la radícula hasta la punta del cotiledón más largo; 3) Ancho (mm), se midió la parte más ancha que incluyera los dos cotiledones. Con el peso de cada embrión se calculó el espacio que ocupa en la semilla cada embrión de acuerdo a su posición.

El eje embrionario y los cotiledones se aislaron, registrando en los ejes embrionarios: 1) Peso (mg); 2) Largo (mm), la longitud se midió antes de separarlos de los cotiledones, abarcando del epicótilo a la radícula; 3) Ancho (mm), se midió el hipocótilo. En cada cotiledón se midió: 4) Peso (mg); 5) Largo (mm), la longitud se midió desde donde se insertaba el eje embrionario hasta el extremo opuesto; 6) Ancho (mm), se midió la región más ancha del cotiledón. Los cotiledones se dividieron de acuerdo a su peso, siendo el cotiledón ‘1’ el de mayor peso, y el cotiledón ‘2’ el de menor peso.

El peso de frutos, semillas con endocarpo y semilla se cuantificó utilizando la balanza granataria (ADVENTURER™ Ohaus); y el de cada embrión, cotiledón y eje embrionario, se pesó con balanza analítica (SARTORIUS). Las mediciones de largo y ancho se realizaron con vernier eléctrico (TRUPER model caldi-6mp).

3.3.5. Análisis de variables

Se aplicó el diseño experimental completamente al azar donde los tratamientos fueron los cvs. Manila y Ataulfo, se comparó las medias de variables de características morfológicas de frutos, semillas con endocarpo, y semillas; así como del porcentaje de peso de semilla con endocarpo en fruto y peso de semilla en fruto.

Teniendo como tratamientos los cvs. Manila y Ataulfo y la posición de los embriones (1, 2, 3, y 4), se utilizó un diseño experimental completamente al azar con arreglo bifactorial para analizar las características morfológicas de cada embrión. En el tratamiento posición de los embriones, sólo se analizaron los embriones ‘1’, ‘2’ y ‘3’ para las variables características de eje embrionario y de cotiledones, ya que de los embriones ‘4’, ‘5’, ‘6’ y ‘7’ no se tenían suficientes repeticiones para su comparación.

Se realizaron correlaciones entre características morfológicas de frutos, semillas con endocarpo y semillas, así como entre las características de cada embrión.

Los datos fueron analizados con el paquete estadístico SAS 9.0 (2002) mediante análisis de varianza, prueba de comparación de media de Tukey ($p \leq 0.05$) y correlación de variables. Para el análisis estadístico las variables expresadas en porcentajes se sometieron a transformación de arcoseno o angular, normalizando los datos.

3.4 Poliembrionía

De las semillas extraídas de 100 frutos del cv. Manila y 100 del cv. Ataulfo, se obtuvo el porcentaje de semillas monoembrionicas y porcentaje de semillas poliembrionicas (**P**), el número promedio de embriones por semilla (**NES**) y porcentaje de semillas con 1, 2, 3...n embriones.

3.4.1. Análisis de variables

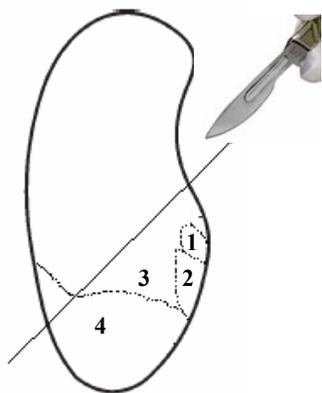
El diseño experimental fue completamente al azar, donde los tratamientos fueron los cvs. Manila y Ataulfo para comparar el número promedio de embriones por semilla (**NES**). Se correlacionaron características morfológicas de frutos, semillas con endocarpo y semillas, con número de embriones; así como, características de cada embrión con número de embriones.

Los datos fueron analizados con el paquete estadístico SAS 9.0 (2002) mediante análisis de varianza, prueba de comparación de media de Tukey ($p \leq 0.05$) y correlación de variables. Para el análisis estadístico, las variables expresadas en porcentajes se sometieron a transformación de arcoseno o angular, normalizando los datos.

3.5 Cultivo de embriones *in vitro*

De 80 frutos de cada cultivar se extrajeron las semillas con endocarpo y secaron por 48 h. Sin retirar el endocarpo, las semillas se desinfectaron en solución 2.6 % de hipoclorito de sodio agitando por 5 min, se enjuagaron tres veces en agua destilada estéril en condiciones asépticas dentro de la campana de flujo laminar, y se mantuvieron en solución de cisteína (50 mg L^{-1}) durante 2 minutos para reducir o evitar oxidación. El endocarpo se retiró con pinzas y

bisturí estériles, colocando la semilla (embriones con cubierta seminal) sobre toallas de papel (Sanitas[®]) estériles para eliminar el exceso de humedad. Antes de sembrar, la cubierta seminal se retiró.



Pedúnculo ▼

Figura 10. Corte transversal en la semilla poliembriónica de mango. Los embriones aparecen numerados.

Con la información obtenida en el apartado 3.3.3 Características morfología de semilla, se determinó que la disección debía ser diagonal, para desechar la mitad superior que corresponde generalmente a cotiledones de embriones mayores (Figura 10). Se observó que el explante a sembrar conservara todos los ejes embrionarios, y se inspeccionó que la parte retirada no tuviera algún embrión, de lo contrario se disectó el embrión. Los explantes se sembraron dirigiendo los ejes embrionarios hacia el medio de cultivo. Los embriones se numeraron con referencia al embrión '1', localizado en la inserción de funículo (Figura 9 a). Se midió el tamaño de los embriones (sin ser separados), y se clasificaron en: grande (>3 cm), mediano (3-1 cm) o chico (<1 cm), para determinar su influencia en la germinación.

En la germinación de embriones se utilizó como medio de cultivo 20 g L^{-1} sacarosa, 6 g L^{-1} agar-Plant y 1 g L^{-1} carbón activado, el pH se ajustó a 5.7. Cada explante se colocó en frascos de cristal de 1 L con 100 mL de medio de cultivo. Los embriones se mantuvieron en cuarto de incubación, a 24 °C de temperatura y condiciones de oscuridad.

Transcurridas dos semanas, los embriones germinados o sin germinar se separan y transplantan (Figura 11) al medio de cultivo, compuesto por 4 mL L^{-1} de KNO_3 (1M), 4 mL L^{-1} de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (0.1M), 20 g L^{-1} sacarosa, 6 g L^{-1} agar-Plant, y 1 g L^{-1} carbón activado, pH de 5.7; se agregó 100 mL de medio de cultivo en frascos de 1 L. Los embriones se colocaron en cuarto de incubación a 24 °C de temperatura, fotoperiodo de 16 hr luz y 8 hr oscuridad, e intensidad luminosa de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

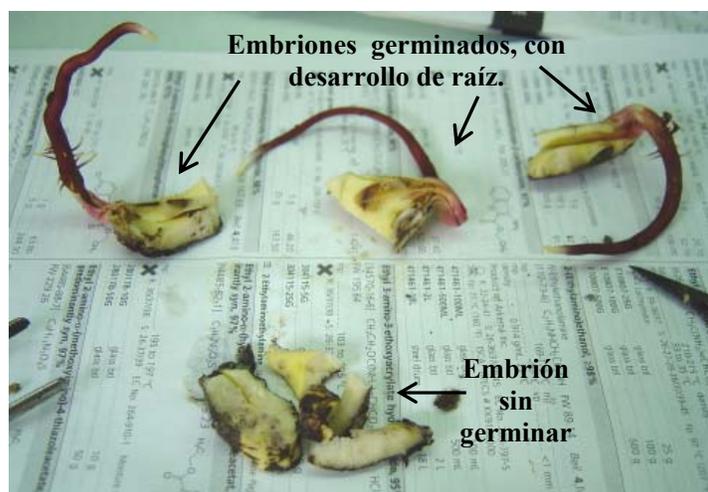


Figura 11. Embriones de mango cv. Ataulfo a subcultivar *in vitro*. Arriba se observan tres embriones germinados, y abajo un embrión sin germinar.

Para hacer la comparación entre cultivares, se cuantificaron: 1) Tiempo de germinación, se contaron los días a emergencia de la radícula (Parisot, 1988) de los embriones; 2) Porcentaje de germinación de semillas; 3) Número de plántulas por semilla; y 4) Porcentaje de germinación de embriones.

Para comparar el tamaño del embrión y posición del embrión, se determinó solamente: 1) Tiempo de germinación y 2) Porcentaje germinación de embriones.

De las plántulas obtenidas *in vitro*, se transplantan a invernadero sólo aquellas con altura mayor o igual a 8 cm, y mínimo con 3 hojas expandidas, sin daño, clorosis o malformaciones. El resto de las plántulas se mantuvieron *in vitro*, subcultivándose cada dos meses.

Las plántulas desarrolladas *in vitro* se transplantaron a macetas de 750 mL con sustrato 50:50 Grow-mix®: tezontle fino (v/v). Las plántulas se protegieron durante tres semanas con cubierta plástica para evitar deshidratación, posteriormente cada semana se incrementó la ventilación haciendo perforaciones en la cubierta plástica. Las plantas se mantuvieron en invernadero a temperatura promedio de 24 °C en el día y 16 °C por la noche, con humedad relativa de 54 % en el día y 80 % en la noche; se regaron dos veces por semana, alternando agua destilada y solución nutritiva (Solución Steiner, 1961).

3.5.1 Análisis de variables

Se aplicó el diseño experimental completamente al azar, considerando como tratamiento a los cvs. Manila y Ataulfo, se comparó porcentaje de germinación de semillas y número de plántulas por semilla.

Se utilizó el diseño experimental completamente al azar con arreglo trifactorial (2x3x4) considerando como tratamiento a los cvs. Manila y Ataulfo, el tamaño de explante (grande, mediano o chico), y la posición del embrión (1, 2, 3 y 4). Se hizo la comparación de medias de tiempo de germinación y porcentaje de germinación de embriones.

Los datos fueron analizados con el paquete estadístico SAS 9.0 (2002) mediante análisis de varianza y prueba de comparación de media de Tukey ($p \leq 0.05$). Para el análisis estadístico, las variables expresadas en porcentajes se sometieron a transformación de arcoseno o angular, normalizando los datos.

3.6 Cultivo de semillas en invernadero

Se sembraron 80 semillas de cada cultivar. Se retiró el endocarpo de las semillas (conservando la cubierta seminal) y se desinfestaron en solución de 2 g L⁻¹ de Captan. Se colocaron cuatro semillas en maceta de 1½ L con Grow-mix[®], con la parte ‘aplanada’ en forma paralela al sustrato para permitir que los embriones no se obstaculicen al germinar (Figura 12 a).

Las plantas se mantuvieron en el invernadero a temperatura promedio de 24 °C en el día y 16 °C por la noche, con humedad relativa de 54 % en el día y 80 % en la noche; el riego se efectuó tres veces por semana, dos con agua destilada y una vez por semana con solución nutritiva (Solución Steiner, 1961).

El total de semillas sembradas se numeró para registrar: 1) Tiempo de germinación, se contaron días transcurridos hasta que apareció el epicótilo (Avilán *et al.*, 1995) de la primera

plántula, así como de brotes posteriores (Figura 12 b) (IPGRI, 2006); 2) Porcentaje de germinación de semillas; y 3) Número de plántulas por semilla.

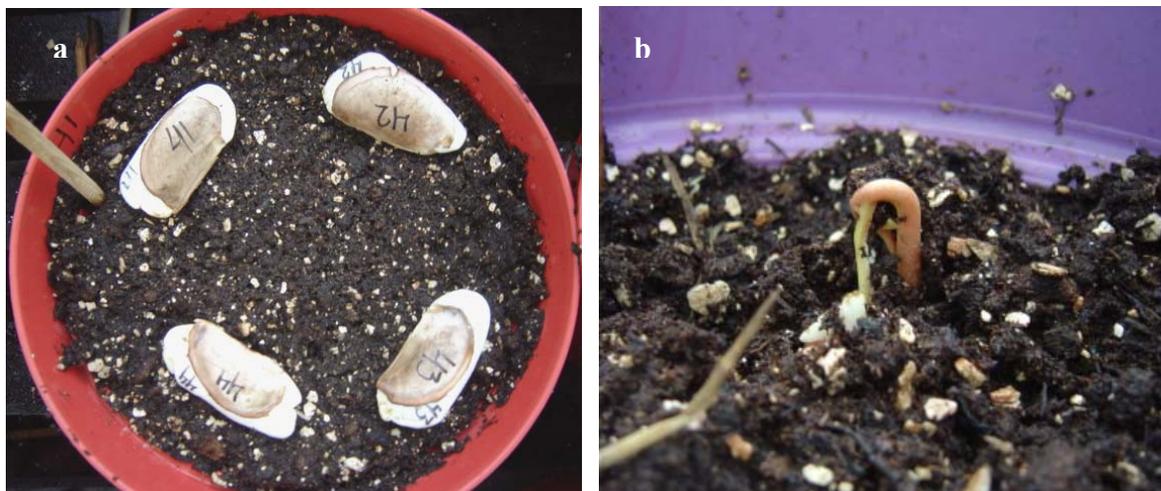


Figura 12. Forma de siembra de cuatro semillas de mango cv. Ataulfo en la maceta (con la parte ‘aplanada’ paralela al sustrato) (a). Aparición del primer brote de una semilla de mango cv. Ataulfo (b).

3.6.1 Análisis de variables

Se utilizó el diseño experimental completamente al azar, teniendo como tratamientos los cvs. Manila y Ataulfo; se realizó comparación de medias de variables: tiempo de germinación, porcentaje de germinación y número de plántulas por semilla.

Los datos fueron analizados con el paquete estadístico SAS 9.0 (2002) mediante análisis de varianza y prueba de comparación de media de Tukey ($p \leq 0.05$). Para el análisis estadístico, las variables expresadas en porcentajes se sometieron a transformación de arcoseno o angular, normalizando los datos.

3.7 Identificación de plántulas cigóticas y nucelares mediante RAPD

3.7.1 Colecta y almacén del material vegetal

De la planta madre se colectaron de forma aleatoria hojas sanas pero maduras, por no ser época de crecimiento vegetativo; se limpiaron y colocaron en bolsas plásticas identificadas con el nombre del cultivar. Las hojas se acomodaron en una hielera, sin que estuvieran en contacto directo con el hielo, para mantenerlas frías durante el viaje desde el Mpio. de Ixcuintla, Nayarit, al Colegio de Postgraduados, Montecillo, edo. México. En el laboratorio se lavaron las hojas con agua corriente y secaron con toallas de papel (Sanitas[®]), se pesaron 150 mg de tejido de cada hoja en la balanza analítica (SARTORIUS[®]), se almacenaron en viales Eppendorf[®] de 2 mL y se guardaron a temperatura de -20 °C en ultracongelador (FORMA SCIENTIFIC[®]) hasta la extracción de ADN.

De las plántulas que desarrollaron *in vitro* y se transplantaron a invernadero, se colectaron hojas jóvenes, cuyo color varió desde marrón hasta el verde claro (Figura 13). Las hojas se lavaron con agua corriente y secaron con toallas de papel (Sanitas[®]), se pesaron 100 mg de tejido y colocaron en viales Eppendorf[®] de 2 mL, guardándolos a temperatura de -20 °C hasta realizar la extracción de ADN.



Figura 13. Hojas jóvenes de mango utilizadas para la extracción de ADN.

De la mayoría de las plantas mantenidas en condiciones *in vitro* se pudo obtener 100 mg de tejido foliar, por lo que de otras plantas con menor desarrollo se colectó 150 mg de raíz, o 100 mg de hoja con tallo, o en su defecto, 100 mg de toda la planta. En algunos casos, donde no se pudo obtener los 100 mg de muestra, se usó el tejido disponible. El tejido se colocó en viales Eppendorf® de 2 mL, y se guardó a temperatura de -20 °C hasta la extracción de ADN. El tejido de las plantas mantenidas *in vitro* se colectó en condiciones asépticas, para seguir conservando las plántulas.

Para la identificación del origen de las plantas propagadas *in vitro*, solamente se seleccionan aquellas obtenidas de las semillas en que germinan todos los embriones o aquellos que son parte de una serie consecutiva (Cuadro 3).

Cuadro 3. Plántulas de mango cvs. Manila y Ataulfo utilizadas para la extracción de ADN.

Cultivar	Plántulas de semillas monoembriónicas	Semillas poliembriónicas	Plántulas de semillas poliembriónicas
Manila	3	10	30
Ataulfo	0	7	18

3.7.2 Extracción del ADN genómico

Siguiendo la metodología descrita por Andrade-Rodríguez *et al.* (2005) se extrajo ADN de tejido de mango cvs. Manila y Ataulfo. Se realizaron modificaciones al procedimiento para evitar la liberación de fenoles del tejido y la degradación del ADN.

En la extracción de ADN se utilizó tejido congelado (-20 °C) y no tejido fresco. Para poder tener buenos resultados al emplear tejido congelado se agregó sin demora el tampón de extracción después de triturar el tejido (Stein *et al.*, 2001), porque al tener diversos compuestos como CTBA y 2-mercaptoetanol, se previno la degradación y oxidación de ADN (García-Mas *et al.*, 2000; Valadez y Kalh, 2005). También, se empleó cloroformo:octanol (24:1) en lugar de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) para prevenir la oxidación de ADN. Ramírez *et al.* (2004) evaluaron diferentes métodos de extracción de ADN para frutales

tropicales (aguacate, coco, guayaba y mango), determinaron que los mejores protocolos para obtener ADN de calidad de accesiones de mango y coco, debe incluir CTBA en el tampón de extracción.

El primer paso fue macerar el tejido en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener polvo fino y homogéneo; con ayuda de una espátula se colocó el polvo en viales Eppendorf[®] de 2 mL estériles. Los morteros, pistilos y espátulas estaban estériles y congelados.

Conforme se colocaba cada muestra (100 mg) en los viales Eppendorf[®], se adicionaba 800 μ L de tampón de extracción (5 % CTBA, 100 mM Tris- HCl pH 7.5, 10 mM EDTA, 0.7 M NaCl, 5% N-laurilsarcosina, 140 mM β -mercaptoetanol); se incubó a 60 °C en baño maría por 30 min. Para las muestras de 150 mg de raíz se adicionó 1000 μ L de tampón de extracción, y para las muestras de 85-75 mg de tejido se agregó 600 μ L de tampón de extracción.

Después de enfriar a temperatura ambiente, para la separación de la fase acuosa, interfase y orgánica se adicionó un volumen de cloroformo:octanol (24:1), se agitó y centrifugó a 12 000 rpm por 15 min en una centrifuga Termo Scientific[®]. La fase acuosa se transfirió a un vial Eppendorf[®] estéril, se agregó 0.1 volumen del tampón 10 % CTBA (10 % CTBA y 0.7M NaCl), y se efectuó una nueva extracción con un volumen de cloroformo:octanol (24:1). Se homogeneizó y centrifugó a 12 000 rpm durante 10 min.

La fase acuosa recuperada se transfirió a un vial Eppendorf[®] de 1.5 mL estéril y para precipitar el ADN se adicionó un volumen de tampón de precipitación (1 % CTBA, 50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA), se agito levemente y dejó reposar 5 min. Se centrifugó a 10 000 rpm por 5 min. Se desechó la fase acuosa, procurando eliminar todo el líquido.

Se adicionó 400 μ L de TE alto en sales (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 1 M NaCl) precalentado a 60 °C y disolvió con agitación. Después de dejar enfriar la dilución hasta temperatura ambiente, el ADN fue precipitado con dos volúmenes de etanol absoluto frío, se agitó levemente, centrifugó a 12 000 rpm por 5 min y se desechó la fase acuosa.

El ADN se lavó con 700 μL de etanol frío 70 %, se homogeneizó, centrifugó a 12 000 rpm durante 5 min y desechó la fase acuosa. El último lavado consistió en agregar 400 μL de etanol absoluto frío, se homogeneizó y centrifugó a 12 000 rpm por 5 min. El sobrenadante se desechó, dejando secar todo residuo de etanol de los viales Eppendorf[®].

La pastilla obtenida se resuspendió y disolvió en 30 μL de TE 0.1 (1 mM Tris-HCl pH 8, 0.1 mM EDTA) con 20 ng μL^{-1} de ARNasa, se homogeneizó e incubó a 37 °C por 45 min. La dilución se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

Todos los reactivos utilizados para la extracción y para preparar TAE, fueron de la marca SIGMA-ALDRICH[®]; la ARNasa fue de la marca Invitrogen[®].

3.7.3 Determinación de la calidad y concentración del ADN genómico

Para determinar la degradación y/o presencia de contaminantes (proteínas, polisacáridos o RNA) en el ADN extraído, se realizó la separación mediante electroforesis en gel de agarosa (Invitrogen[®]) al 1 % (w/v). La electroforesis se realizó en la cámara CLP-APOLLO[®] con charola para gel de 20 cm de largo.

La agarosa se disolvió en TAE 1X mediante calentamiento, una vez disuelta se dejó enfriar a 55 °C, se vertió en la charola para gel, se colocaron 2 peines de 25 dientes cada uno (a 10 cm el segundo) y se esperó a que solidificara. Se usó como tampón TAE 1X (0.04M Tris-base, 1 mM EDTA pH 8, ácido acético glacial).

En los pozos del gel se cargaron 10 μL constituidos por 2 μL de alícuota de ADN, 7 μL de agua destilada deionizada estéril y 1 μL de tampón de carga (40 % glicerol, 0.1 % de azul de bromofenol, TE pH 8).

La corrida electroforética se mantuvo a 75 voltios durante 2 horas, o hasta que la banda de referencia migró 7.5 cm. El gel se tiñó con bromuro de etidio (10 mg mL^{-1}) durante 15 min. El gel fue enjuagado en agua destilada por 20 min.

El gel se visualizó en el transiluminador de luz UV (SYNGENE GVM20[®]) y se fotografió con la cámara CANON G6. Con el programa CANON Utilities Zoom Browser Ex 5.0[®].

Para cuantificar la concentración y pureza de ADN de las muestras, se tomó una alícuota de 1.5 μL de la muestra de ADN y se colocó en el espectrofotómetro Thermo Scientific NANODROP 2000/2000c[®], se tomaron y registraron las lecturas ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) con el software del mismo aparato. La concentración de ADN se ajustó a 20 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ para su posterior análisis mediante RAPD, diluyendo con TE 0.1.

La relación entre la lectura de absorbencia 260/280 nm ($\text{DO}_{260/280}$) aporta una estimación de la pureza del ADN. Las preparaciones puras de ADN muestran valores entre 1.8 y 2.0. Valores menores a 1.8 indican contaminación por proteínas u otros elementos absorbentes de la luz UV en la muestra, por lo que se debe volver a precipitar el ADN; una relación superior a 2.0 muestra contaminación por polisacáridos, fenoles, cloroformo, u otras sustancias orgánicas, y se debe volver a efectuar la precipitación con etanol (CIMMYT, 2005). La medición de longitud de onda 230 nm es indicativo de contaminación por proteínas, o puede señalar la presencia de contaminación por amortiguador (Tris, EDTA u otras sales) (Valadez y Kahl, 2005).

3.7.4 Selección de iniciadores

Con el ADN de una muestra del cv. Manila (no.21 embrión 3) se efectuó la selección de iniciadores. Se evaluaron 60 iniciadores Operon Technologies Inc. (OPA, OPB y OPC), y 8 iniciadores diseñados por Andrade-Rodríguez para amplificación en *Pouteria sapota* (Invitrogen[®]) (Anexo B).

Se preparó la solución para 66 reacciones. En tubos de 0.5 mL se puso 2.0 μL del iniciador a evaluar (20 pmol) y se agregó 23 μL de la mezcla de reacción (Cuadro 4).

Cuadro 4. Componentes de la mezcla de reacción para la amplificación mediante RAPD.

Componentes	Volumen para una reacción ^y
Mezcla de dNTPs, Invitrogen [®]	10.0 µL de (5 µM de cada dNTPs)
Amortiguador PCR (10X)	2.5 µL
MgCl ₂	1.5 µL (75 mM)
ADN polimerasa <i>Taq</i> , Invitrogen [®]	0.3 µL (1.5 U)
Iniciador	2.0 µL (20 pmol)
ADN	4.0 µL (80 ng)
Agua destilada desionizada estéril.	4.7 µL
Total	25.0 µL

y: Se prepara una reacción más en caso de error al pipetear (CIMMYT, 2005).

La mezcla de reacción se mantuvo en un ‘cooler’ (contenedor de viales Eppendorf[®] que mantiene las muestras a -20 °C); por la sensibilidad de la polimerasa, ésta se adicionó al final de la mezcla. La solución se homogeneizó, centrifugó dando un ‘pulso’ a 5 000 rpm, y se adicionó 25 µL de aceite mineral estéril. Se volvió a centrifugar dando un ‘pulso’.

La amplificación mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) fue realizada en el termociclador TECHNE TC-412[®], con el siguiente programa: predesnaturalización de 4 min a 94 °C; 36 ciclos de tres pasos, desnaturalización de 1 min a 94 °C, alineación del iniciador 1 min a 36 °C y polimerización de 2 min a 72 °C; la extensión final de 10 min a 72 °C. Al terminar el programa las muestras se almacenan a -20 °C .

La electroforesis en gel de agarosa (Invitrogen[®]) permitió la separación de los fragmentos amplificados de la muestra de ADN. El gel se preparó igual que el empleado para la determinación de calidad del ADN (apartado 3.7.3), pero se incrementó la concentración de agarosa al 1.5 %.

A cada muestra se agregó 2.0 μL de amortiguador de carga (40 % glicerol, 0.1 % de azul de bromofenol, TE pH 8), se homogeneizó y centrifugó dando un ‘pulso’ a 5 000 rpm. Cada pozo del gel se cargó con 25 μL de muestra; el primer pozo del gel se cargó con 10 μL del marcador de peso molecular ‘1kb DNA Ladder GIBCO BRL[®]’ (500 ng), para determinar el tamaño de los fragmentos generados. El gel se cubrió con TAE 1X.

La electroforesis se realizó a 75 voltios durante 4.5 horas, tiempo en el que la banda de referencia recorrió 7.5 cm. El gel fue teñido con bromuro de etidio (10 mg mL^{-1}) durante 30 min, y se enjuagó 20 min. en agua destilada. El gel se fotodocumentó en el transiluminador de luz UV (SYNGENE GVM20[®]) con la cámara CANON G6[®].

3.7.5 Identificación de las plántulas mediante RAPD

Se preparó la mezcla de reacción con los reactivos indicados en el Cuadro 4. En tubos de 0.5 mL se colocaron 4.0 μL de las diferentes muestra de ADN (80 ng), posteriormente se agregó 21 μL de la mezcla de reacción. Se homogeneizó, centrifugó dando un ‘pulso’ a 5 000 rpm, y se adicionó 25 μL de aceite mineral estéril. Se centrifugó dando un ‘pulso’.

La amplificación mediante PCR se realizó en el termociclador TECHNE TC-412[®] con el programa: predesnaturalización de 4 min a 94 °C; 36 ciclos de tres pasos, desnaturalización de 1 min a 94 °C, alineación del iniciador 1 min a 36 °C y polimerización de 2 min a 72 °C; la extensión final de 10 min a 72 °C. Al terminar el programa las muestras se almacenan a -20 °C.

Se agregó 2.0 μL de amortiguador de carga (40 % glicerol, 0.1 % de azul de bromofenol, TE pH 8) a las muestras, se homogeneizó y centrifugó dando un ‘pulso’ a 5 000 rpm. El primer pozo se cargó con 10 μL del marcador de peso molecular ‘1kb DNA Ladder GIBCO BRL[®]’; el segundo y tercer pozo se cargaron con 25 μL de muestra de ADN de la planta madre; y el resto de los pozos se cargaron con 25 μL de muestra de ADN de las plantas a identificar.

Los fragmentos de ADN producidos por los RAPD, se separaron por electroforesis en gel de agarosa (Invitrogen[®]) al 1.5 %, utilizando TAE 1X como amortiguador. La electroforesis se realizó a 75 voltios durante 4.5 horas; el gel fue teñido con bromuro de etidio (10 mg mL⁻¹) y se visualizó y capturó en el transiluminador de luz UV (SYNGENE GVM20[®]) con la cámara CANON G6[®].

El peso molecular de los productos de la amplificación se calcularon con el software GENE TOOLS[®] versión 3.06 (SynGene, Frederick, MD), tomando como referencia el '1 kb DNA Ladder GIBCO BRL[®]'.

3.7.6 Análisis de datos moleculares

Se compararon los patrones de bandeo generados entre las plantas madre de cada cultivar y las plantas a identificar; se tomó como base el peso molecular de las bandas. Se asumió que dos bandas con el mismo peso molecular en diferentes muestras, eran iguales. Las bandas constantes entre las muestras amplificadas para un iniciador, se consideraron monomórficas; y las bandas que estuvieron presentes o ausentes en por lo menos una de las plántulas evaluadas, se asumieron como polimórficas. Por lo tanto, se aceptaron como plántulas cigóticas, a aquellas que se caracterizaron por mostrar patrones de amplificación diferentes al de la planta madre (bandas polimórficas).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Características morfológicas de frutos, semillas y embriones

Los frutos de los cvs. Manila y Ataulfo tuvieron color amarillo al madurar, característico de los mangos poliembriónicos (Eiadthong *et al.*, 1999). ‘Manila’ presentó frutos de forma oblonga (fruto más largo que ancho), con ápice agudo que frecuentemente tuvo un pico (*P*); mientras que, en ‘Ataulfo’ el fruto mostró forma obovoide (fruto con base ancha y ápice angosto), con ápice obtuso o achatado (Figura 14). Ambos tuvieron pedúnculo recto, cavidad del pedúnculo poco profunda, sin cuello o protuberancia donde se inserta el pedúnculo.

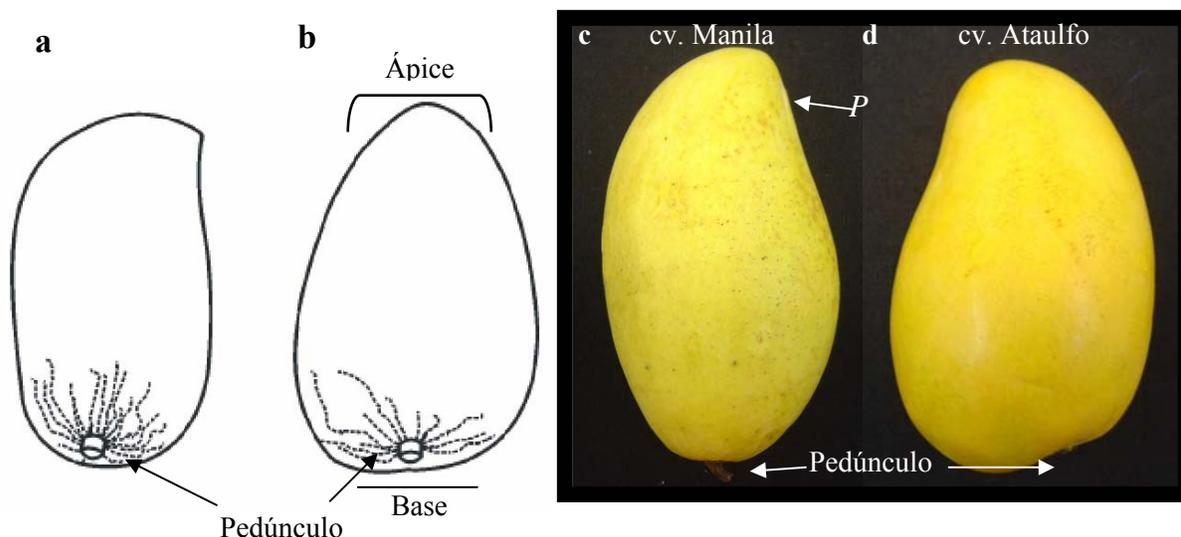


Figura 14. Forma de los frutos de mango: a) Oblonga y b) Obovoide (IPGRI, 2006). En las imágenes de la derecha se aprecia un fruto del cv. Manila con forma oblonga (c) y un fruto del cv. Ataulfo con forma obovoide (d). *P*, pico.

El endocarpo en los cvs. Manila y Ataulfo es duro, con surcos marcados (‘depressing veins’) y comúnmente paralelos en la parte central, bifurcándose hacia el ápice. Según el IPGRI (2006), en ambos cultivares el endocarpo mostró ‘cantidad intermedia de fibras’, con longitud corta (< 1.0 cm), y fuertemente adheridas al endocarpo. El lado convexo o ‘abultado’ del endocarpo tuvo fibras de longitud media (1.0 – 1.5 cm) a largas (> 1.5 cm).

En el cv. Ataulfo, predominó la forma reniforme en 90 % de la semilla (forma de riñón); mientras que, en el cv. Manila fue 71.4 % de forma reforme y el resto de las semillas tuvo forma oblonga (semilla más larga que ancha) (Figura 15). A diferencia de la semilla de ‘Manila’, en ‘Ataulfo’ presentó coloración blanca con matices rosados.

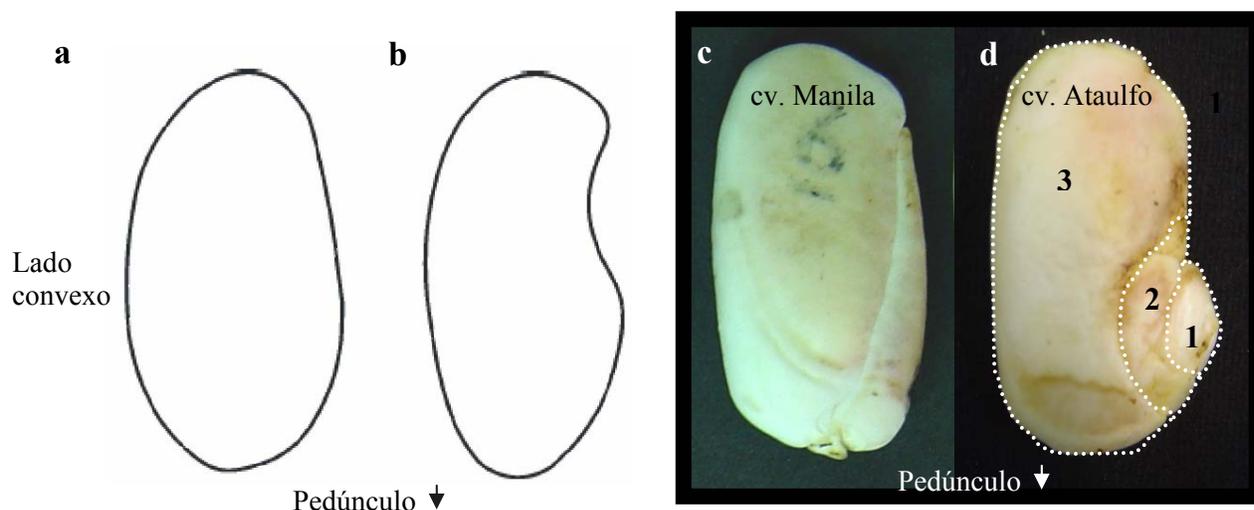


Figura 15. Forma de las semillas de mango: a) Oblonga y b) Reniforme (IPGRI, 2006). En las imágenes de la derecha se observa una semilla monoembriónica del cv. Manila de forma oblonga (c), y una semilla poliembriónica del cv. Ataulfo de forma reniforme, con tres embriones (delimitados por líneas punteadas) (d).

Zulia *et al.* (2001) evaluaron nueve cultivares de mangos criollos de Venezuela, y concluyeron que la forma de la semilla varía entre cultivares, y que la forma del fruto está asociada a la forma de la semilla. Entre los cvs. Manila y Ataulfo se observó variación de forma entre las semillas, pero no se encontró correlación entre la forma del fruto y de la semilla.

En los cvs. Manila y Ataulfo se encontró una ‘película’ papirácea, muy delgada, lisa y de color blanco, entre el endocarpo y la semilla, nombrada como testa por Parisot (1988). En estudios de anatomía del óvulo en angiospermas realizados por Esau (1982) y Espinosa y Engleman (s/a), el tegumento externo en el óvulo, que originan la testa en la semilla, debe estar unidos al funículo o cordón de tejido que conecta el óvulo y la placenta. Considerando lo dicho por Esau (1982) y Espinosa y Engleman (s/a), y lo observado en las semillas de ambos cultivares, la membrana blanca no corresponde a la testa al no estar unida al funículo; la testa

junto con el tegmen se distinguió como la capa delgada, membranacea y café que cubre a los embriones y que estuvo unida al funículo (Figura 16). En la anacardiácea *Schinus terebinthifolius* Raddi, Carmello-Guerreiro y Sartori (1999) también describen a la testa y tegmen como una capa membranacea, lisa y de color café claro.

La fusión de testa y tegmen se llama cubierta seminal (Espinosa y Engleman, s/a), y en mangos poliembriónicos la fusión ocurre en estadios tempranos del desarrollo del óvulo (Sturrock, 1967), por lo que en las semillas estudiadas no se pudo distinguir a simple vista la testa y el tegmen. La cubierta seminal en ambos cultivares generalmente se halló fuertemente adherida a los embriones (Figura 16).

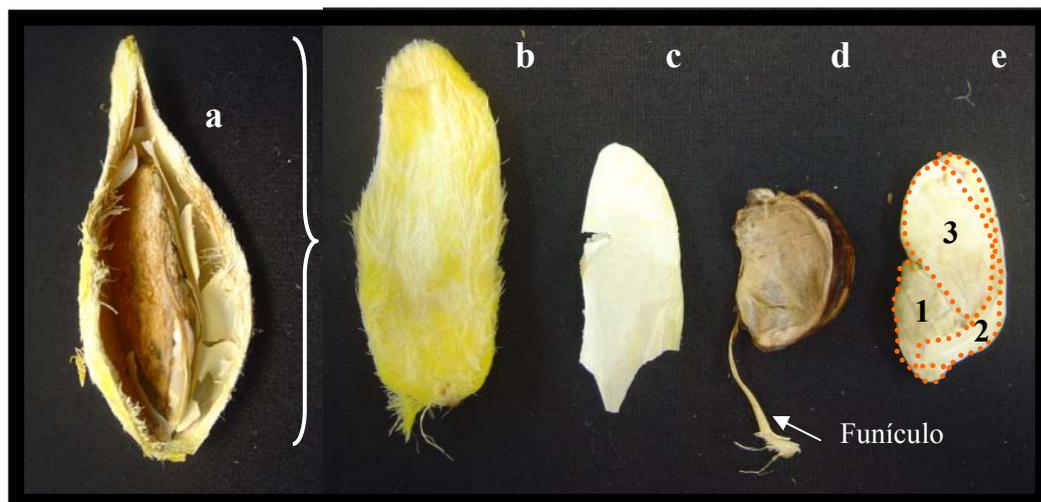


Figura 16. En la imagen se observa: a) la semilla con el endocarpo abierto; b) el endocarpo; c) la membrana blanca; d) la cubierta seminal con el funículo; y e) tres embriones agrupados (delimitados por líneas punteadas), de mango cv. Manila.

Tanto en el cv. Manila como en Ataulfo, se observaron residuos de rafe como un ligero reborde iniciado en el funículo. Ledesma (2007) observó en óvulos en desarrollo de mango Ataulfo, la presencia de un haz vascular simple del lado ventral o cóncavo. De igual forma, se encontró en la mayoría de las semillas que la cubierta seminal estaba abierta por el lado opuesto a la rafe, conocida como antirrafe, que recorre desde la calaza al micrópilo (Espinosa y Engleman, s/a) (Figura 17). Carmello-Guerreiro y Sartori (1999) en las semillas de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiácea) tampoco observaron continuidad de la testa y tegmen en la región antirrafe-micrópilo.

El micrópilo no fue visible, aunque se asume que está cercano al funículo por tratarse de un óvulo anátropo (Espinosa y Engleman, s/a).

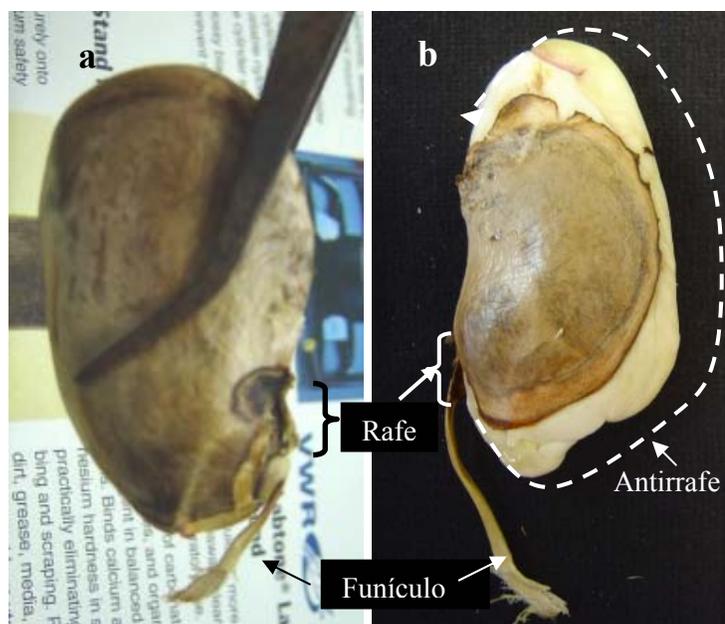


Figura 17. a) Embriones envueltos totalmente por la cubierta seminal, se observa la rafe de color café oscuro en la semilla de mango cv. Ataulfo; b) Embriones envueltos parcialmente por la cubierta seminal, apreciándose la región correspondiente a la antirrafe (línea punteada) en la semilla de mango cv. Manila.

Después de retirar la cubierta seminal, se observaron a la mayoría de los embriones; sin embargo, en el cv. Manila varios embriones estaban ‘ocultos’ al ser cubiertos por los cotiledones de embriones más grandes. Generalmente, en la superficie se visualizan los ejes embrionarios, aunque en ambos cultivares se encontraron ejes embrionarios escondidos entre otros embriones (Figura 18 a). En los dos cultivares frecuentemente se localizaron embriones pequeños aglutinados en el área cercana al funículo, y por lo tanto, próximo al micrópilo (Espinosa y Engleman, s/a)- (Figura 18 b). Koltunow *et al.* (1995) citado por Villegas y Andrade (2008), reportan que en el cv. Valencia (*Citrus sinensis*) los embriones disminuyen su tamaño conforme se acercan al extremo micropilar de la semilla.

En los cvs. Manila y Ataulfo se encontraron embriones germinados (0.83 % de 120 embriones, apartado 3.3.4) que mostraron desarrollo del eje embrionario en plúmula y radícula (Figura 18 c). Característicamente los ejes embrionarios del cv. Ataulfo tuvieron coloración

rosa en la punta de la radícula; coincidiendo con lo reportado por Kennard (1955) para el cv. Paheri, que presentó pigmentación roja desde la punta de la radícula hasta el hipocótilo, concentrándose en la región meristemática. Mientras que, en el cv. Manila el eje embrionario fue blanco.

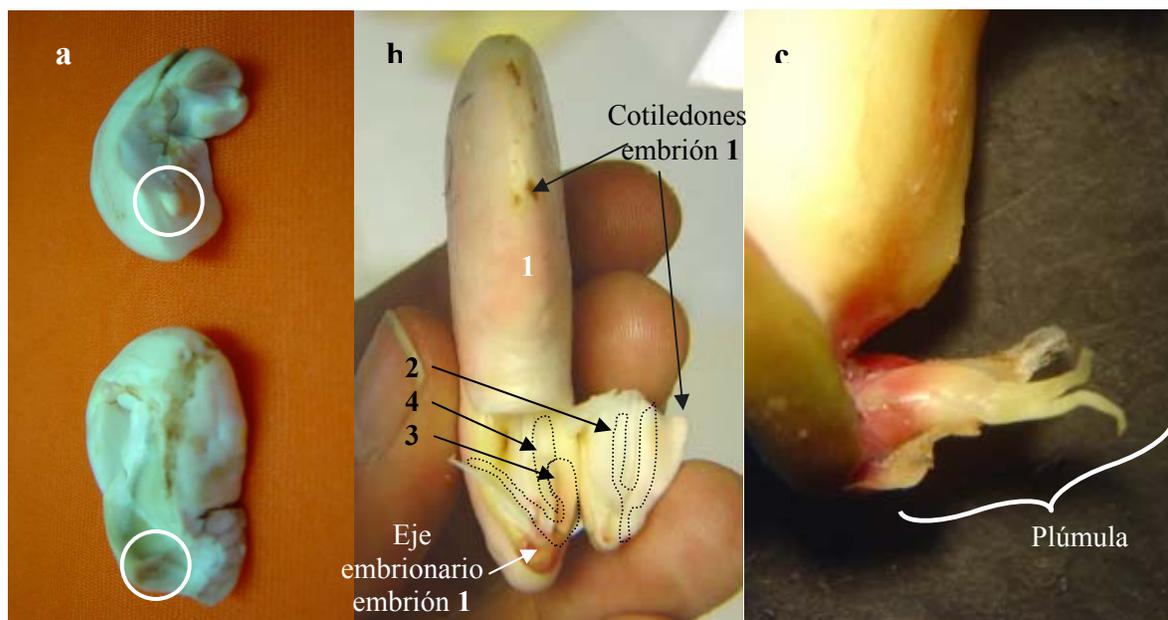


Figura 18. a) Embriones con ejes embrionarios (O) que estaban cubiertos por otros embriones de mango cv. Manila; b) Embriones (número 2, 3 y 4) aglutinados en la región del funículo, de mango cv. Ataulfo (el embrión 1 es el más grande); c) Plúmula en desarrollo de un embrión de mango cv. Ataulfo.

En ninguno de los embriones de los cvs. Manila y Ataulfo los cotiledones fueron idénticos. En los embriones más grandes, generalmente se mostraron dos cotiledones amorfos, de formas irregulares, adaptados a la forma del resto de los embriones (Figura 19 a). En muchos de los embriones cercanos al funículo se observó que uno de los cotiledones o incluso los dos, eran tan delgado como papel (Figura 19 b). De igual forma, Mo *et al.* (2005) reportan para los mangos poliembriónicos Tu-mang, Aroemanis y Carabao que los cotiledones de los embriones se encimaban, mostrando deformaciones y desigualdades de tamaño. Arndt (1935) efectuó uno de los primeros reportes que también señalan las diferencias entre cotiledones de mango. Mendes-da-Glória *et al.* (2001) observaron que algunos embriones de naranja Valencia poseían un cotiledón atrofiado y minúsculo, mientras que el otro era normal y más

grande; incluso hallaron embriones sin radícula o sin ápice caulinar desarrollado, o con eje embrionario colapsado.

En el cv. Manila se observaron embriones que compartían 1 cotiledón (1.7 % de 120 embriones, apartado 3.3.4); por su parte, Mo *et al.* (2005) hallaron embriones con hasta 3 cotiledones o dos plúmulas en la variedad Aroemanis.

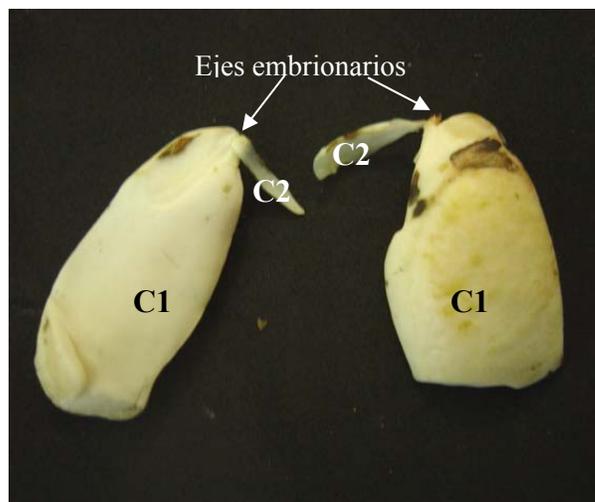


Figura 19. Dos embriones con el par de cotiledones desiguales, de mango cv. Manila. C1= cotiledón mayor, C2= cotiledón menor.

En la *Tabebuia ochracea* (Fam. Bignoniaceae), Costa *et al.* (2004) mencionan que en las semillas poliembriónicas se observan comúnmente alteraciones morfológicas en los cotiledones de embriones cigóticos y nucelares, posiblemente debido a la competencia por espacio que se genera dentro de la semilla. Mendes-da-Glória *et al.* (2001) también atribuyen las alteraciones morfológicas de los cotiledones en embriones de *Citrus* a la competencia por espacio. Por lo que, posiblemente la diferencia entre el tamaño de los cotiledones en los embriones de los cvs. Manila y Ataulfo se deba a que la compactación entre embriones impide que ambos cotiledones se desarrollen simultáneamente y tengan el mismo tamaño.

En estudios de embriones nucelares de naranja Valencia, Mendes-da-Glória *et al.* (2001) reportan formas irregulares de los cotiledones y diferencia de tamaño entre el par de cotiledones, no obstante, afirman que estas alteraciones morfológicas no perjudican el desarrollo de los embriones a plántulas. Parisot (1988) y Avilán *et al.* (1995) en estudios en

mangos poliembriónicos, relacionan el tamaño de los cotiledones con la capacidad y velocidad de germinación, ya que a mayor tamaño mayor reservas nutritivas.

Los resultados obtenidos demuestran la variabilidad existente entre los embriones de semillas poliembriónicas de mango, así como la asincronía de desarrollo y madurez entre los mismos. Estas características también se pueden presentar en otras especies poliembriónicas, como en cítricos; sin embargo, la morfología tan irregular y la diferencia de tamaño entre cotiledones (de hasta 90 %), es una característica representativa de los embriones de mango.

4.1.1. Características morfológicas de frutos

Los frutos del cv. Ataulfo superaron estadísticamente en peso y ancho a los frutos de ‘Manila’ (Cuadro 5). El rango de peso de los frutos en ‘Manila’ (94 – 222 g) y en ‘Ataulfo’ (114 - 358 g) fueron inferiores a los reportados por Galán (1999), 180-360 g para ‘Manila’, y por Vázquez *et al.* (2006), 250-300 g para ‘Ataulfo’. Pero en general, 93.5 % de los frutos de ‘Manila’ y 100 % de los frutos ‘Ataulfo’ analizados en esta investigación cumplieron con el peso necesario para el mercado de exportación de fruta fresca en México (incluidos dentro de los calibres marcados por la NMX FF-058-SCFI-2006).

Cuadro 5. Comparación de medias para peso, largo y ancho de frutos de mango cvs. Manila y Ataulfo.

Cultivar	Características de fruto		
	Peso (g)	Largo (cm)	Ancho (cm)
Manila ¹	145.133 b	9.940 a	5.452 b
Ataulfo ¹	208.145 a	9.777 a	6.668 a
DMS	11.585	1.993	0.195
CV	21.001	61.608	10.279

n¹ = 40 frutos de cada cultivar. Valores con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey, p≤0.05). DMS: Diferencia mínima significativa.

En estudios realizados por Zulia *et al.* (2001) en nueve cultivares criollos de Maracaibo ('Manga', 'Burro', 'Piedra', 'Valenciano', 'Perita', 'Rosa', 'Bolillo', 'Bocado' y 'Brillit'), encontraron que el largo fue la característica que determinó la forma del fruto; no obstante, en los cvs. Manila y Ataulfo, el ancho fue el que definió las diferencias entre la forma del fruto de ambos cultivares.

En el fruto de 'Manila' hubo correlación entre peso con el largo y ancho ($r = 0.622$, $p \leq 0.01$ y $r = 0.825$, $p \leq 0.01$); mientras que, en 'Ataulfo' el peso del fruto se correlacionó con el ancho ($r = 0.530$, $p \leq 0.05$) y no con el largo. Esta relación sugiere que para 'Ataulfo' el ancho tiene mayor influencia en la forma del fruto, por eso es obovoide (base ancha y ápice angosto).

4.1.2. Características morfológicas de semillas con endocarpo

El endocarpo de las semillas del cv. Ataulfo fue más ancho que en 'Manila' (Cuadro 6), dicha diferencia también sucedió en el ancho del fruto. Por lo que, la forma del fruto puede estar asociada a la forma del endocarpo debido a que el exocarpo ('cáscara'), el mesocarpo ('pulpa') y el endocarpo (cubierta fibrosa y dura que envuelve la semilla) tienen en común el mismo origen, al desarrollarse a partir de la pared del ovario (Esau, 1982).

Cuadro 6. Comparación de medias para peso, largo y ancho de semillas con endocarpo de mango cvs. Manila y Ataulfo.

Cultivar	Características de semilla con endocarpo		
	Peso (g)	Largo (cm)	Ancho (cm)
Manila ¹	12.872 b	8.303 a	2.931 b
Ataulfo ¹	16.720 a	7.882 b	3.284 a
DMS	0.612	0.189	0.093
CV	20.079	11.353	14.570

¹n = 40 semillas de cada cultivar. Valores con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). DMS: Diferencia mínima significativa.

En el cv. Manila hubo correlación positiva y significativa entre el ancho del endocarpo de la semilla con el largo del fruto ($r = 0.838$, $p \leq 0.01$); mientras que, en el cv. Ataulfo hubo correlación positiva y significativa entre el ancho del endocarpo de la semilla y ancho del fruto ($r = 0.841$, $p \leq 0.01$). Con la correlación se aprecia que el ancho del endocarpo determinó las diferencias en la forma del fruto de ambos cultivares.

Comúnmente para sembrar las semillas (que conservan el endocarpo), éstas se deben secar a la sombra en un lugar aireado durante 1 o 2 días, para posteriormente sembrar después de eliminar el endocarpo y la testa (Galán, 1999). Se debe considerar que las semillas de mango pierden rápidamente la capacidad para germinar, especialmente si no se toman en cuenta factores como temperatura y humedad de almacenamiento (Parisot, 1988; Anila y Girija, 2005).

En este trabajo, las semillas con endocarpo de ambos cultivares se secaron durante 48 h, perdiendo entre 22 y 23 % de agua (Cuadro 7).

Cuadro 7. Pérdida de agua en 48 h en semillas con endocarpo en mango cvs. Manila y Ataulfo.

Cultivar	Peso (g)		Pérdida de agua (%)
	PMF	PSM	
Manila ¹	12.769 b	10.018 b	22.00 a
Ataulfo ¹	16.763 a	13.020 a	23.00 a
DMS	0.661	0.605	1.014
CV	19.801	23.428	28.185

n¹ = 100 semillas de cada cultivar. Valores con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). PMF: Peso de materia fresca; PSM: Peso de materia seca. DMS: Diferencia mínima significativa.

A pesar de las diferencias estadísticas en el peso de materia fresca (PMF) y peso de materia seca (PMS) entre los cultivares, no hubo diferencias estadísticas en el porcentaje de pérdida de agua.

Anila y Girija (2005) estudiaron los efectos de la desecación de la semilla en mango cvs. Chandrakaran, Moovandan y Puliyan. Mencionan que a los dos días de secado las semillas pierden hasta 20 % de agua, germinando sólo el 60 % de las semilla; así mismo, indican que la pérdida de humedad repercute en el desarrollo posterior de las plántulas que lleguen a emerger (peso, altura y vigor). En los cvs. Manila y Ataulfo la pérdida de agua fue 22 a 23 %, valor que pudo ocasionar la disminución de la germinación de los embriones al cultivarse *in vivo* (ver apartado 4.4); no obstante, al sembrar los embriones *in vitro* (ver apartado 4.3) y crear un ambiente de humedad constante y temperatura adecuada (24 °C), se favoreció la germinación de embriones (hasta 89 %).

4.1.3. Características morfológicas de semillas

Hubo diferencia significativa de peso, largo y ancho para ambos cultivares (Cuadro 8). ‘Manila’ tuvo semillas más largas que ‘Ataulfo’, pero ‘Ataulfo’ tuvo semillas más anchas, como ocurrió con el endocarpo (Cuadro 6). Además, se mostró correlación alta entre el largo de la semilla con el largo del endocarpo ($r = 0.946$, $p \leq 0.01$) en ‘Manila’; mientras que en ‘Ataulfo’ hubo correlación de largo y ancho de la semilla, con el largo y ancho del endocarpo ($r = 0.909$ y $r = 0.889$, $p \leq 0.01$). Por lo tanto, la semilla (óvulo maduro) adquirió la forma que le permitió el espacio disponible (lóculo) que tiene el endocarpo (epidermis interna del pericarpo del ovario maduro). Kennard (1955) estudió el desarrollo de la fruta, semillas y embriones en mango cv. Paheri; describió que el tamaño de la semilla esta en relación al ovario, ya que las semillas llenan el lóculo durante la lignificación del endocarpo (ya desarrollado).

Hubo correlación positiva entre peso del fruto y peso de la semilla ($r = 0.618$, $p \leq 0.01$) en ‘Manila’; mientras que en ‘Ataulfo’, el ancho del fruto fue el que determinó el peso de la semilla ($r = 0.791$, $p \leq 0.01$). Por lo que, los frutos más grandes de ‘Manila’ y los frutos más anchos de ‘Ataulfo’ tendrán semillas más grandes.

Cuadro 8. Comparación de medias para peso, largo y ancho de semillas de mango cvs. Manila y Ataulfo.

Cultivar	Características de semilla		
	Peso (g)	Largo (cm)	Ancho (cm)
Manila ¹	8.396 b	5.121 a	2.387 b
Ataulfo ¹	9.568 a	5.111 b	2.704 a
DMS	0.964	0.010	0.098
CV	29.470	12.220	10.523

n¹ = 40 semillas de cada cultivar. Valores con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey, p≤0.05). DMS: Diferencia mínima significativa.

En el cv. Manila la semilla con endocarpo representa 10.3 % en peso del fruto, valor superior a 8.1 % en el cv. Ataulfo (Cuadro 9), lo que puede indicar mayor cantidad o densidad de pulpa en ‘Ataulfo’.

Cuadro 9. Proporción (%) del fruto que tienen la semilla con endocarpo y la semilla de mango cvs. Manila y Ataulfo.

Cultivar	Proporción de peso (%)	
	Semilla con endocarpo/ Fruto	Semilla / Fruto
Manila ¹	10.291 a	6.290 a
Ataulfo ¹	8.063 b	4.131 b
DMS	0.700	0.620
CV	16.932	26.453

n¹ = 40 frutos de cada cultivar. Valores con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey, p≤0.05). DMS: Diferencia mínima significativa.

Rúele y Ledin (1955), citados por Zulia *et al.* (2001), señalan que la semilla con endocarpo debe ser inferior a 10 % del peso del fruto, para ser considerada variedad o cultivar comercial; tanto ‘Manila’ como ‘Ataulfo’ cumplen con este parámetro, y deben considerarse cultivares comerciales.

Al estudiar a los embriones agrupados en la conformación de la semilla, se observó que en ‘Manila’ 80 % de los embriones orientan su radícula hacia el pedúnculo, contrariamente en ‘Ataulfo’, 70 % de los embriones orientan su radícula hacia el funículo, cercano al micrópilo (Espinosa y Engleman, s/a) (Figura 20). En mango, sólo Mo *et al.* (2005) estudiaron la orientación de los ejes embrionarios en la semilla, y describieron que en los cvs. Aroemanis, Carabao y Tu-mang los ejes embrionarios se orientan hacia la base del micrópilo. Esta característica se observó en el ‘Ataulfo’.

Villegas y Andrade (2008) reportaron que en *Citrus rashni* y *C. amblycarpa* la mayoría de los embriones orientan la radícula hacia el micrópilo, pero 1.5 y 2.0 % respectivamente, la orientan hacia la región calazal. Sus resultados difieren de lo observado en ‘Manila’, donde el 15 % de los embriones se orientan hacia la región calazal; por lo tanto, los embriones de cítricos y mango no tienen el mismo comportamiento. Los resultados obtenidos indican que no se deberían generalizar las características y procesos de poliembrionía entre especies, ni entre cultivares.

Además, en el cv. Manila 55 % de las semillas tienen la mayoría de los embriones concentrados en la región del funículo, 20 % en la región del pedúnculo, 10 % en la región de opuesta al funículo, y 15 % en una región diferente. Mientras que en ‘Ataulfo’, en 95 % de las semillas los embriones se aglomeran en la región del funículo (Figura 20). Parisot (1988) y Mo *et al.* (2005) describen como los embriones en las semillas de mango comúnmente se localizan hacia la región del micrópilo, pero no muestran datos. Parisot (1988) indica que rara vez los embriones se pueden ubicar en el extremo opuesto del micrópilo o en el lado superior de las semillas, como se observó en 14% de los embriones de ‘Manila’.

En cítricos, Ribeiro *et al.* (1999) señalan que 46 % embriones (en estadio globular, torpedo y cotiledonar) se concentran en la región micropilar y el resto en regiones interiores de la semilla; indicando que esta disposición posiblemente se deba a la disponibilidad de espacio físico y nutrimentos del endospermo. Posiblemente, como en ‘Manila’ hay mayor número de embriones por semilla (hasta 7 embriones) que en ‘Ataulfo’ (hasta 5 embriones), sus embriones se distribuyen en regiones distintas a las del micrópilo.

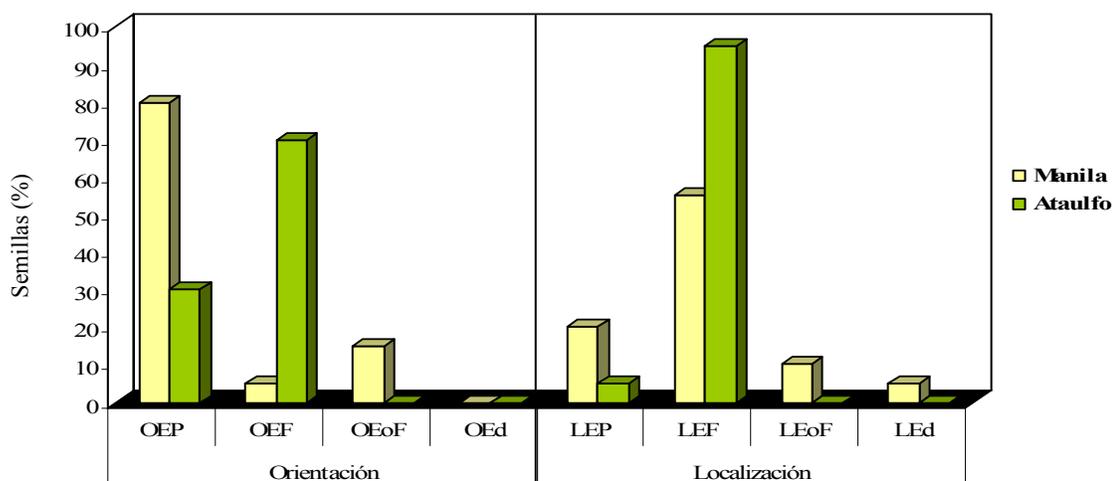


Figura 20. Orientación y localización de embriones en las semillas de mango cvs. Manila y Ataulfo. Porcentajes calculados en 40 semillas de cada cultivar. OEP: Orientación hacia pedúnculo; OEF: Orientación hacia funículo; OEoF: Orientación opuesta al funículo; OEd: Orientación diferente; LEP: Localización hacia pedúnculo; LEF: Localización hacia funículo; LEoF: Localización opuesta al funículo; LEd: Localización diferente.

Las diferencias entre orientación y localización de los embriones en los cvs. Manila y Ataulfo posiblemente también influya en la forma de la semilla de cada cultivar, y en la forma y tamaño de los embriones.

Con base en lo reportado, se podría considerar que la ubicación del micrópilo varía entre ‘Manila’ y ‘Ataulfo’, o que existen diferencias de otras características anatómicas. Por lo que se sugiere realizar estudios anatómicos del desarrollo de los embriones.

Normalmente, la forma de colocar la semilla de mango al momento de sembrar, es con el lado convexo hacia arriba (Galán, 1999). Con los datos obtenidos, se determinó que esta forma de siembra favorecería la germinación de la mayoría de los embriones en el cv. Manila, por localizarse cerca del pedúnculo y orientar su radícula hacia el mismo (Figura 21). Pero en el cv. Ataulfo, puede dañar a las plántulas que intentan germinar entre otros embriones, ya que 95 % de éstos se agrupan en la región cercana al funículo. Por lo que, se recomienda que las semillas del cv. Ataulfo se siembren con la parte ‘aplanada’ en forma paralela al sustrato (Figura 12).

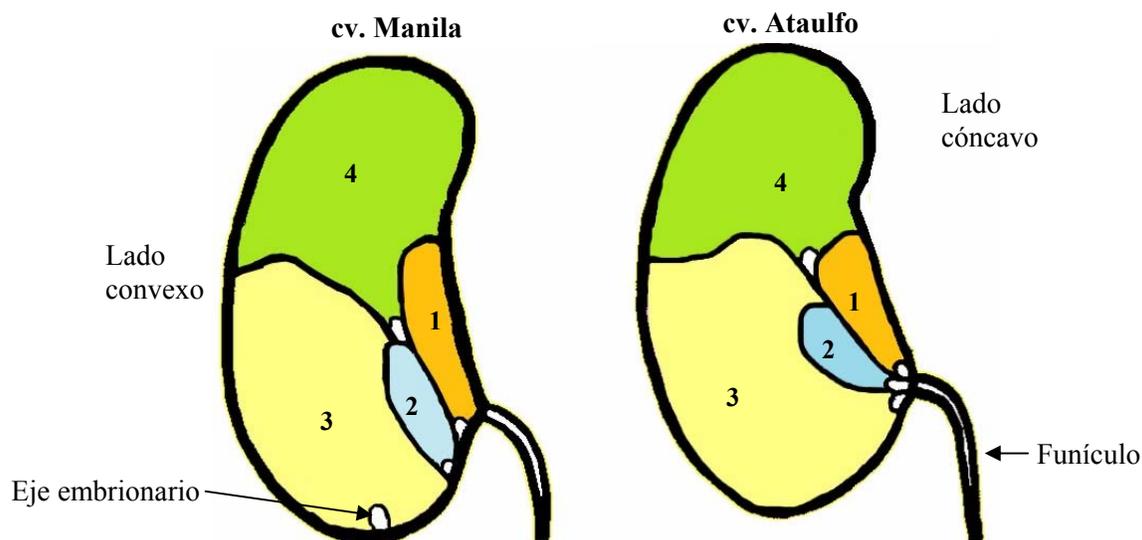


Figura 21. Distribución y orientación de embriones en las semillas de mango cvs. Manila (M) y Ataulfo (A).

En el embrión donde se insertó el funículo en la cubierta seminal generalmente se observó una protuberancia (Figura 22), que sirvió como indicador del embrión '1' en esta investigación. En 'Manila', 90 % de los embriones mostraron la protuberancia, y en 'Ataulfo', 82.5 %, lo que significa que es una característica anatómica que puede usarse como referencia para ubicar al embrión '1' en la semilla de mango poliembriónico.

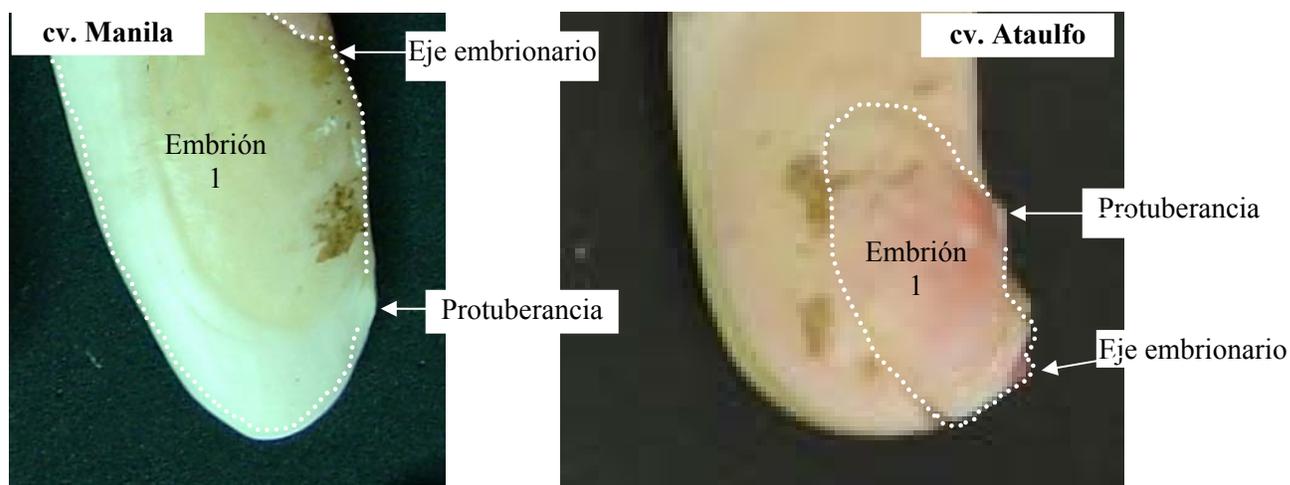


Figura 22. Presencia de protuberancia en el embrión 1, donde se insertó el funículo en la cubierta seminal de la semilla de mango cvs. Manila y Ataulfo.

4.1.4. Características morfológicas de embriones

Los embriones se separaron para analizar sus características, sin embargo, la mayoría sufrió rupturas en el eje embrionario. Así que, no se separaron los embriones al cultivar *in vitro*, y se sembró la mitad inferior de la semilla con la totalidad o la mayoría de los mismos (los embriones que no estaban en el explante se disectaron y sembraron). En cítricos los embriones pueden separarse sin ser dañados, como lo realizó Andrade-Rodríguez *et al.* (2005) para cultivarlos individualmente *in vitro*. La diferencia con la que se desprenden los embriones en mango y en cítricos, indica que posiblemente el desarrollo de éstos no es igual dentro del óvulo.

Estas observaciones son importantes porque muestran el distinto comportamiento entre especies poliembriónicas, siendo incorrecto generalizar los procesos de cítricos a otros frutales, como se ha hecho hasta ahora.

Entre los embriones de cada semilla, se pudo observar gran variabilidad en tamaño (CV = 101.7 para peso) y forma (CV = 46.8 para largo, y CV = 74.9 para ancho), no sólo entre cultivares, sino también respecto a la posición que ocupan en la semilla (1, 2,...n) (Figura 23; Cuadro 10).

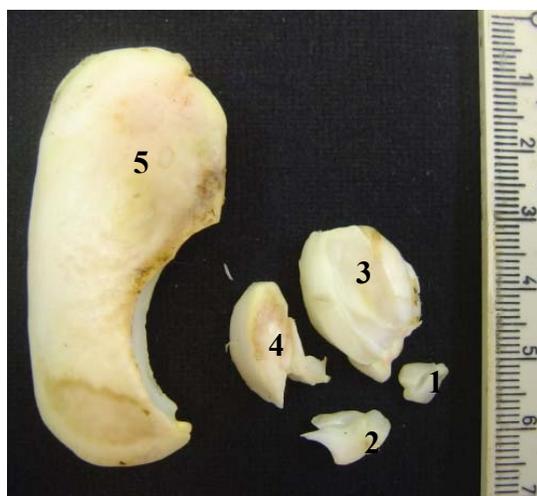


Figura 23. Diferencia de tamaño de cinco embriones de una semilla de mango cv. Ataulfo.

No se encontraron diferencias estadísticas en tamaño y forma de embriones en los cvs. Manila y Ataulfo (Cuadro 10), debido probablemente a la variabilidad que existió entre ellos.

Cuadro 10. Comparación de medias para peso, largo y ancho de embriones, de acuerdo a su posición en la semilla, de mango cvs. Manila y Ataulfo.

Cultivar	Posición del embrión	Características del embrión		
		Peso (mg)	Largo (mm)	Ancho (mm)
Manila	1 ¹	2 159.00 a	25.53 a	14.55 a
	2 ²	875.85 a	19.23 a	15.46 a
	3 ³	3 733.08 a	34.18 a	17.36 a
	4 ⁴	3 595.62 a	35.46 a	15.59 a
	Promedio para Manila	2 373.60	27.22	15.67
Ataulfo	1 ⁵	2 002.94 a	27.41 a	17.12 a
	2 ⁶	1 772.13 a	24.73 a	13.40 a
	3 ⁷	5 663.08 a	49.50 a	23.43 a
	4 ⁸	3 940.00 a	40.10 a	18.40 a
	Promedio para Ataulfo	3 051.60	31.97	17.83
CV		101.70	46.82	74.93

Número de embriones analizados: ¹ = 20, ² = 19, ³ = 16, ⁴ = 9, ⁵ = 17, ⁶ = 14, ⁷ = 13, ⁸ = 2. Valores con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

En el cv. Manila hubo hasta 7 embriones, y en Ataulfo hasta 5, pero no se incluyen en los Cuadros 10 y 11 porque no contaban con las repeticiones necesarias para efectuar la comparación estadística.

Al realizar el análisis mediante diseño bifactorial con los tratamientos cultivar y posición del embrión (Cuadro 10), no se encontraron diferencias estadísticas; pero al analizar únicamente el efecto de la posición del embrión, si se encontraron diferencias. En el Cuadro

11 se puede observar que los embriones ‘3’ y ‘4’ son los de mayor peso y largo, mientras que el ‘1’ y ‘2’ son los de menor peso y largo. Koltunow *et al.* (1996) observaron en *Citrus volkameriana* que el embrión localizado en el extremo calazal comúnmente era el más grande y ocupaba hasta un tercio de la semilla, y que los embriones decrecían en tamaño conforme se acercaban al extremo micropilar. El incremento de tamaño de los embriones ‘3’ y ‘4’ (ubicados generalmente en el extremo calazal) con respecto a los embriones ‘1’ y ‘2’ (extremo micropilar), posiblemente se deba a que tienen mayor disponibilidad de los nutrientes de la nucela y endospermo en la región calazal que en la micropilar (Ribeiro *et al.*, 1999; Batygina y Vinogradova, 2007). La disponibilidad de nutrientes también influye en el desarrollo de los embriones (Batygina y Vinogradova, 2007).

Cuadro 11. Comparación de medias para peso, largo y ancho de embriones de acuerdo a su posición en la semilla de mango.

Posición del embrión	Características del embrión		
	Peso (mg)	Largo (mm)	Ancho (mm)
1 ¹	2 087.30 bc	26.40 b	15.73 a
2 ²	1 256.50 c	21.56 b	14.59 a
3 ³	4 598.30 a	38.80 a	20.08 a
4 ⁴	3 658.20 ab	36.30 a	16.10 a
DMS	1 766.00	8.92	8.00
CV	102.00	47.21	74.33

Número de embriones analizados por posición: ¹ = 37, ² = 33, ³ = 29, ⁴ = 11. Valores con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). DMS: Diferencia mínima significativa.

Las diferencias de tamaño y forma de los embriones es ocasionada por la competencia de espacio durante el desarrollo de la semilla, originando el efecto de ‘empaquetamiento’, tal como lo reportaron Kulonow (1993) en cítricos, Costa *et al.* (2004) en *Tabebuia ochracea* (Bignoniaceae), y Parisot (1988) en mango.

El peso del embrión '3' mostró correlación negativa con el número de embriones por semilla ($r = -0.703$, $p \leq 0.01$), los otros embriones no presentaron correlación. En consecuencia, el tamaño del embrión '3' disminuirá si se presenta mayor número de embriones en la semilla (4, 5, 6 o 7). En estudios de poliembrionía en *C. volkameriana*, Andrade-Rodríguez *et al.* (2004) encontraron correlación negativa entre el tamaño de los embriones y el número de embriones por semilla, pero no determinaron la relación con la posición de los embriones.

No se encontró correlación entre el cultivar y la posición del embrión, con las características del eje embrionario y los cotiledones. Sin embargo, hubo diferencias estadísticas de peso y largo entre los ejes embrionarios en 'Manila' y 'Ataulfo', y en las diferentes posiciones de los embriones en la semilla. (Cuadro 12).

Cuadro 12. Comparación de medias para peso, largo y ancho de ejes embrionarios en embriones de mango cvs. Manila y Ataulfo.

Cultivar	Posición del embrión	Características de ejes embrionarios		
		Peso (mg)	Largo (mm)	Ancho (mm)
Manila	1 ¹	2.642 b	2.740 abc	1.591 a
	2 ²	1.481 b	2.391 bc	1.352 a
	3 ³	2.515 b	1.975 bc	1.462 a
	4 ⁴	4.528 ab	4.629 ab	2.787 a
Ataulfo	2 ⁵	2.107 b	3.514 abc	2.421 a
	3 ⁶	11.724 a	6.563 a	3.415 a
	DMS	8.383	4.054	3.380
	CV	122.085	94.948	84.371

Número de embriones analizados por posición: ¹ = 17, ² = 15, ³ = 13, ⁴ = 13, ⁵ = 9, ⁶ = 11. Valores con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). DMS: Diferencia mínima significativa.

El largo que tenga el embrión puede influir en su peso ($r = 0.450$, $p \leq 0.01$), así como en el peso del eje embrionario ($r = 0.502$, $p \leq 0.01$). Lo que indica que si el embrión es más largo, tendrá un eje embrionario proporcional a su tamaño.

El par de cotiledones presentes en semillas monoembriónicas de los cvs. Manila y Ataulfo usualmente fueron complementarios (dato no reportado), aunque se observó irregularidad en su formas. Pero si la semilla era poliembriónica, generalmente el par de cotiledones no fue semejante, como lo señalaron Arndt (1935), Parisot, (1988) y Mo *et al.* (2005) en mango.

El par de cotiledones de los embriones de los cvs. Manila y Ataulfo frecuentemente mostró desigualdades marcadas en tamaño, hasta 90 % en peso (Figura 19.b). En el Cuadro 13 se aprecia como la diferencia entre los cotiledones del embrión ‘3’ de ‘Ataulfo’ fue superior a la de los cotiledones de los embriones ‘1’, ‘2’ y ‘3’ de ‘Manila’ y a la posición ‘1’ y ‘2’ de ‘Ataulfo’. No hubo diferencia estadística para largo y ancho de cotiledones en ninguna de las posiciones de los embriones.

Cuadro 13. Comparación de medias de las diferencias de peso, largo y ancho entre el par de cotiledones en los embriones de mango cvs. Manila y Ataulfo.

Cultivar	Posición del embrión	Diferencia entre cotiledones (C1 - C2)		
		Peso (mg)	Largo (mm)	Ancho (mm)
Manila	1 ¹	1 043.118 b	13.935 a	9.123 a
	2 ²	922.859 b	9.875 a	9.250 a
	3 ³	1 377.690 b	13.650 a	6.402 a
Ataulfo	1 ⁴	795.522 b	15.061 a	12.769 a
	2 ⁵	854.241 b	6.487 a	13.624 a
	3 ⁶	2 936.609 a	15.164 a	10.600 a
	DMS	918.162	8.774	7.298
	CV	117.486	141.118	136.645

Número de embriones analizados por posición: 1 = 17, 2 = 16, 3 = 14, 4 = 13, 5 = 8, 6 = 11. Valores con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey, p≤0.05). C1: Cotiledón mayor (uno); C2: Cotiledón menor (dos). DMS: Diferencia mínima significativa.

En ambos cultivares, hubo correlación positiva entre el peso y largo del embrión, con el peso y largo de cada uno de los dos cotiledones (C1: r = 0.481, p≤0.01 para peso, y r = 0.901, p≤0.01 para largo; C2: r = 0.458, p≤0.01 para peso, y r = 0.497, p≤0.01 para largo). Las

correlaciones anteriores se presentaron porque el cuerpo del embrión lo conforman los cotiledones. La correlación del largo del embrión con el largo del cotiledón '1' (C1) fue mayor que la correlación con largo del cotiledón '2' (C2), ya que se consideró al cotiledón más grande como 'C1'.

En plantas poliembriónicas la capacidad de germinación está asociada al tamaño de ambos cotiledones o tamaño del embrión (Parisot, 1988; Villegas y Andrade, 2008), pero no se ha reportado falta de germinación o desarrollo de la plántula originado por la diferencia de tamaño entre el par de cotiledones (Mendes-da-Glória *et al.*, 2001; Martínez-Gómez *et al.*, 2004). En este trabajo, se obtuvieron plántulas *in vitro* de embriones de la posición '1' hasta '6', lo que significa que la diferencia en el tamaño del par de cotiledones observada entre los diferentes embriones no fue limitante para la germinación. No obstante, el tamaño del embrión sí afecta su germinación, ya que al sembrar *in vivo* la semilla se obtuvieron de una a tres plántulas a partir de semillas que tenían hasta seis embriones. Al cultivar *in vivo* la semilla, posiblemente los embriones pequeños no germinaron por no tener las reservas suficientes, por sufrir deshidratación (Andrade-Rodríguez *et al.*, 2005) o por la competencia de espacio con el resto de los embriones.

4.2 Poliembrionía

El porcentaje de poliembrionía fue similar en ambos cultivares, ‘Manila’ presentó 97.5 % y ‘Ataulfo’ tuvo 95 %. No hubo diferencias estadísticas en el promedio de embriones por semilla (NES); sin embargo, ‘Manila’ mostró hasta 7 embriones, mientras que ‘Ataulfo’ tuvo hasta 5. Ambos cultivares tuvieron de 2 a 4 embriones en más de 80 % de las semillas (Cuadro 14).

Cuadro 14. Porcentaje de semillas con diferente número de embriones en mango cvs. Manila y Ataulfo.

Cultivar	Semillas con determinado número de embriones (%)							P	NES
	1	2	3	4	5	6	7		
Manila ¹	2.5	22.5	30.0	30.0	10.0	2.5	2.5	97.5	3.4 a
Ataulfo ¹	5.0	25.0	30.0	25.0	15.0	0	0	95.0	3.2 a
DMS									0.5
CV									37.8

n¹ = 100 semillas de cada cultivar. Valores con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey, p≤0.05). P: Porcentaje de semillas poliembrionías. NES: Número de embriones por semilla. DMS: Diferencia mínima significativa.

No se encontraron reportes previos respecto a la poliembrionía y número de embriones en los cvs. Manila y Ataulfo. Mo *et al.* (2005) reportan que el cv. Carabao, genéticamente similar ‘Manila’, tuvo 96.2 % de poliembrionía.

Las diferencias de grado de poliembrionía y número de embriones por semilla entre ambos cultivares, pudo originarse por la genética de cada cultivar, factores que afectaron la polinización, estado nutricional y fisiológico, edad de la planta, desarrollo de la semilla, la carga de frutos, entre otros; tal como se ha observado en cítricos (Soares-Filho *et al.*, 1995; Andrade-Rodríguez *et al.*, 2004).

La presencia de alto grado de poliembrionía y número de embriones por semilla en mango, posiblemente es una estrategia para compensar la baja conversión de flores a fruto (Galán, 1999); así como sucede en *Tabebuia ochracea* (Bignoniaceae) (Costa *et al.*, 2004) o en cítricos (Galván-Luna *et al.*, 2009).

En el Cuadro 15 se muestra que el número de embriones en los cvs. Manila y Ataulfo, se correlacionó positivamente con el peso del fruto, pero no con el largo y ancho del mismo. En ambos cultivares el número de embriones tuvo correlación altamente significativa con el peso de la semilla con endocarpo. Para las demás características, aún cuando hubo correlación, no fue consistente en los dos cultivares. En ‘Manila’ el peso de la semilla mostró correlación alta con el número de embriones, mientras que, en ‘Ataulfo’ fueron el largo de la semilla con endocarpo, y el largo y ancho de la semilla.

Cuadro 15. Correlación de características de frutos, semillas con endocarpo y semillas con el número de embriones por semilla, en mango cvs. Manila y Ataulfo.

Característica		Número de embriones	
		Manila ¹	Ataulfo ¹
Fruto	Peso (g)	0.422 *	0.346 *
	Largo (cm)	0.210 NS	-0.070 NS
	Ancho (cm)	0.113 NS	-0.112 NS
Semilla con endocarpo	Peso (g)	0.546 **	0.802 **
	Largo (cm)	0.505 *	0.778 **
	Ancho (cm)	0.464 *	0.329 *
Semilla	Peso (g)	0.545 **	0.319 *
	Largo (cm)	0.411 *	0.746 **
	Ancho (cm)	0.158 NS	0.798 **

n¹ = 40 frutos de cada cultivar. *Significativo (p≤0.05), **Altamente significativo (p≤ 0.01).

Como en ambos cultivares hubo correlación positiva alta entre el número de embriones y peso de la semilla con endocarpo; se determinó que en ‘Manila’ las semillas con endocarpo de

13 a 18 g tuvieron mayor número de embriones (3.4); mientras en Ataulfo, las semillas con peso mayor o igual a 19 g tuvieron 3.2 embriones (Cuadro 16).

Cuadro 16. Número de embriones en semillas con endocarpo de diferente peso, en mango cvs. Manila y Ataulfo.

Peso de semilla con endocarpo (g)	Número de embriones	
	Manila ¹	Ataulfo ¹
≤6.0	2.0	1.5
7.0 – 12.0	3.3	3.0
13.0 – 18.0	3.4	3.0
≥19.0	–	3.2

n¹ = 40 semillas de cada cultivar.

Aunque no hubo correlación alta entre el peso del fruto con el número de embriones (Manila, $r = 0.422$ $p \leq 0.05$, y Ataulfo $r = 0.346$ $p \leq 0.05$); se observó que los frutos de ‘Manila’ de 141 a 160 g tuvieron las semillas con mayor número de embriones (3.4); lo mismo se presentó en frutos de ‘Ataulfo’ con peso mayor o igual 201 g (3.3 embriones).

Por lo tanto, se recomienda utilizar semillas con endocarpo grandes para propagación vegetativa. Porque al aumentar el número de embriones en la semilla, se incrementa la competencia entre embriones y la posibilidad de que degenere el embrión cigótico, tal como se ha observado en cítricos (Soares-Filho *et al.*, 2002; Darlan *et al.*, 2006) o en *Tabebuia ochracea* (Bignoniaceae) (Costa *et al.*, 2004).

En los cítricos *C. volkameriana* y *C. amblycarpa*, Andrade-Rodríguez (2002) no encontró correlación entre las características del fruto con la poliembrionía, pero reportó que hubo correlación negativa entre el número de embriones por semilla y su tamaño. En los cvs. Manila y Ataulfo, a diferencia de los cítricos, si hubo correlación entre peso del fruto y número de embriones por semilla; además, al incrementar el número de embriones por semilla se afectará sólo el tamaño del embrión ‘3’ ($r = - 0.703$, $p \leq 0,01$) (Cuadro 17). Con base en lo

anterior, se deduce que no habrá el mismo comportamiento de poliembrionía entre géneros, especies, y tampoco entre cultivares, tal como se observó en esta investigación.

Cuadro 17. Correlación de características de cada embrión con el número de embriones por semilla, en mango cvs. Manila y Ataulfo.

Cultivar	Posición del embrión	Características del embrión		
		Peso (mg)	Largo (mm)	Ancho (mm)
Manila	1 ¹	-0.205 NS	-0.513 *	-0.206 NS
	2 ²	-0.078 NS	0.191 NS	0.358 NS
	3 ³	-0.653 **	-0.725 **	-0.719 **
Ataulfo	1 ⁴	-0.166 NS	-0.191 NS	-0.152 NS
	2 ⁵	-0.553 *	-0.462 NS	-0.522 NS
	3 ⁶	-0.703 *	-0.498 NS	-0.838 **

Número de embriones analizados por posición: ¹ = 17, ² = 15, ³ = 13, ⁴ = 13, ⁵ = 9, ⁶ = 11. *Significativo ($p \leq 0.05$), **Altamente significativo ($p \leq 0.01$).

En mango, ningún trabajo previo había relacionado las características de los embriones con la poliembrionía. Esta variable es importante porque el tamaño del embrión se relaciona con su capacidad de germinación (Parisot, 1988).

4.3 Cultivo de embriones *in vitro*

Por ser Manila y Ataulfo cultivares con alta poliembrionía, se recomienda que las semillas se cultiven *in vitro* para incrementar la germinación de embriones, incluyendo al cigótico (Soares-Filho *et al.*, 2002; Andrade *et al.*, 2004; Pérez-Tornero y Porras, 2008). Porque al tener mayor número de embriones por semilla, aumenta la competencia por espacio y nutrientes, originando la reducción de tamaño de los embriones y la capacidad para germinar *in vivo* (Parisot, 1988; Kultonow, 1993; Batygina y Vinogradova, 2007).

Ambos cultivares tuvieron el mismo porcentaje de germinación de semilla *in vitro*, y aún cuando el número de plántulas obtenidas por semilla no fue el mismo, no hubo diferencias estadísticas (Cuadro 18).

Cuadro 18. Porcentaje de germinación y número de plántulas por semilla de mango cvs. Manila y Ataulfo, establecidas *in vitro*.

Cultivar	Geminación (%)	Plántulas / semilla
Manila ¹	95.00	2.8 a (1-6) ^y
Ataulfo ²	95.00	2.5 a (1-5) ^y
DMS		0.53
CV		44.89

n¹ = 80 semillas de cada cultivar. Valores con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey, p≤0.05). Y: Número mínimo y máximo de plántulas que desarrollan por semilla. DMS: Diferencia mínima significativa.

Si se compara con la germinación *in vivo*, donde desarrollaron 1.4 plántulas por semilla en ‘Manila’ y 1.6 plántulas en ‘Ataulfo’, el cultivo *in vitro* favoreció la germinación de embriones. No obstante, el número de embriones germinados *in vitro* (plántulas) fue menor que el número de embriones por semilla (3.4 embriones en Manila y 3.2 embriones en Ataulfo). Probablemente estos resultados se deban a que en algunas semillas los embriones sufrieron deshidratación durante el manejo de desinfección y obtención del explante, o a la

existencia de embriones inmaduros en la semilla incapaces de germinar (Kultonow *et al.*, 1996; Costa *et al.*, 2004). También puede estar relacionado con la dificultad para separar los embriones en mango, ya que al mantenerse unidos siguió existiendo la competencia por espacio que impidió su germinación.

El cv. Ataulfo se adaptó mejor a las condiciones *in vitro* que el cv. Manila, ya que el primero tuvo 75 % de semillas con todos los embriones germinados; mientras que, en ‘Manila’ en 60 % de las semillas germinaron todos los embriones.

No se encontraron diferencias estadísticas de los días a germinación entre embriones de distintas posiciones en ambos cultivares (Cuadro 19).

Cuadro 19. Porcentaje y tiempo de germinación de embriones de mango cvs. Manila y Ataulfo, establecidos *in vitro*.

Cultivar	Posición	Germinación (%)	Tiempo de germinación (días)
Manila	1 ¹	85.00	5.75 a
	2 ²	78.95	5.34 a
	3 ³	88.00	7.12 a
	4 ⁴	87.00	5.44 a
Ataulfo	1 ⁵	86.49	4.41 a
	2 ⁶	88.89	3.58 a
	3 ⁷	89.47	4.22 a
	4 ⁸	88.00	3.22 a
DMS			5.20
CV			76.85

Número de embriones analizados: ¹ = 40, ² = 38, ³ = 26, ⁴ = 9, ⁵ = 37, ⁶ = 36, ⁷ = 18, ⁸ = 9. Valores con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). DMS: Diferencia mínima significativa.

Al analizar únicamente el efecto del tratamiento ‘cultivar’, se encontraron diferencias significativas entre días a germinación: 5.9 para ‘Manila’, y 4.0 para ‘Ataulfo’ (Tukey,

p≤0.05). Mostrando que los embriones del cv. Ataulfo germinaron más rápido, al adaptarse mejor a las condiciones *in vitro*.

En ambos cultivares, la germinación *in vitro* fue más rápida que *in vivo* (los embriones tardaron más de 35 días en germinar), porque el medio de cultivo y el microambiente ofreció a los embriones condiciones adecuadas de humedad y temperatura (24 °C ±1). Tal como lo señaló Parisot (1988), la temperatura entre 25–40 °C y la humedad alta favorecen la germinación hasta 100 % de las semillas. En el Cuadro 19 se aprecia como más de 78 % de los embriones germinan en condiciones *in vitro*, en menos de siete días.

No se encontró correlación significativa entre cultivar, posición del embrión, y tamaño del embrión, con los días a germinación y germinación de embriones. Sin embargo, en el Cuadro 20 se muestra como los embriones chicos (< 1 cm) tuvieron menor porcentaje de germinación que el resto de los embriones.

Cuadro 20. Porcentaje y tiempo de germinación de embriones de diferente tamaño de mango cvs. Manila y Ataulfo, establecidos *in vitro*.

Cultivar	Tamaño del embrión	Germinación (%)	Tiempo de germinación (días)
Manila	Grande (>3 cm) ¹	87.00	5.32 a
	Mediano (3-1 cm) ²	88.00	6.71 a
	Chico (<1 cm) ³	33.33	2.50 a
Ataulfo	Grande (>3 cm) ⁴	89.50	3.52 a
	Mediano (3-1 cm) ⁵	76.92	3.88 a
	Chico (<1 cm) ⁶	53.33	3.07 a
DMS			4.81
CV			86.25

Número de embriones analizados: ¹ = 97, ² = 14, ³ = 6, ⁴ = 64, ⁵ = 26, ⁶ = 15. Valores con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey, p≤0.05). DMS: Diferencia mínima significativa.

A pesar de que esta investigación es la primera en propagar *in vitro* embriones de los cvs. Manila y Ataulfo, se obtuvieron buenos resultados en la germinación de embriones y desarrollo de las plántulas (Figura 24).

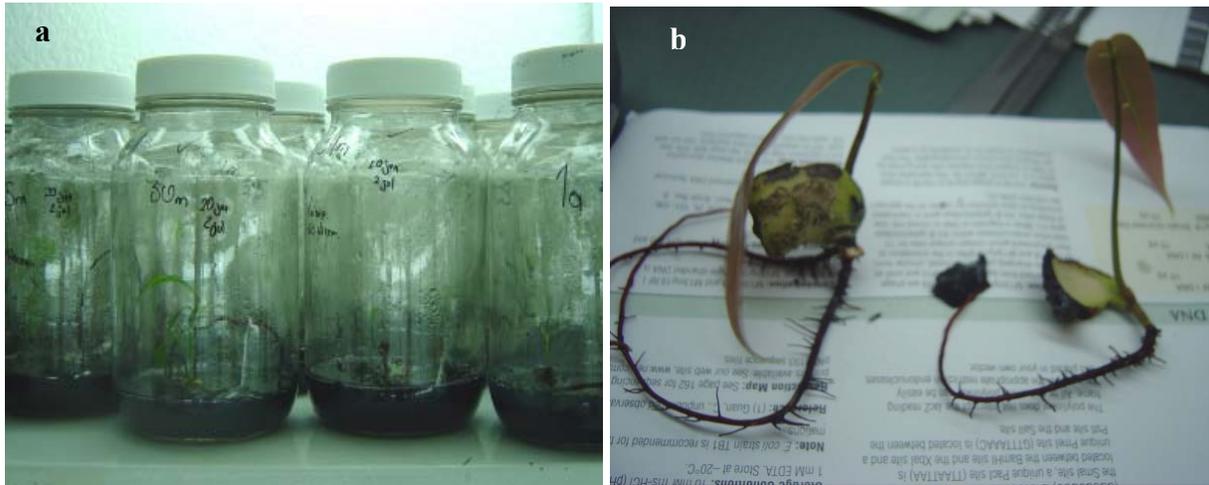


Figura 24. Plántulas desarrolladas *in vitro* (a); Subcultivo y separación de plántulas en mango cv. Manila (b).

En todas las plántulas de ambos cultivares que desarrollaron *in vitro*, se observó que la raíz creció más que el tallo y hojas (Figura 24.b); sin embargo, esta característica no impidió un desarrollo adecuado posterior al trasplante a invernadero. Donde el 91 % de las plántulas que tenían más de 8 cm, 3 hojas expandidas y sin malformaciones, sobrevivieron al trasplante, continuaron creciendo y produciendo hojas.

4.4 Cultivo de semillas en invernadero

En invernadero los porcentajes de germinación de semillas fueron altos, 95 % en ‘Manila’ y 90 % en ‘Ataulfo’; sin embargo, en 53 % de las semillas de ambos cultivares sólo emergió una plántula, en 46 %, dos plántulas, y en el resto 3 plántulas. Mientras que, *in vitro* la germinación fue de 95 % para ambos cultivares y se obtuvieron de 2 a 5 plántulas en 91 % de las semillas (Cuadro 21).

Cuadro 21. Porcentaje y tiempo de germinación, y número de plántulas que desarrollan por semilla de mango cvs. Manila y Ataulfo, establecidas en invernadero.

Cultivar	Germinación (%)	Tiempo de germinación (días)	Plántulas / semilla
Manila ¹	95	35.87 a	1.33 a (1-3) ^y
Ataulfo ²	90	36.94 a	1.35 a (1-3) ^y
DMS		7.17	0.49
CV		39.00	50.61

n¹ = 80 semillas de cada cultivar. Valores con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey, p≤0.05). Y: Número máximo y mínimo de plántulas que desarrollan por semilla. DMS: Diferencia mínima significativa.

El porcentaje de germinación de semillas en ‘Manila’ fue superior al 54 % reportado por Barbosa *et al.* (2009) para este cultivar. La diferencia entre resultados posiblemente se debió al tipo de sustrato empleado. Barbosa *et al.* (2009) utilizaron vermiculita saturada con agua, mientras que, en este trabajo se empleó Grow-mix[®], que mantuvo la humedad por el peat-moss y permitió la aireación por la perlita y la fibra. Otros factores que influyeron pudieron ser las condiciones de temperatura, humedad, o el tratamiento previo a la siembra de las semillas.

La técnica de propagación empleada, *in vitro* o *in vivo*, tuvo correlación alta y significativa con los días de germinación (r = 0.854, p≤0,01); ya que la germinación de embriones *in vitro* requirió de 3 a 7 días, siendo más rápida que en invernadero, donde

necesitó más de 30 días. También hubo correlación entre la técnica de cultivo y el número de plántulas que emergen por semilla ($r = 0.456$, $p \leq 0,01$).

En invernadero, el número de plántulas por semilla fue inferior al obtenido *in vitro*, debido a la competencia por espacio y nutrientes que generalmente impide que los embriones más pequeños germinen *in vivo* por no tener reservas suficientes (Parisot, 1988; Kultonow, 1993; Batygina y Vinogradova, 2007). Mientras que, al cultivar *in vitro* los embriones disponen de medio nutritivo rico en azúcares, que fue favorable para la germinación, y de condiciones de humedad y temperatura constantes (aspecto que no es posible mantener en *in vivo*).

De las plántulas que emergen por semilla en invernadero, las más vigorosas fueron las primeras, y las que mostraron menor desarrollo fueron las que emergen al final (Cuadro 22). Coincidiendo con lo reportado en mangos poliembriónicos por Degani *et al.* (1993) (Turpentine, ‘13-1’ y ‘Turpentine x 13-1’) y por Barbosa *et al.* (2009) (cvs. Haden y Manila), quienes encontraron correlación positiva significativa entre el orden de emergencia de las plántulas y el peso de la misma. Avilán *et al.* (1995) relacionaron el tamaño que tienen los embriones de mango con la velocidad de emergencia de las plántulas, y señalan que la plántula que emerge primero pudo provenir del embrión más grande.

Cuadro 22. Tiempo de germinación de embriones en invernadero, según el orden de aparición de cada plántula (primera, segunda o tercera), de mango cvs. Manila y Ataulfo.

Cultivar	Tiempo de germinación (días)		
	Primera plántula	Segunda plántula	Tercera plántula
Manila ¹	32.69 a	46.82 a	49.00 a
Ataulfo ²	34.11 a	47.64 a	54.50 a
DMS	4.88	13.57	16.51
CV	21.91	30.57	26.52

¹ n = 80 semillas de cada cultivar. Valores con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). DMS: Diferencia mínima significativa.

El sembrar las semillas con la parte ‘aplanada’ de forma paralela al sustrato, permitió que las plántulas que emergieron de la semilla no se ‘enroscaran’ o estorbaran por el crecimiento de las otras plántulas. La mayoría de las plántulas mostraron buen desarrollo (Figura 25).



Figura 25. Plántulas de mango cv. Manila desarrolladas en invernadero

4.5 Identificación de plántulas cigóticas y nucelares mediante RAPD

4.5.1 Determinación de la calidad y concentración de ADN genómico

En las investigaciones donde se han empleado marcadores moleculares en mango, para la extracción de ADN se emplean de 0.25 a 5 g de tejido de ‘hoja’ joven (Schnell *et al.*, 1995; Yamanaka *et al.*, 2006; Saldaña y Salazar, 2007). Pero en este trabajo para la extracción de ADN, se emplearon de: 80 - 100 mg de hoja joven (de plántulas mantenidas *in vitro* y transplantadas a invernadero), 150 mg de hoja madura (planta madre), 150 mg de raíz, 100 mg de tallo y 100 mg de toda la plántula (*in vitro*). De todas las muestras se logró obtener ADN de buena calidad para realizar PCR (Figura 26), aunque la cantidad fue variable (Cuadro 23).

Cuadro 23. Lecturas de calidad y concentración de ADN (ng μL^{-1}) extraído de diferentes tejidos, de mango cvs. Manila y Ataulfo.

Material vegetal	Cultivar	Rango de absorbancia 260/280	Rango de concentración (promedio)
Hoja joven	Manila	1.9 – 2.1	44.3 – 3093.5 (1241.2)
	Ataulfo	1.9 – 2.1	42.0 - 3620.7 (866.4)
Hoja madura	Manila	2.1	1128.8 – 1611.3 (1370.1)
	Ataulfo	2.1	1548.5 – 1756.8 (1652.7)
Raíz (<i>in vitro</i>)	Manila	Sin muestra	Sin muestra
	Ataulfo	1.4 – 1.7	30.7 - 202.6 (555.4)
Tallos con hoja (<i>in vitro</i>)	Manila	2.1	382.7 – 569.4 (464.0)
	Ataulfo	1.9 – 2.1	37.3 – 462.8 (189.3)
Toda la planta (<i>in vitro</i>)	Manila	Sin muestra	Sin muestra
	Ataulfo	1.9	98.9

Comúnmente para la obtención de ADN se recomienda emplear tejido joven en lugar de tejido maduro (García-Mas *et al.*, 2000), por tener más células parenquimatosas con actividad meristemática (divisiones celulares) (Esau, 1982); sin embargo, en este trabajo la mayor cantidad de ADN se extrajo de hojas maduras. Ravishankar *et al.* (2000) y Vasanthaiah (2009) también lograron buenos resultados al emplear tejido de hojas maduras de mango.

La concentración del ADN obtenido de tejido foliar generalmente no varío si la cantidad de muestra empleada era constante, como también lo reportaron Stein *et al.* (2001). La concentración del ADN extraído de raíz y tallo tuvo valores bajos, posiblemente por la cantidad de células de esclerénquima asociadas al tejido vascular, la epidermis y tejido leñoso (la raíces presentan una dermis gruesa tipo leñosa), y estas células pueden o no tener protoplasto (Esau, 1982).

El ADN extraído de hojas mostró la mejor calidad con relación longitud de onda 260/280 de 1.9 a 2.1, lo que indica alto grado de pureza. Mientras que, al emplear raíces se obtuvieron valores de 1.4 – 1.7, posiblemente debido a la presencia de proteínas u otros elementos absorbentes de la luz UV (CIMMYT, 2005); no obstante, como la técnica de RAPD no requiere necesariamente ADN de alta calidad (1.8-2.0) (Valadez y Kalh, 2005), el ADN obtenido con este tipo de tejido fue empleado.

En todas las plántulas de los cvs. Manila y Ataulfo desarrolladas *in vitro* se mostró mayor crecimiento de la raíz que de la parte aérea, por lo tanto, se colectó tejido de raíces si el tejido foliar era insuficiente para la extracción de ADN, a pesar de que presentó menor calidad y concentración de ADN (Cuadro 23).

De las hojas desarrolladas *in vitro* se extrajeron entre 42.0 a 3093.3 ng μL^{-1} (en promedio 734.8 ng μL^{-1}) de ADN, mientras que, de las hojas desarrolladas en invernadero se obtuvieron entre 91.9 a 3620.7 ng μL^{-1} (en promedio de 1368.6 ng μL^{-1}). Esto se debió a que las hojas *in vivo* mostraron mayor crecimiento que las hojas *in vitro*, en consecuencia se tuvo mayor disponibilidad de tejido joven suficiente para completar las muestras (100 mg). Por lo tanto,

dependiendo del objetivo de la investigación, es preferible transplantar a invernadero las plántulas desarrolladas *in vitro* para extraer el ADN de las hojas.

El mango, al ser frutal, tiene muchos fenoles, peroxidasas y gran actividad de polifenol oxidasas que se expresan cuando se provoca algún daño (Krishna y Singh, 2007). No obstante, no se mostró oscurecimiento del tejido por oxidación por polifenoloxidasas a pesar de que no se empleo PVP en la extracción, como recomiendan Saldaña y Salazar (2007) en su estudio para extraer ADN de calidad para PCR en mango. Además, el alcohol isoamílico se sustituyó por 2-octanol, supliendo su función de agente antioxidante (González *et al.*, 1995).

Los resultados de la cuantificación de ADN en el espectrofotómetro coincidieron con lo observado en el gel de agarosa. Las muestras procedentes de hoja y tallo mostraron bandas nítidas, sin barrido por degradación, sin presencia de bandas de ARN (al final del carril) y sin contaminación por polisacáridos (arrastre o “smear”) (Figura 26). En el caso del ADN extraído de las raíces se observaron bandas con presencia de polisacáridos. Por lo tanto, se volvió a obtener el ‘pellet’ de las muestra de raíz y se resuspendieron en 30 μ L de 0.1 TE, posteriormente se centrifugó por 2 min a 10 000 rpm para concentrar de nuevo el ADN.

a5-2 a1-1 a2-3 a6-1 a3-4 a3-3 a3-4 a1-1 m3-1 m4-1 m7-1 m7-2 m8-1 m8-2 m8-3 m2-1 a4-1 a5-1

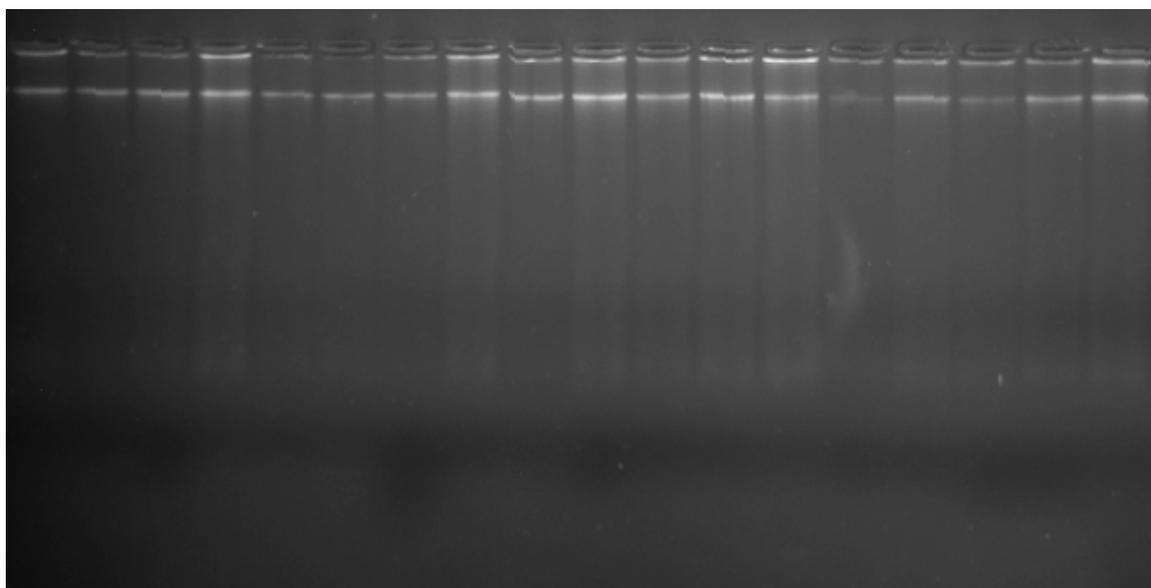


Figura 26. Fotografía de un gel de agarosa para determinar calidad de ADN de plántulas de mango cvs. Manila (m) y Ataulfo (a). Después de la letra del cultivar (‘a’ o ‘m’), el primer número indica la semilla y el segundo la plántula.

La metodología para extracción de ADN en los cvs. Manila y Ataulfo fue eficiente para obtener ADN de calidad y en cantidad necesaria para aplicar los marcadores RAPD.

4.5.2 Selección de iniciadores

De los 68 iniciadores para RAPD que se evaluaron (Serie A, B y C, Operon Technologies, Inc.; y SAP 01 a SAP 06, Invitrogen®) en la plántula de la semilla 8 embrión 3 de 'Manila' (m8-3), todos amplificaron los fragmentos de ADN. De estos, 32 tuvieron poca amplificación (menos de 6 bandas: OPA 06, OPA 16, OPB 02, OPB 09, OPB 19, OPC 02, OPC 03, SAP 06), y 8 presentaron bandas con poca nitidez (OPA 13, OPB 09, OPB 11, OPC 02, OPC 05, OPC 07, OPC 20, SAP 07) (Figura 27).

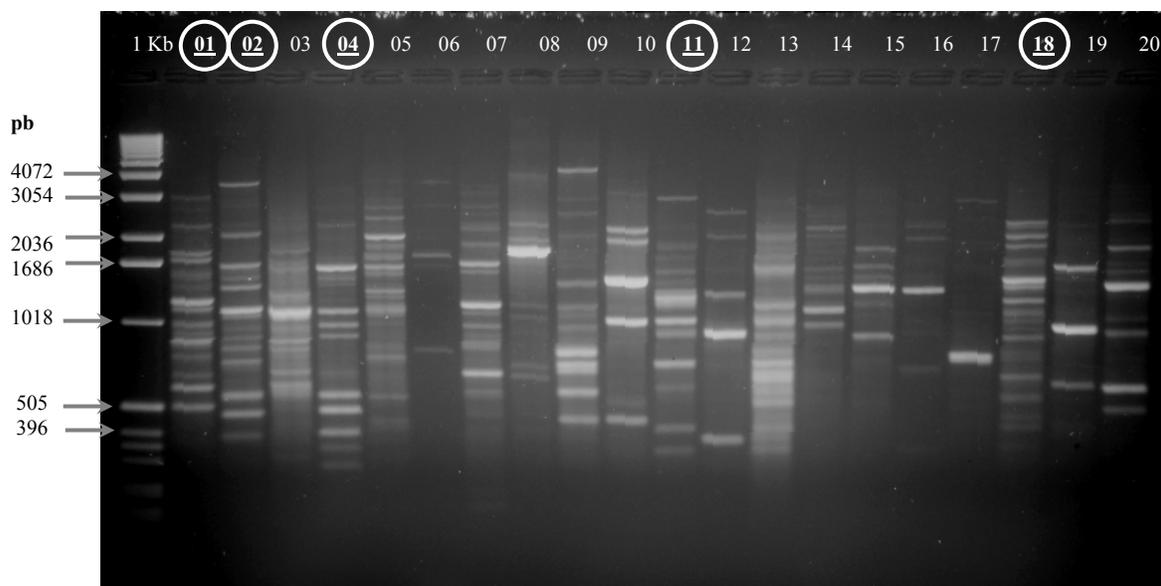


Figura 27. Patrón de banda producido por los iniciadores serie OPA-01 a 20 (Operon Technologies) en la plántula 8-3 de mango cv. Manila. Los iniciadores encerrados por un círculo fueron seleccionados. 1kb, escalera 1kb Gibco BRL.

Las iniciadores RAPD de las series OPA, OPB y OPC (Operon Technologies Inc.) son de los más empleados en *Mangifera indica* L. (Ahmad Rajwana *et al.*, 2008; Ravishankar *et al.*, 2000; Schnell *et al.*, 1995); así como en otras especies de anacardiáceas: *Anacardium occidentale* L. (Archak *et al.*, 2003) y pistache (*Pistacia* spp.) (Al-Saguir y Porter, 2006). Para identificar las plántulas cigóticas y las nucelares en esta investigación, se seleccionaron 14

iniciadores de estas series por mostrar mayor número de bandas definidas y con mayor nitidez: OPA 01 (13 bandas), OPA 02 (14 bandas), OPA 04 (11 bandas), OPA 11 (12 bandas), OPA 18 (17 bandas), OPB 06 (10 bandas), OPB 07 (8 bandas), OPB 10 (9 bandas), OPB 12 (9 bandas), OPB 18 (13 bandas), OPC 14 (10 bandas), OPC 19 (12 bandas), SAP 01 (9 bandas) y SAP 04 (9 bandas).

Ninguno de los iniciadores amplificó un patrón de banda (todas las bandas) para cada uno de los dos cultivares, porque entre los cvs. Manila y Ataulfo hay similitudes genéticas. Este resultado coincide con lo reportado por Ahmad Rajwana *et al.* (2008) y Ravishankar *et al.* (2000) en estudios de diversidad genética en mango. En ‘Manila’ y ‘Ataulfo’ se presentó por lo menos una banda compartida o monomórfica en los patrones de banda por iniciador (Figura 28), debido a la relación genética entre ambos cultivares de hasta 60 – 68 % como lo indican Viruel *et al.* (2005) y Santos *et al.* (2008).

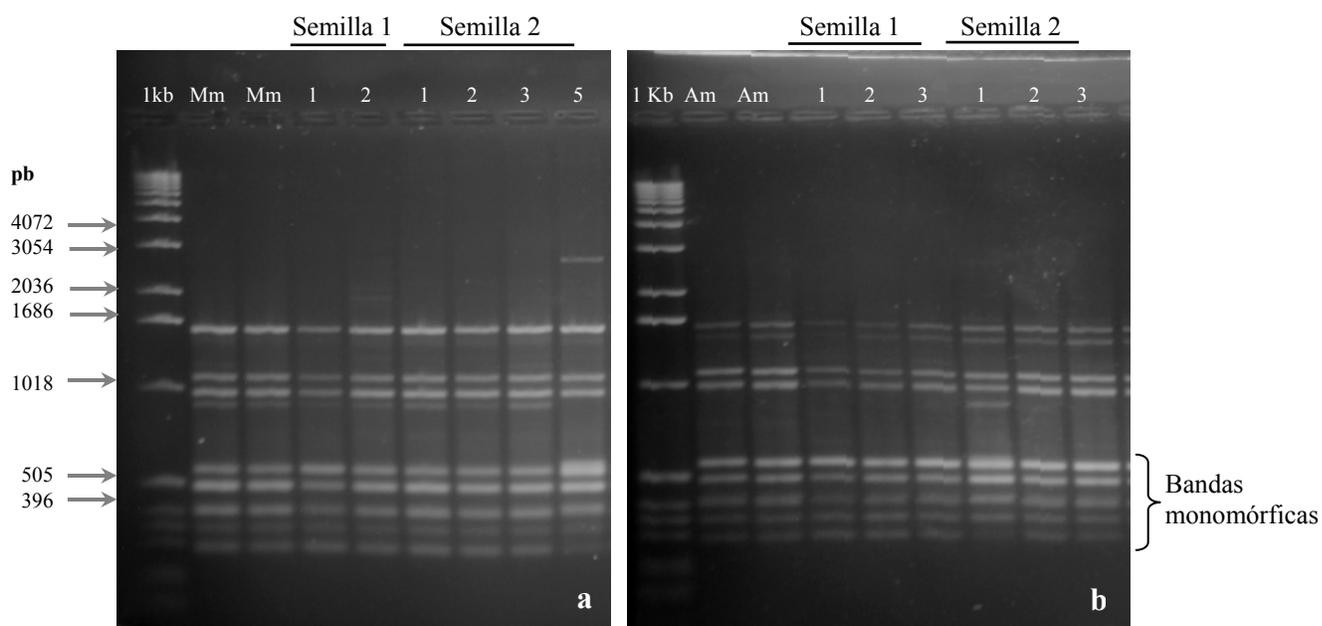


Figura 28. Amplificación de ADN (patrón de banda) producido por el iniciador OPA-04 (5' AATCGGGCTG 3') de plántulas de mango cvs. Manila (a) y Ataulfo (b). 1kb, escalera 1kb Gibco BRL. Mm: Planta madre de ‘Manila’. Am: Planta madre de ‘Ataulfo’. Números de bajo de las líneas corresponden a las plántulas de cada semilla.

4.5.3 Identificación del origen cigótico o nucelar de embriones en el cv. Manila

Los 14 iniciadores mostraron polimorfismo; en total se originaron 227 bandas, de las cuales 131 fueron polimórficas: 71 por presencia de bandas y 60 por ausencia de bandas. El promedio de bandas por iniciador fue de 16.21, siendo OPA-02 el que amplificó mayor número de bandas (24), y OPB-18 el que produjo menor número de bandas (9) (Cuadro 24).

Cuadro 24. Polimorfismo originado por 14 iniciadores RAPD en mango cv. Manila.

Iniciador	Total de bandas	Bandas polimórficas		Polimorfismo (%)
		Presencia	Ausencia	
OPA-01	18	4	4	44.4
OPA-02	24	9	3	50.0
OPA-04	19	7	8	78.9
OPA-11	23	11	6	73.9
OPA-18	18	3	8	61.1
OPB-06	10	2	6	80.0
OPB-07	23	10	2	52.2
OPB-10	15	3	4	46.7
OPB-12	19	6	3	47.4
OPB-18	9	2	2	44.4
OPC-14	13	4	3	53.8
OPC-19	13	1	3	30.8
SAP-01	12	6	5	91.7
SAP-04	11	3	3	54.5
Promedio	16.2	5.1	4.3	57.9

A pesar de que los iniciadores OPB-06 y SAP-01 amplificaron pocas bandas, más de 80 % de estas fueron polimórficas, identificando cuatro y siete plántulas cigóticas

respectivamente. Los iniciadores que identificaron mayor número de plántulas cigóticas (8), fueron OPA-04, OPA-11 y OPB-07.

El tamaño de los fragmentos polimórficos varió entre iniciadores (Schnell *et al.*, 1995) y entre las plántulas cigóticas (Cuadro 25 y Figura 29). El iniciador OPA-11 produjo la banda polimórfica más grande (3 383 pb) en la plántula de la semilla 6, embrión 5, y el iniciador OPB-07 amplificó la más pequeña (228 pb) en la plántula de la semilla monoembriónica 3M (Figura 29).

Los marcadores RAPD que detectaron mayor número de plántulas cigóticas (10), fueron bandas por ausencia de amplificación: OPA04₈₈₅ y OPC14₈₃₃. Así mismo, la plántula que fue identificada como cigótica por más iniciadores (10 iniciadores que producen 25 bandas polimórficas) fue la de la semilla monoembriónica 3M.

Ningún iniciador por si sólo pudo identificar a las 18 plántulas cigóticas, como también señala Ahmad Rajwana *et al.* (2008) al evaluar 45 iniciadores en 24 genotipos de mango. Sin embargo, para detectar a todos los embriones cigóticos se necesitaría combinar el patrón de banda producido por los iniciadores OPA-02, OPA-11, OPB-12, OPC-14 y SAP-01 (Cuadro 25).

Se analizaron 3 plántulas de semillas monoembriónicas del cv. Manila (1M, 2M y 3M). Sin embargo, sólo la plántula de la semilla 3M fue reconocida como cigótica por 10 iniciadores (OPA-01, OPA-02, OPA-04, OPA-11, OPA-18, OPB-06, OPB-07, OPB-10, OPB-12, SAP-04) (Figura 2). Las plántulas de las semillas monoembriónicas 1M y 2M fueron identificadas como nucelares por mostrar el mismo patrón de banda que la planta madre. Posiblemente no se detectó al cigoto porque degeneró o colapsó por la competencia de espacio y nutrientes entre los embriones (Sturrock 1967; Cordeiro *et al.*, 2006) y el embrión nucelar desarrollo libremente ocupando el lóculo de la semilla. Otra causa probable, es la que señala Andrade-Rodríguez *et al.* (2005) en plántulas no cigóticas de semillas monoembriónicas de *Citrus reshni* y Robinson, donde éstas pudieron haber sido sexuales pero con pocas diferencias de la planta madre.

Cuadro 25. Tamaño (pb) de los marcadores RAPD generados por 14 iniciadores que identificaron plántulas cigóticas de mango cv. Manila.

Plántula	Iniciador														Total de bandas polimórficas
	OPA 01	OPA 02	OPA 04	OPA 11	OPA 18	OPB 06	OPB 07	OPB 10	OPB 12	OPB 18	OPC 14	OPC 19	SAP 01	SAP 04	
m1-1									+667			-1132 -1046 -957			4
m1-2			+2124 +1957	+2036			+1550		+1607 +402						6
m2-2									+667						1
m2-3									+2354 -1173 +251						3
m2-5		-2115 +2028 - 568	+2657 - 885 + 582	+2732 -2053 +2036 -998		+1040 + 873	+2310 +681 -596				+2657 +1631	+697	-734		19
m3-3		+1951 +1787	- 885												3
m4-1	-1140 -1013 - 879 + 831 + 940	+1951 +787					+1499 +681						-1366 -994 -734 -810		13

Cuadro 25. Continuación.

m4-2			+2657 + 582	+2732	-1145 +1014 -993 +938 -908 -819	+1040 -1155	+2310	-827	-1261 -1173	-2465 -1145 +1014 -993 +938 -908 -819	+1248 +692			+565 +435	26
m4-3		+1747 -835 - 568													3
m5-2														-2224 -1560 -1000	3
m6-1		+1212 +1010 + 935					+1499 +1351 +681								6
m6-2			+3340 +1226 - 885 - 870	-3054 -2053 +2036 +1903 +1333 +1104 +596 -445	-1906 -1536 -1206 -1155 -597 -913		+1499 +681 +613	+2380 +416			-1916 -1328 -833		+2237 +1783 +1105		29
m7-1									-1261 -1173		-1328 -833				4
m7-2			-1503 -994 -885 -483 -391 -329 -273	+1116			+1550				-833				10

Cuadro 25. Continuación.

m8-2		+ 866		-3054 -2053 -1244 +1116 -998 +893 -117 -445			+1550 +727				-833		+709		13
m8-3								-2410			-1916 -833				3
m9-1		+ 866	+1836 +1226	+2732 +893				+2590 -2410					+1783 +1105 +956		10
m9-2			+1226	+2732											2

Polimorfismo: (+), presencia de banda; (-), ausencia de banda.

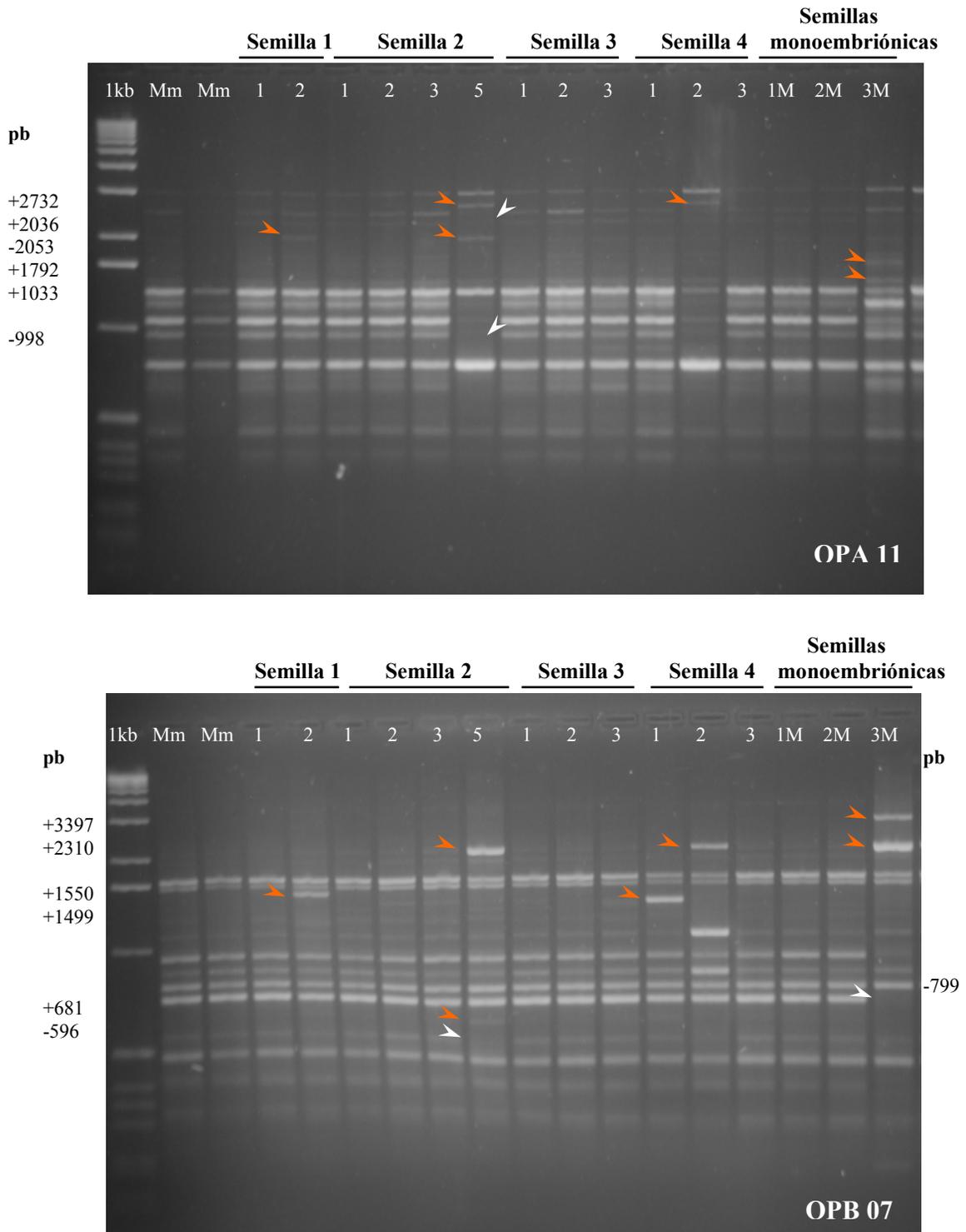


Figura 29. Amplificación de ADN de 17 plántulas de mango cv. Manila utilizando los iniciadores OPA-11 (5' CAATCGCCGT 3') y OPB-07 (5' GGTGACGCAG 3'). 1kb, escalera 1kb Gibco BRL. Mm: Planta madre. Números de bajo de las líneas corresponden a las plántulas de cada semilla. Las flechas indican fragmentos amplificados por presencia (→) o por ausencia (↔).

La plántula de la semilla 2, embrión 2, sólo amplificó con un iniciador; y la plántula de la semilla 9, embrión 2, sólo amplificó con dos iniciadores. Por lo tanto, su origen cigótico puede ser dudoso, como los refieren Novy *et al.* (1994) y Cordeiro *et al.* (2006), o indica que son plantas con genotipo muy semejante a la planta madre (Cordeiro *et al.*, 2006), o que los iniciadores empleados no pudieron detectar el *loci* que originaría una banda polimórfica.

4.5.4 Identificación del origen cigótico o nucelar de embriones en el cv. Ataulfo

Los 14 iniciadores generaron marcadores RAPD o bandas polimórficas en este cultivar (Cuadro 26). En total se originaron 182 bandas, de las cuales 94 fueron polimórficas: 39 por presencia de bandas y 55 por ausencia de bandas. El promedio de bandas por iniciador fue de 11.7. Mientras que, en ‘Manila’ el total de bandas fue mayor (227 bandas, con 131 polimórficas), con promedio de 16.2. Lo que muestra las diferencias genéticas entre ambos cultivares.

Los iniciadores OPA-11, OPB-10 y SAP-01 amplificaron el mayor número de bandas; pero solo OPA-02, OPA-11 y SAP-01 produjeron mayor porcentaje de polimorfismo (< 75 %). Los iniciadores OPB-06, OPC-19 y SAP-04 mostraron poca amplificación de bandas polimórficas. Al comparar resultados, en ‘Manila’ los iniciadores que produjeron mayor número de bandas polimórficas fueron los iniciadores OPB-06 y SAP-01.

El iniciador OPA-11 produjo la banda polimórfica más pequeña (270 pb) en las plántulas de la semilla 1, embrión 1, y la semilla 4, embrión 2; mientras que, con SAP-01 se obtuvo el fragmento polimórfico más grande (3081 pb) en las plántulas de la semilla 1 embrión 2, y en la semilla 7, embrión 2 (Cuadro 27).

Cuadro 26. Polimorfismo originado por 14 iniciadores RAPD en mango cv. Ataulfo.

Iniciador	Total de bandas	Bandas polimórficas		Polimorfismo (%)
		Presencia	Ausencia	
OPA-01	14	1	8	64.2
OPA-02	13	1	10	84.6
OPA-04	12	3	1	33.3
OPA-11	19	9	6	78.9
OPA-18	10	0	6	60.0
OPB-06	9	0	1	11.1
OPB-07	12	1	4	41.7
OPB-10	17	5	1	35.3
OPB-12	13	2	4	46.1
OPB-18	9	0	3	33.3
OPC-14	10	1	4	50.0
OPC-19	11	1	1	18.2
SAP-01	23	13	6	82.6
SAP-04	10	2	0	20.0
Promedio	13.0	2.8	2.9	47.1

Al comparar el patrón de banda de la planta madre con el de las plántulas a identificar, se encontró que las plántulas cigóticas mostraron distinto patrón de amplificación, principalmente por ausencia de bandas (63 % de bandas polimórficas) (Figura 30). Como se aprecia con los marcadores por ausencia de amplificación: OPA11₂₀₆₅ y OPB12₁₂₃₄, que fueron los que identificaron mayor número de plantas cigóticas (4 cada uno).

El tamaño de los fragmentos polimórficos en ‘Manila’ varió de 228 a 3 383 pb, con los iniciadores OPA-11 y OPB-07, y los marcadores RAPD que más plántulas identificaron

fueron OPA04₈₈₅ y OPC14₈₃₃. Lo que demuestra las variaciones genéticas entre ‘Manila’ y ‘Ataulfo’.

La plántula cigótica que tuvo más respaldo al identificar su origen por lo marcadores RAPD (Cuadro 27) fue la semilla 7, embrión 2, identificada por 39 bandas polimórficas generadas por 9 iniciadores; mientras que, se pone en duda el origen cigótico de las plántulas de la semilla 3, embrión 2, y semilla 4, embrión 1, ya que amplificó con un iniciador, y la plántula de la semilla 4, embrión 1, por amplificar con dos iniciadores (Cordeiro *et al.*, 2006; Novy *et al.*, 1994).

Ningún iniciador por sí sólo pudo identificar a las 9 plántulas cigóticas. Sin embargo, si se empleara a los iniciadores OPA-04, OPA-11 y OPB-07, se hubiera podido diferenciar a todas plántulas estudiadas. El iniciador OPA-04 detectó a una plántula cigótica que el resto de los iniciadores no pudieron identificar (Cuadro 27).

El iniciador OPA-11 mostró el mayor polimorfismo tanto para ‘Manila’ (17 bandas) como para ‘Ataulfo’ (14 bandas). La combinación, si fuera posible, de los iniciadores OPA-02, OPA-04, OPB-07, OPA-11, OPB-12, OPC-14 y SAP-01, permitirían detectar a todos los embriones cigóticos en ambos cultivares.

Cuadro 27. Tamaño (pb) de los marcadores RAPD generados por 14 iniciadores que identificaron plántulas cigóticas de mango cv. Ataulfo.

Plántula	Iniciador														Total de bandas polimórficas
	OPA 01	OPA 02	OPA 04	OPA 11	OPA 18	OPB 06	OPB 07	OPB 10	OPB 12	OPB 18	OPC 14	OPC 19	SAP 01	SAP 02	
a1-1				-2065 -1610 -1559 +1021 -318 -270				+647	-1536 -1395 -1234 -1144	-1127 -1058 -528	-2245 -2088 -823		+2997 +2264 +1665 -1244 +890 +513 -372		24
a1-2	-1724	-3715		-2065 +545 +463	-1068			+478			-2245 -2088		-3081 -1363 +1052 -981 +671		14
a1-3				-2065 +545 +463	-1068			+638	-1536 -1395 -1234 -1144				+905 +671		12
a2-1			+906	+1749 -1096 +1034	-614			-1282 +1218 +587	+1861 +1117		+1673 -681	+932	+1042 -981	+62 +450	17
a2-2							+681					-859			2
a3-2			+922												1
a4-1				+585											1

Figura 27. Continuación.

a4-2			-1537	+974 +908 -318 -270					-1234		-2245 -2088 -823		+1516 +1310 -372		12
a7-2	-2933 -2192 -1724 -1646 -1145 +1116 -1086 -964 -760	-1693 -1335 -1273 -1067 -725 +700 -619 -525 -456 -300	+1323		-2331 -2166 -1951 -1068 -334	-1296	-2133 -1968 -1659 -1591		-1536 -1396 -1234		-2245 -823		-3081 +1015 -981 +900		39

Polimorfismo: (+), presencia de banda; (-), ausencia de banda.

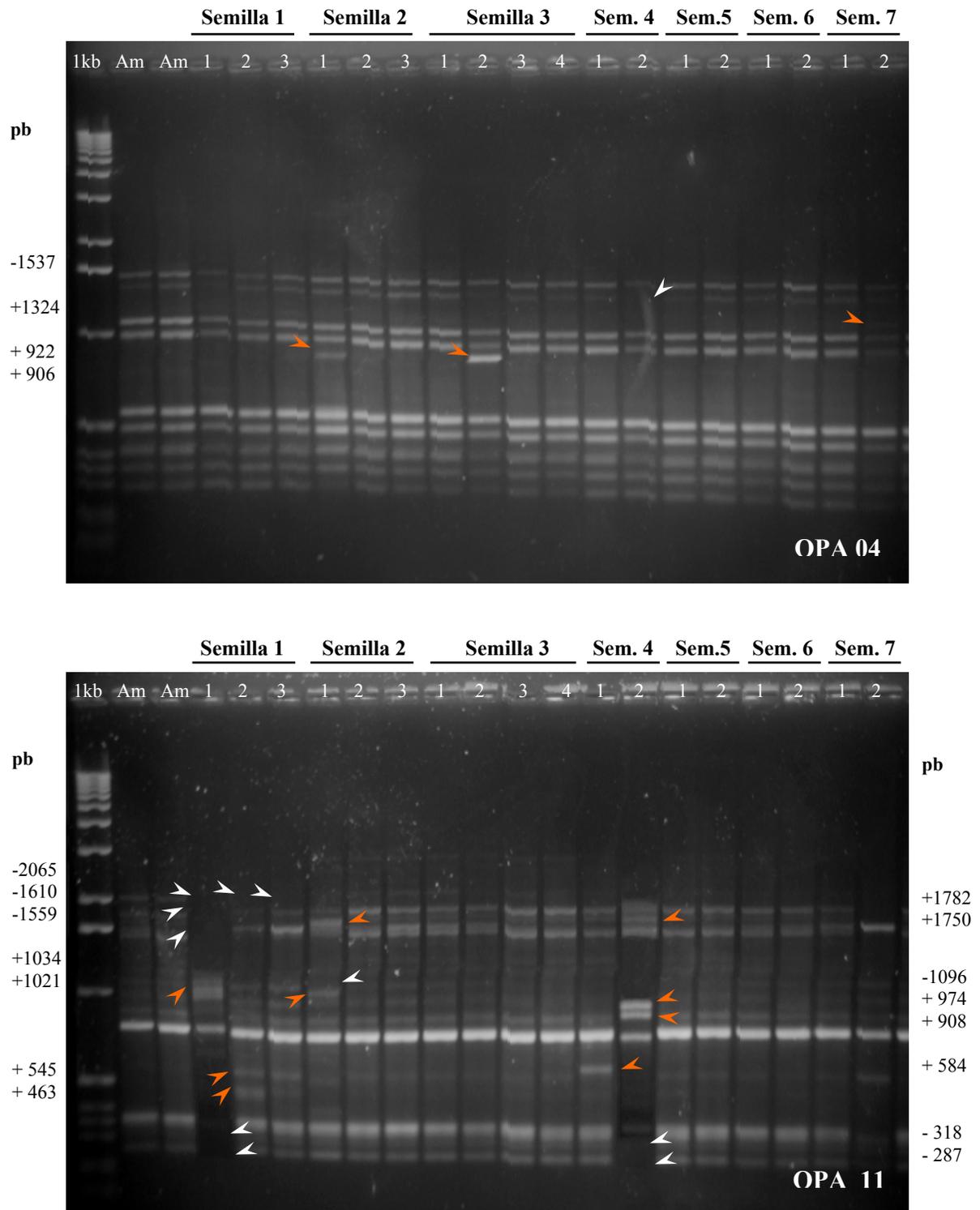


Figura 30. Amplificación de ADN de 20 plántulas de mango cv. Ataulfo utilizando los iniciadores OPA-04 (5' AATCGGGCTG 3') y OPA-11 (5'CAATCGCCGT 3'). 1kb, escalera 1kb Gibco BRL. Am: Planta madre. Números de bajo de las líneas corresponden a las plántulas de cada semilla. Las flechas indican fragmentos amplificados por presencia (→) o por ausencia (↔).

4.5.5 Identificación de embriones cigóticos

El porcentaje de semillas con plántulas identificadas como cigóticas en ‘Manila’ fue 100 %, mientras que, en ‘Ataulfo’ fue 71.4 %. Estos porcentajes fueron mayores a los que obtuvieron Degani *et al.* (1993), al identificar con isoenzimas la plántula cigótica en 22 % de las semillas de ‘13-1’, 20 % en Turpentine, y 13 % en el híbrido ‘13-1’x Turpentine. La diferencia de resultados pudo deberse a que en esta investigación se emplearon marcadores RAPD, más eficientes que las isoenzimas en la detección de plántulas cigóticas (Andrade-Rodríguez *et al.*, 2005; Cordeiro *et al.*, 2006; Nageswara *et al.*, 2007). Además, Degani *et al.* (1993) germinaron las semillas *in vivo* (en ‘peat moss’ con perlita), lo que pudo disminuir el número de plántulas que desarrollaron por semilla porque los embriones sufrieron deshidratación o no tenían las reservas suficientes (Villegas y Andrade, 2008). Mientras que, en este trabajo al germinar las semillas *in vitro* y dar a todos los embriones las condiciones adecuadas para germinar, se incrementó la posibilidad de identificar al embrión sexual. Por lo mencionado, el cultivo *in vitro* es una técnica que se debe utilizar en este tipo de trabajos.

Esta investigación fue la primera en recurrir al cultivo *in vitro* de embriones de mango, lo que permitió identificar el origen cigótico o nucelar de mayoría de las plántulas.

Tanto en ‘Manila’ como en ‘Ataulfo’ se encontró más de un embrión cigótico por semilla (Cuadro 28), aún cuando en la literatura se señala que las Anacardiáceas tienen un ovario con un óvulo, igual que en el género *Mangifera* (Sturrock, 1967; Parisot, 1988; y Pienaar y Teichma, 1998). En ambos cultivares se esperaba hallar un embrión cigótico por semilla, producto de la unión de la ovocélula y un núcleo espermático (Esau, 1982); sin embargo, en las nueve semillas poliembriónicas de Manila se encontraron 17 embriones cigóticos, y en las siete semillas poliembriónicas de Ataulfo se encontraron nueve.

En algunas especies como soja (Kenworthy *et al.*, 1973 citado por Martínez- Gómez *et al.*, 2004), fresa (*Fragaria* spp.), almendro (Martínez- Gómez *et al.*, 2004) y también en cítricos (Bacchi, 1943; Cameron y Garber, 1968; Cameron y Soost, 1979, citados por Martínez- Gómez *et al.*, 2004; Xiang y Roose, 1988; Ribeiro *et al.*, 1999; Rao *et al.*, 2008),

hay reportes de la presencia de dos ('twin') o más embriones cigóticos por semilla. Medina Filho *et al.* (1993) citado por Ribeiro *et al.* (1999), describen a la poliembriónia en *Citrus* como dicigótica si se presentan dos cigótos por semilla, posiblemente originados por la fisión del embrión sexual o por la presencia de dos gametofitos en un mismo óvulo. Estos reportes y los resultados obtenidos, pueden justificar la existencia de más de un embrión cigótico por semilla en mango, por lo que se recomienda realizar estudios de anatomía y desarrollo de la semilla y embriones en los cvs. Manila y Ataulfo para confirmar lo anterior.

Cuadro 28. Plántulas identificadas como cigóticas por análisis RAPD con 14 iniciadores, en mango cvs. Manila y Ataulfo.

Cultivar	Semilla (no.)	Número de embriones	Plántulas cigóticas	Iniciadores
Manila	1	2	2	OPA-04, OPA-11, OPB-07, OPB-12, OPC-19
	2	4	3	OPA-02, OPA-04, OPA-11, OPB-06, OPB-07, OPB-12, OPC-14, OPC-19, SAP-01
	3	3	1	OPA-01, OPA-02
	4	3	3	OPA-01, OPA-02, OPA-04, OPA-11, OPA-18, OPB-06, OPB-07, OPB-10, OPB-12, OPB-18, OPC-14, SAP-04
	5	2	1	SAP-04
	6	5	2	OPA-04, OPA-11, OPB-06, OPB-07, OPB-10, OPC-14, SAP-01
	7	2	1	OPA-04, OPA-11, OPB-07, OPC-14
	8	3	2	OPA-02, OPA-11, OPB-07, OPC-14, SAP-01
	9	2	2	OPA-02, OPA-04, OPA-11, OPB-10, SAP-01
Ataulfo	1	3	3	OPA-01, OPA-02, OPA-11, OPB-10, OPB-12, OPB-18, OPC-14, SAP-01
	2	3	2	OPA-04, OPA-11, OPA-18, OPB-07, OPB-10, OPB-12, OPC-14, OPC-19, SAP-01, SAP-04
	3	4	1	OPA-04
	4	2	2	OPA-04, OPA-11, OPB-12, OPC-14, SAP-01
	5	2	0	
	6	2	0	
	7	2	1	OPA-01, OPA-02, OPA-04, OPA-18, OPB-06, OPB-07, OPC-14, SAP-01

El embrión cigótico en las semillas de ‘Manila’ y ‘Ataulfo’ es un híbrido del que se conoce la ‘madre’ pero no el otro progenitor, porque las semillas se obtuvieron por polinización libre. Cuando hubo más de un embrión cigótico en la semilla, se mostró variación entre los marcadores RAPD que los identificaron, lo que deriva en la posibilidad de que cada embrión provenga de diferentes óvulos fecundado por células espermáticas de polen diferente, o de que exista otro tipo de proceso apomíctico.

Sachar y Chopra (1957), citados por Cordeiro *et al.* (2006), argumentan que el embrión cigótico en mango se localiza en la parte basal hacia el lado del pedúnculo; por lo cual Cordeiro *et al.* (2006) denominaron como ‘1’ al embrión localizado en esta región, y numeraron al resto de los embriones según su cercanía. Cordeiro *et al.* (2006) determinaron que la posición del embrión cigótico varió entre 1, 2, 3 y 4. En esta investigación, para numerar los embriones se tomó como referencia el funículo, por estar cercano al micrópilo (no se observa en las semillas maduras de mango), y se identificó como ‘1’ al embrión donde se insertó el funículo y se numeró los demás de acuerdo a su cercanía siguiendo las manecillas del reloj. Considerando la numeración empleada, los embriones cigóticos se localizan en la posición ‘1’ y ‘2’ en el extremo micropilar en 93.8 % de las semillas estudiadas de ambos cultivares. Estos resultados concuerdan con las observaciones realizadas en mangos poliembriónicos por Sturrock (1967), quién indica que el saco embrionario en el que desarrolla el cigoto, está cercano al micrópilo.

En el Cuadro 29, se muestra que 44.4 y 88.9 % de los embriones ‘1’ y ‘2’ en el cv. Manila fueron cigóticos, y 57.1 y 100 % en ‘Ataulfo’. Por lo que, numerar los embriones con respecto al funículo es buen indicador para ubicar a los embriones cigóticos.

Tomando en cuenta el tamaño de los embriones ‘1’ y ‘2’ ($\leq 2\ 087$ mg, ≤ 26.4 mm de largo y ≤ 17.1 mm de ancho), es poco probable que se obtengan plántulas si se siembran la semillas *in vivo*, debido a que estos embriones pueden sufrir deshidratación o carezcan de las reservas suficientes (Villegas y Andrade, 2008).

Cuadro 29. Plántulas identificadas como cigóticas por análisis RAPD con 14 iniciadores, en mango cvs. Manila y Ataulfo.

Cultivar	Posición del embrión	Número de embriones	Embriones cigóticos	
			Número	%
Manila	1	9	4	44.4
	2	9	8	88.9
	3	5	4	80.0
	4	1	0	0
	5	2	1	50.0
Ataulfo	1	7	4	57.1
	2	7	7	100.0
	3	3	1	33.3
	4	1	0	0

Los embriones ‘3’ y ‘4’ al ser los de mayor tamaño ($\geq 3\ 658$ mg, ≥ 36.3 mm de largo y ≥ 15.5 mm), en condiciones de invernadero o vivero son los que tienen mayor probabilidad de germinar. Por lo que, en ‘Manila’ 80 % de las plántulas procedentes del embrión ‘3’ que germinen *in vivo* pueden ser cigóticas, mientras que, en ‘Ataulfo’ pueden ser 33.3 %. No obstante, como ambos cultivares mostraron alto grado de poliembrionía y número de embriones por semilla (‘Manila’ hasta 7 embriones y ‘Ataulfo’ hasta 5), y el embrión ‘3’ disminuye su tamaño al incrementar el número de embriones, se considera que existe gran probabilidad de que estos cultivares se propaguen vegetativamente al emplear la semilla (Soares-Filho *et al.*, 2002; Sampaio *et al.*, 2006; Villegas y Andrade, 2008).

Considerando lo expuesto, se recomienda que en ‘Manila’ se utilicen para propagación las semillas con endocarpo de 13 a 18 g, por tener mayor número de embriones (3.4); y en ‘Ataulfo’ se ocupen las semillas con peso mayor o igual a 19 g (3.2 embriones). Asimismo, al tener identificada la ubicación de los embriones en la semilla (con respecto al funículo) se pueden descartar las plántulas que se originen de embriones cigóticos.

Una alternativa práctica que se puede emplear en el mejoramiento genético de mango, es identificar a los embriones cigóticos tomando como referencia su cercanía con el funículo. Facilitando la selección del híbrido en etapas tempranas del desarrollo de las plántulas (Villegas y Andrade, 2008)

Schnell *et al.* (1995) indican que al utilizar marcadores RAPD se debe asegurar la reproducibilidad de los resultados obtenidos, por lo que realizaron dos bloques de reacción para cada iniciador y una replica de cada electroforesis. Considerando lo expuesto por los autores mencionados, se recomienda ampliar los estudios efectuados en ‘Manila’ y ‘Ataulfo’ al efectuar replicas de las reacciones de PCR y electroforesis para confirmar los resultados de este trabajo.

V. CONCLUSIONES

La cubierta seminal (constituida por testa y tegmen) es la capa de color café adherida a la semilla de mango, y no la ‘película’ papirácea de color blanco adherida al endocarpo, como lo señaló Parisot (1988).

La localización y orientación de los embriones en la semilla varia entre cultivares de mango, por lo tanto, la forma de sembrar la semilla no debe ser la misma para todos los cultivares.

El peso del fruto y de la semilla, son indicadores del número de embriones por semilla en los cultivares Manila y Ataulfo.

El cultivo *in vitro* favoreció la germinación de los embriones cigóticos, y los marcadores RAPD fueron eficientes al identificar el origen de las plántulas. Por lo tanto, ambas técnicas se pueden aplicar en el mejoramiento genético de cultivares de mango.

El tejido de hojas jóvenes o maduras, puede ser empleado para extracción de ADN en mango.

Las secuencias homólogas que identificaron el mayor número de plántulas cigóticas fueron 5' AATCGGGCTG 3', 5' CAATCGCCGT 3' y 5' GGTGACGCAG 3' en ‘Manila’; y 5' CAATCGCCGT 3' y 5' ATGCGAACCG 3' en ‘Ataulfo’.

En ‘Manila’ y ‘Ataulfo’ se identificaron de 1 a 3 plántulas cigóticas desarrolladas a partir de una semilla; estas fueron generadas tanto de embriones pequeños ubicados junto al micrópilo como de embriones grandes próximos al micrópilo.

El funículo es un indicador práctico para ubicar a los embriones cigóticos.

Los cvs. Manila y Ataulfo son de reproducción apomítica nucelar al considerar el porcentaje de poliembrionía y número de embriones por semilla que presentan.

Las características de poliembrionía son específicas para cada género, especie y cultivar, por lo que no se deben generalizar.

VI. LITERATURA CITADA

- Ahmad Rajwana, I., N. Tabbasam, A. Ullah M., S. Ahmad M., Meheboob-ur-Rahman, and Y. Zafar. 2008. Assessment of genetic diversity among mango (*Mangifera indica* L.) genotypes using RAPD markers. *Scientia Hort.* 117:297-301.
- Al-Saguir, and D. M. Porter. 2006. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) study of *Pistacia* species (Anacardiaceae). *Asian J. Plant. Sci.* 5:1002-1006.
- Andrade-Rodríguez, M, A. 2002. Poliembriónía e identificación de plántulas cigóticas y nucelares de tres portainjertos y un cultivar de cítricos mediante RAPDs. Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados, *campus* Montecillo, Texcoco, Edo. de México. 122 p.
- Andrade-Rodríguez, M, A. Villegas-Monter, G. Carrillo-Castañeda, and A. García-Velásquez. 2004. Polyembryony and identification of Volkamerian lemon zygotic and nucellar seedlings using RAPD. *Pesq. Agropec. Bras.* 39:551-559.
- Andrade-Rodríguez, M, A. Villegas-Monter, M. A. Gutiérrez-Espinosa, G. Carrillo-Castañeda, and A. García-Velásquez. 2005. Polyembryony and RAPD markers for identification of zygotic and nucelar seedlings in *Citrus*. *Agrociencia* 39:371-383.
- Ángel P., A. L. del, y A. Rebolledo M. 2008. Implicaciones del libre comercio para el pequeño productor: caso mango mexicano. *In: J. G. Cruz y P. A. Torres (eds). Enfoques Tecnológicos en la Fruticultura.* Universidad Autónoma Chapingo, México. pp. 419-432.
- Anila P., and Girija T. 2005. Effect of seed desiccation on the seedling characters of mango (*Mangifera indica* L.). *Madras. Agric. J.* 92: 330-334.
- Arndt, C. H. 1935. Notes on polyembryony and multiple shoots from the seed in *Mangifera indica*. *Am. J. Bot.* 22:26-30.
- Archak, S., A. B. Gaikwad, D. Gautam, E. V. V. B. Rao, K. R. M. Swamy, and J. L. Karihaloo. 2003. Comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR and AFLP) for genetic analysis of cashew (*Anacardium occidentale* L.) accessions of India. *Genome* 46:362-369.

- Aron, Y., H. Czosnek, and S. Gazit. 1998. Polyembryony in mango (*Mangifera indica* L.) is controlled by single dominant gene. HortScience 33:1241-1242.
- Avilán R., L., M. Rodríguez, y J. Ruiz. 1995. Germinación de algunas variedades de mango con bajo y mediano porte para ser usadas como patrones. Agron. Trop. 45:445-456.
- Azofeifa-Delgado, A. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del Trópico. Agron. Mesoam. 17:221-242.
- Bacchi, O. 1943. Cytological observations in citrus: III. Megasporogenesis, fertilization, and polyembryony. Bot. Gaz. 105: 221-225.
- Barbosa, C., C. Rios, D. Flores, L. Pérez-Flores, F. J. Fernández, and L. Ponce de León. 2009. Comparative relative growth rate of seedlings of *Mangifera indica* L. var. 'Haden' and 'Manila': Preliminary data. In: S. A. Oosthuysen (ed). Proc VIII Int. Mango Symposium, Acta Hort. 820: 303-309.
- Bastianel, M., S. F. Schwaz, H. D. Coleta F., L. Lee L., M. Machado, and O. C. Soller. 1998. Identification of zygotic and nucellar tangerine seedlings (*Citrus* spp.) using RAPD. Genet. Mol. Biol. 21: 123-127.
- Batygina, T. B., and G. Yu. Vinogradova. 2007. Phenomenon of polyembryony. Genetic heterogeneity of seeds. Russ. J. Dev. Biol. 38:126-151.
- Bhat, V., K. K. Dwivedi, J. P. Khurana, and S. K. Sopory. 2005. Apomixis: An enigma with potential applications. Current Sci. 89: 1879-1893.
- Bicknell, R. A., and A. M. Koltunow. 2004. Understanding apomixis: recent advances and remaining conundrums. The Plant Cell 16: S228-S245.
- Capote del S., M., J. Valdés-Infante, y N. N. Rodríguez. 2003. Comparación de los marcadores moleculares isoenzimas, AFLP e ISTR para la estimación del nivel de polimorfismo, capacidad de discriminación e información en cultivares de mango (*Mangifera indica* L.). Biblioteca Virtual de las Ciencias en Cuba © http://www.bibliociencias.cu/gsd/collect/revistas/import/Polimorfismo_Mango.pdf (Marzo, 2010).
- Carmello-Guerreiro, S. M., e A. A. Sartori P. 1999. Morfologia e anatomia da semente de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) em desenvolvimento. Rev. Bras. Bot. 22:

- CIMMYT. 2005. Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. 3^o Edition. Méxioc, DF: CIMMYT.
- Cordeiro, M. C .R., A. C. Q. Pinto, V. H .V.Ramos, F.G. Faleiro, e L. M. S. Fraga. 2006. Identificação da origem genética de plântulas em sementes poliembriônicas de mangueira (*Mangifera indica* L.) cv. Rosinha por meio de marcadores RAPD. Rev. Bras. Frutic. 28:454-457.
- Costa, M. E., D. S. Sampaio, A. A. S .Paoli, e S. C. A. L. Leite. 2004. Poliembriõnia e aspectos de embriogênese em *Tabebuia ochracea* (Chamisso) Standley (Bignoniaceae). Rev. Bras. Bot. 27: 395-406.
- Crane, Charles F. 2001. Classification of apomictic mechanisms. In: Savidan, Y., J.G. Carman, and T. Dresselhaus (eds). The Flowering of Apomixis: From Mechanisms to Genetic Engineering. Mexico, D.F.: CIMMYT, IRD, European Commission DG VI (FAIR). pp. 24-43.
- Cristofani, M., V. M. Novelli, A. C. de Oliveira, A. R. Otaviano, A. A. de Souza, e M. A. Machado. 2001. Identificação de híbridos de cruzamentos interespecíficos em citros utilizando marcadores RAPD e SSR. Laranja, Cordeirópolis 22: 231-241.
- Darlan R., J., S. E. de Araújo Neto, N. E. Arbex de Castro, P. C. Caruana Martins, e M. Guimarães Correia. 2006. Poliembriõnia e caracterização de frutos de citrumelo 'Swingle' e de *Poncirus trifoliata*. Ciênc. Agrotec. 30:88-91.
- Degani, C., R. El-Batsri, and S.Gazit. 1990. Enzyme Polymorphism in Mango. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 115:844-847.
- Degani, C., M. Cohen, O. Reuveni, R. El-Batsri, and S.Gazit. 1993. Frequency and characteristics of zygotic seedlings from polyembryonic mango cultivars, determined using isozymes as genetic markers. Acta Hort. 341:78-79.
- Dhillon, R. S., G. S. Kaundal, and S. S. Cheema. 1993. Nucellar embryony for propagating citrus. Indian Hort. 38: 44-45.
- Domíngues, E. T., J. T. Sobrinho, A. T. Neto, e V. Y. Sugahara. 1998. Poliembriõnia em clones de laranja 'Pêra' e variedades assemelhadas. Bragantia 57: 251-258.
- Duval, M. F., A. M. Risterucci, C. Calabre, F. Le Bellec, J. Bunel, and S. Sitbon. 2009. Genetic diversity of Caribbean Mangoes (*Mangifera indica* L.) using microsatellite

- markers. *In*: S. A. Oosthuysen (ed). Proc. VIII th Int. Mango Symposium. Acta Hort. 820: 183-188.
- Eiadthong, W., K. Yonemori, A. Sugiura, N. Utsunomiya, and S. Subhadrabandhu. 1999. Identification of mango cultivars of Thailand and evaluation of their genetic variation using the amplified fragments by simple sequence repeat –(SSR-) anchored primers. *Scientia Hort.* 82:57-66.
- Esau, K. 1982. Anatomía de las Plantas con Semilla. Traducción del español de P. Izaguirre y A.M. Laguardia. 2^{da} ed EDITORIAL HEMISFERIO SUR, Argentina. 512 p.
- Esen, A., and R. K. Soost. 1977. Adventice embryogenesis in *Citrus* and its relation to pollination and fertilization. *Amer. J. Bot.* 64: 607-614.
- Espinoza O., G., y M. Engleman. s/a. Breve recopilación de anatomía de semillas (Notas del curso). Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. 45 p.
- Evans, Edward A. 2008. Tendencias Recientes en la Producción, Comercio y Consumo de Mango en el Mundo y en los Estados Unidos. Food and Resource Economics, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. United States of America. 24 p.
- FAOSTAT. 2007. FAO Statistics, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. <http://faostat.fao.org/> (Abril 2010).
- Galán S., V. 1999. El Cultivo del Mango. Ediciones Mundi-Prensa. España. pp. 31-40, 49-66, 109-125, 141-148.
- Galván-Luna, J. J., F. Briones-Encinia, P. Rivera-Ortiz, L. A. Valdes-Aguilar, M. Soto-Hernández, J. Rodríguez-Alcázar, y O. Salazar-Salazar. 2009. Amarre, rendimiento y calidad del fruto en naranja con aplicación de un complejo hormona. *Agric. Tec. Mex.* 35:339-345.
- Gálvez L., D. 2006. Caracterización molecular de mangos (*Mangifera indica* L.) criollos chiapanecos y relaciones genéticas con mangos de otras regiones. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional, Centro de Biotecnología Genómica, Reynosa, Tamaulipas.
- García-Mas, J., E. Graciano, M. J. Amanzana, A. Monforte, M. Oliver, J. Ballester, M. A. Viruel, y P. Arús. 2000. Marcadores de ADN: concepto, tipo, protocolos. *In*: Nuez, F. y J. M. Carrillo (eds). Los Marcadores Géticos en la Mejora Vegetal. Editorial U.P.V. Universidad Politécnica de Valencia, España. pp. 91-150.

- García, R., M. J. Asíns, J. Corner, and E. A. Carbonell. 1999. Genetic analysis of apomixes in *Citrus* and *Poncirus* by molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* 99:551-518.
- Gehrke V., y Malc R. 2008. Reflexiones sobre problemas de biología reproductiva del mango Ataúlfo en el Soconusco, Chiapas. *Tecnología en Marcha* 21: 174-183.
- González, D. O., N. Palacios, y J. Tohme. 1995. Protocolos para Marcadores Moleculares. Unidad en Biotecnología, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Colombia. 78 p.
- Grossniklaus, U., G. A. Nogler, and P. J. Van Dijk. 2001. How to avoid sex: the genetic control of gametophytic apomixis. *Plant Cell* 13: 149-1497.
- Innis, M. A., and D. H. Gelfand. 1990. Basic methodology, optimization of PCRs. *In*: Innis, M. A., D. H. Gelfand y T. J. White (eds). *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*. ACADEMIC PRESS, INC. U.S.A. 482 p.
- IPGRI. 2006. Descriptors for Mango (*Mangifera indica* L.). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 71 p.
- Kashkush, K., F. Jinggui, E. Tomer, J. Hillel, and U. Lavi. 2001. Cultivar identification and genetic map of mango (*Mangifera indica*). *Euphytica* 122: 129-136.
- Kennard, W. C. 1955. Development of the fruit, seed, and embryo of the Paheri Mango. *Bot. Gaz.* 117: 28-32.
- Koltunow, A. M. 1993. Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. *The Plant Cell* 5:1425-1437.
- Koltunow, A. M., T. Hidaka, and S. P. Robinson. 1996. Polyembryony in citrus. Accumulation of seed storage proteins in seeds and in embryos cultured *in vitro*. *Plant Physiol.* 110: 599-609.
- Koltunow, A. M., N. S. Scott, y A. M. Chaudhury. 2001. The use of apomixis in cloning horticultural plants: Current applications and molecular prospects. *In*: S. Sorvari, S. Karhu, E. Kanervo, S. Pihakaski (eds). *Proc. IV IS on In Vitro Cult. & Hort. Breeding*. *Acta Hort.* 560: 333-344.
- Krishna, H., y S. K. Singh. 2007. Biotechnological advances in mango (*Mangifera indica* L.) and their future implication in crop improvement – A review. *Biotechnol. Adv.* 25: 223-243.

- Laux, T., T. Würschum, and H. Breuninger. 2004. Genetic regulation of embryonic pattern formation. *The Plant Cell* 16: S190–S202.
- Ledesma M., A. 2007. Estudio morfológico y anatómico del aborto e óvulos y embriones en mango (*Mangifera indica* L.) ‘Ataulfo’ en el estado de Nayarit. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Estado de México.
- Martínez-Gómez, P., R. Sánchez-Pérez, F. Dicenta, y T. M. Gradziel. 2004. Caracterización de embriones múltiples en almendro. *In*: F. Laurens and K. Evans (eds). XIth Eucarpia Symp. on Fruit Breed & Genetics. *Acta Hort.* 663: 819-822.
- Mendes-da-Glória, F. J., F. de A. A. Mourão F., e B. Appezzato-da-Glória. 2001. Morfologia de embriões nucelares de laranja ‘Valência’ (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). *Acta Bot. Bras.* 15: 17-25.
- Mo R., Luo Y., Zhou S., y Liu J. 2005. Polyembryony in mango (*Mangifera indica* L.) and genetic analysis. *J. Trop. and Subtrop. Bot.* 13:475- 479.
- Moody, A. 2007. An introduction to the polymerase chain reaction. *In*: Hughes, S. and A. Moody (eds). PCR, Methods Express. Series editors: B. D. Hames. SCION Publishig Ltd. UK. pp. 1-20.
- Nageswara R., M., J. R. Soneji, C. Chen, Y. A. Choi, S. Huang, and F. G. Gmitter Jr. 2007. Identification of zygotic and nucelar seedlings from citrus rootstock candidates using RAPD. *Acta Hort.* 738: 255-260.
- Naumova, T.N., and J-P. Vielle-Calzada. 2001. Ultrastructural analysis of apomictic development. *In*: Savidan, Y., J.G. Carman, and T. Dresselhaus (eds). *The Flowering of Apomixis: From Mechanisms to Genetic Engineering*. Mexico, D.F., CIMMYT, IRD, European Comission DG VI (FAIR). pp. 44-63.
- Niembro R. Aníbal. 1988. *Semillas de Árboles y Arbustos; Ontogenia y Estructura*. Editorial LIMUSA, México. 283 p.
- NMX-FF-058-SCFI-2006. Productos alimenticios no industrializados para consumo humano – fruta fresca – mango (*Mangifera indica* L.) – especificiones. Secretaría de Economía. <http://www.se.mx> (Mayo 2010).
- Novy, R.G., Kobak C., Goffreda J., and Vorsa N. 1994. RAPDs Identify varietal misclassification and regional divergence in cranberry (*Vaccinium macrocarpon* (Ait.) Pursh). *Theor. Appl. Genet.* 88: 1004-1010.

- Nuez, F., J. M. Carrillo y A. M. de Ron. 2000. Introducción. *In*: Nuez, F. y J. M. Carrillo (eds). Los Marcadores Géticos en la Mejora Vegetal. Editorial U. P. V. Universidad Politécnica de Valencia, España. pp. 3-24.
- Olano, C. T., R. J. Schenell, W. E. Quintanilla, and R. J. Cambell. 2005. Pedigree analysis of Florida mango cultivars. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 118:192-197.
- Oliveira, A. C. de, A. N. García, M. Cristofani, and M. A. Machado. 2002. Identification of citrus hybrids through the combination of leaf apex morphology and SSR makers. *Euphytica* 128:397-403.
- Pandit, S. S., S. Mitra, A. P. Giri, K. H. Pujari, B. P. Patil, N. D. Jambhale, and V. S. Gupta. 2007. Genetic diversity analysis of mango cultivars using inter simple sequence repeat markers. *Current Sci.* 93:1135-1141.
- Parisot, E. 1988. Étude de la croissance rythmique chez de jeunes manguiers (*Mangifera indica* L.). *Fruits* 43: 97-105.
- Pienaar, M.E., and I. V. Teichma. 1998. The generic position of *Lithraea brasiliensis* Marchand (Anacardiaceae): evidence from fruit and seed structure. *Bot. J. Linn. Soc.* 126: 327-337.
- Pérez-Tornero, O., and I. Porras. 2008. Assessment of polyembryony in lemon: rescue and *in vitro* culture of immature embryos. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 93:173-180.
- Plan Rector Sistema Nacional Mango. 2005. Segunda fase: Diagnóstico inicial base de referencia estructura estratégica. SAGARPA. Tecnológico de Monterrey. INCA Rural. 4 de marzo 2005. Acapulco, Guerrero.
- Prasad, A., and A. Prasad. 1972. Performance studies on polyembryonic varieties of *Mangifera indica* L. *Acta Hort.* 24:31-35.
- Ramírez, I. M., N. N. Rodríguez, J. Valdés-Infante, M. Capote, D. Becker, and W. Rohde. 2004. Isolation of genomic DNAs from the tropical fruit trees avocado, coconut, guava and mango for PCR-based DNA marker application. *Cult. Trop.* 25:33-38.
- Rao M. N., J. R. Soneji, C. Chen, S. Huang, and F. G. Gmitter (Jr). 2008. Characterization of zygotic and nucellar seedlings from sour orangelike citrus rootstock candidates using RAPD and EST-SSR markers. *Tree Genet. Genom.* 4: 113-124.

- Ravishankar, K. V., Lalitha Anand, and M. R. Dinesh. 2000. Assessment of genetic relatedness among mango cultivars of India using RAPD markers. *J. Hort. Scie. Biotech.* 75:198-201.
- Ravishankar, K. V., P. Chandrashekara, S. A. Sreedhara, M. R. Dinesh, Lalitha Anand, and G. V. S. Saiprasad. 2004. Diverse genetic bases of Indian polyembryonic and monoembryonic mango (*Mangifera indica* L) cultivars. *Current Sci.* 87: 870-871.
- Ribeiro, V. G., M. Pascual, J. Darlan R., E. Bearzoti, e S. D'Angelo N. 1999. Estádios de desenvolvimento embrionário e localização do embrião zigótico em sementes de citros. *Pesq. Agrop. Bras.* 34: 1327:1333.
- Rogers, S. O., and A. J. Bendich. 1988. Extraction of DNA from plant tissues. *Plant Mol. Biol. Manual* A6:1-10.
- Ruíz, C., M. P. Breto, and M. J. Asíns. 2000. A quick methodology to identify sexual seedlings in citrus breeding programs using SSR markers. *Euphytica* 112:89-94.
- Saldaña, G. A., y E. G. Salazar. 2007. Aislamiento de ADN de calidad para la amplificación al azar de ADN polimórfico de mango. *Agron. Trop.* 57: 281-286.
- Salomão, A. N., y A. C. Allem. 2001. Polyembryony in angiospermus trees of the Brazilian Cerrado and Caatinga vegetation. *Acta Bot. Bras.* 15:369-378.
- Sampaio P., O., L. Santos P., L. Costa dos S., Ranulfo C. Caldas, e W. dos S. Soares-Filho. 2006. Caracterização de híbridos de *Poncirus trifoliata* e de outros porta-enxertos de citros no Estado da Bahia. *Rev. Bras. Frutic.* 28:410-413.
- Sánchez D., J. J., E. Avitia G., A. M. Catillo G., A. Villegas M., y T. Corona T. 2006. Estudio anatómico de la poliembrionía en tres portainjertos de cítricos. *Rev. Chapingo Serie Hort.* 12: 145-152.
- Sánchez S., E., M. J. Beltrán F., y E. A. Huipas Y. 2008. Comportamiento de portainjertos de mango (*Mangifera indica*) en condiciones salinas. *In: J. G. Cruz y P. A. Torres (eds). Enfoques Tecnológicos en la Fruticultura. Universidad Autónoma Chapingo, México.* pp. 203-214.
- Santos, C. A. F., F. P. Limaneto, e J. G. Da Costa. 2008. Similaridade genética de acessos de mangueira de diferentes origins geográficas avaliadas por marcadores AFLP. *Rev. Bras. Frutic.* 30:736-740.

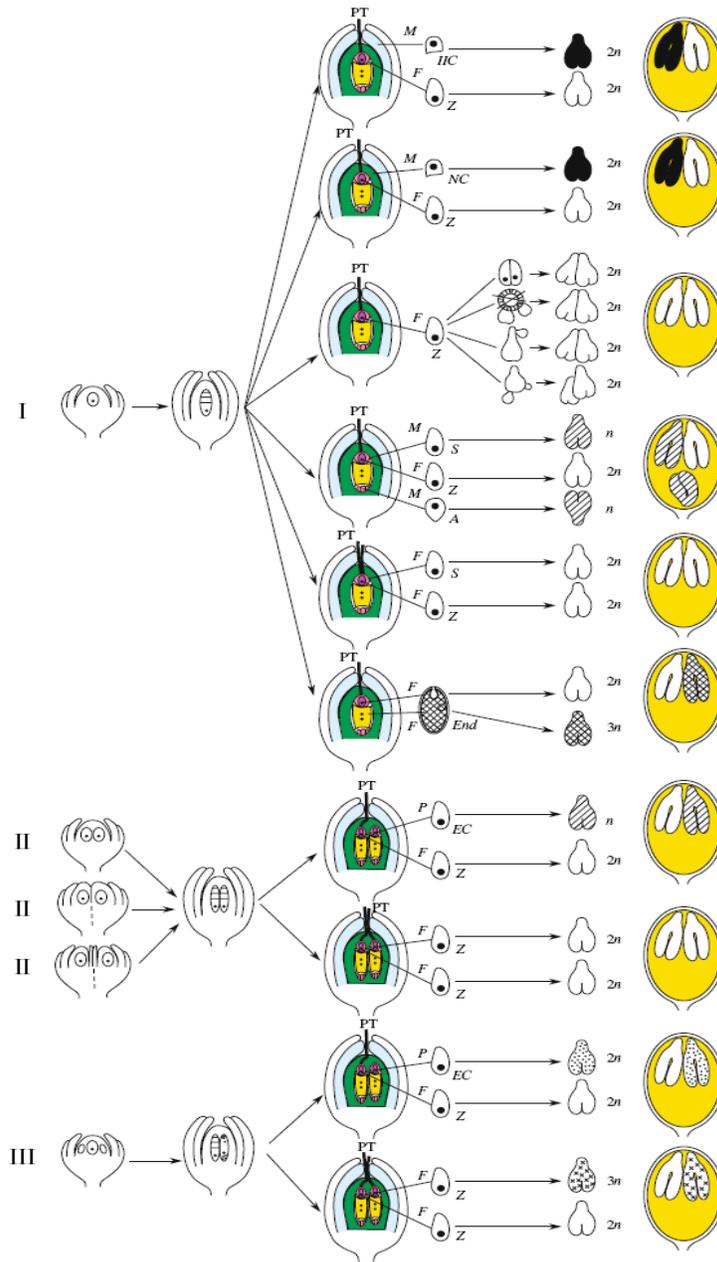
- SAS 9.0. 2002. SAS/STAT® 9.0. User's Guide Release. Cary, NC:SAS Institute Inc., USA.
- Schnell, J. R., and R. J. Knight, Jr. 1991. Are polyembryonic mangos dependable sources of nucelar seedlings for rootstocks?. Proc. Fla. State Hort. Soc. 104:44-47.
- Schnell, J. R., and R. J. Knight, Jr. 1992. Frequency of zygotic seedlings from five polyembryonic mango rootstocks. HortScience 27:174-176.
- Schnell, R.J., C. M. Ronning, and R. J. Knight, Jr. 1995. Identification of cultivars and validation of genetic relationships in *Mangifera indica* L. using RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 90:269-274.
- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2008. [http://www. siap](http://www.siap) (Marzo 2010).
- Singh, R. J. 2003. Plant Cytogenetics. 2nd ed CRC Press LLC, Florida, EUA. pp. 93-111.
- Singh, S., A. B. Gaikwad, and J. L. Karihaloo. 2009. Morphological and molecular analysis of intracultivar variation in Indian mango (*Mangifera indica* L.) cultivars. In: R. J. Geijskes (ed). Proc. VIth IS on In Vitro Cult. and Hort. Breed. Acta Hort. 829: 205-212.
- Skroch, P., and J. Nienhuis. 1995. Impact of scoring error and reproducibility of RAPD data on RAPD based estimates of genetic distance. Theor. Appl. Genet. 91:1086-1091
- Soares-Filho, W. dos S., L. M. Lee, and A. P. da Cunha Sobinho. 1995. Influence of pollinators on polyembryony in *Citrus*. Acta Hort. 403: 256-265.
- Soares-Filho, W. dos Santos, A. C. de Monis Medrano, M. A. Pinto da C., A. P. da Cunha S., e O. Sampaio P. 2002. Freqüência de híbridos em cruzamentos controlados de citros: cultivo de sementes versus cultivo in vitro de embriões. Pesq. Agropec. Brasilia 37:981-988.
- Stein, N., G. Herren, and B. Keller. 2001. A new DNA extraction method for high-throughput marker analysis in a large-genome species such as *Triticum aestivum*. Plant Breed. 120:354-356.
- Steiner, A. A. 1961. A universal method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. Plant Soil 15: 134-154.
- Sturrock, T. T. 1967. Nucellar embryos of the mango. Fla. State Hort. Soc __:350-354

- Thongplave, B., B. Silayoi, V. Vangnai, and T. Tulyathorn. 1983. Studies on the ontogeny of polyembryony in mango (*Mangifera indica* L.) cv Okrong Thong. *In: Proceedings of the 22nd National Conference, Ksetsart Univ., Bangkok, Thailand.* <http://kucon.lib.ku.ac.th/Fulltext/KC2201069.pdf> (abril 2010).
- Torres-de los Santos, R., M. Salvador-Figueroa, y L. Adriano-Anaya. 2005. Variabilidad genética entre árboles padre de *Mangifera indica* Linn. var. Ataulfo. *In: Memoria de XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.* 18-23 septiembre. Mérida, Yucatán, México.
- Valadez M., E., y G. Kahl. 2005. Huellas de ADN de Genomas de Plantas (Teoría y Protocolos de Laboratorio). Mundi-Prensa México, S.A. de C.V. México. 147 p.
- Vargas R., V. H., A. C. Q. Pinto, N. T. V. Junqueira, A. C. Gomes, S. M. R. Andrade, and M. C. R. Cordeiro. 2004. Effect of mono and polyembryonic rootstocks on growth, yield and fruit quality of four mango cultivars in the Central Region of Brazil. *Acta Hort.* 645-201-204.
- Vasanthaiiah, H. K. N. 2009. Paternity analysis of mango (*Mangifera indica* L.) hybrids with their parents. *Int.J. Fruit Sci.* 9: 1-10.
- Vasanthaiiah, H. K.N., K. V. Ravishankar, and G. K. Mukunda. 2007. Chapter 16, MANGO. *In: C. Kole (ed). Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants, vol. 4 Fruits and Nuts.* ©Springer-Verlang Berlin Heidelberg.
- Vázquez, J. F., M. D. Sánchez-Yélamo, y J. M. Carrillo. 2000. Marcadores morfológicos y bioquímicos. *In: Nuez, F. y J. M. Carrillo (eds). Los Marcadores Géticos en la Mejora Vegetal.* Editorial U.P.V. Universidad Politécnica de Valencia, España. pp. 25-88.
- Vázquez V., V., M. H. Pérez B., y J. A. Osuna G. 2006. Importancia del cultivo y generalidades. *In: V. Vázquez y M. H. Pérez (eds). El Cultivo del Mango: Principios y Tecnologías de Producción.* INIFAP, CIRPAC, Campo Experimental Santiago Ixcuintla. Libro Técnico No.1. México. pp.1-30.
- Velasco M., R. 2005. Marcadores moleculares y la extracción de ADN. *Facultad de Ciencias Agropecuarias* 3: 14-18.
- Villegas M., A. 2007. Situación y perspectivas del cultivo del mango en México. *In: II Jornada de Transferencia de Tecnología para el Cultivo del Mango.* Fundación Produce Sinaloa, A.C., México. pp. 51-57.

- Villegas M., A., y M. Andrade R. 2008. Poliembrionía, ventajas y oportunidades para la propagación vegetativa. *In*: J.G. Cruz y P.A. Torres (eds). Enfoques Tecnológicos en la Fruticultura. Universidad Autónoma Chapingo, México. pp. 149-167.
- Viruel, M.A., P. Escribano, M. Barbieri, M. Ferri, and J. I. Hormaza. 2005. Fingerprinting, embryo type and geographic differentiation in mango (*Mangifera indica* L., Anacardiaceae) with microsatellites. *Mol. Breed.* 15: 383–393.
- Yamanaka, N., M. Hasran, D. He Xu, H. Tsunematsu, S. Ildris, and T. Ban. 2006. Genetic relationship and diversity of four *Mangifera* species revealed through AFLP analysis. *Genet. Resour. Crop Ev.* 53:949-954.
- Wakana, A., and S. Eumoto. 1987. Adventice embryogenesis in citrus I. The occurrence of adventive embryos without pollination or fertilization. *Amer. J. Bot.* 74: 517-530.
- Xiang C., and M. L. Roose. 1988. Frequency and characteristics of nucellar and zygotic seedlings in 12 citrus rootstocks. *Scientia Hort.* 37:47-59.
- Zulia, I., L. Bellorín, R. Camacho, y O. Quijada. 2001. Caracterización de cultivares criollos de mango (*Mangifera indica* L.) en la Costa Oriental del Lago de Maracaibo. *Proc. Interamer. Soc. Trop. Hort.* 45: 67-70.

VII. ANEXOS

ANEXO A



Anexo A. Posibles rutas de formación de embriones en las semillas poliembriónicas: (I) desde células de un saco embrionario y tejido circundante; (II) como resultado del desarrollo de dos sacos embrionarios; (III) como resultado del desarrollo de un saco embrionario apospórico adicional (Batygina y Vinogradova, 2007). *M*, mitosis; *F*, fertilización; *P*, partenogénesis; *A*, antípoda; *Z*, cigoto; *IIC*, células integumentarias internas; *NC*, células nucelares; *PT*, tubo polínico; *S*, sinérgida; *End*, endospermo; *EC*, célula huevo. **Desarrollo embrionario desde:** () cigoto, $2n$; (●) células del nucelo e integumentarias, $2n$; (◐) sinérgidas y antípodas sin fertilizar, n ; (◑) células del endospermo, $3n$; (◒) célula huevo del saco embrionario apospórico sin fertilizar, $2n$; (◓) célula huevo del saco embrionario apospórico fertilizado, $3n$.

ANEXO B

Anexo B. Secuencias de bases (5'-3') de los iniciadores a seleccionar para ser empleados en la identificación de plántulas cigóticas y nucelares de mango cvs. Manila y Ataulfo mediante RAPD.

OPERON serie A	OPERON serie B	OPERON serie C	Serie SAP (Invitrogen®)
A-01 CAGGCCCTTC	B-01 GTTTCGCTCC	C-01 TTCGAGCCAG	S-01 ATGCGAACCG
A-02 TGCCGAGCTG	B-02 TGATCCCTGG	C-02 GTGAGGCGTC	S-02 GACACATCGG
A-03 AGTCAGCCAC	B-03 CATCCCCCTG	C-03 GGGGGTCTTT	S-03 TGGGACCTCC
A-04 AATCGGGCTG	B-04 GGA CTGGAGT	C-04 CCGCATCTAC	S-04 GGAGCTACCT
A-05 AGGGGTCTTG	B-05 TGC GCCCTTC	C-05 GATGACCGCC	S-05 TATAGGCCCT
A-06 GGTCCCTGAC	B-06 TGCTCTGCCC	C-06 GAACGGACTC	S-06 CCTACTCCAG
A-07 GAAACGGGTG	B-07 GGTGACGCAG	C-07 GTCCCGACGA	S-07 TGGGAATCCC
A-08 GTGACGTAGG	B-08 GTCCACACGG	C-08 TGGACCGGTG	S-08 GCCCCTACT A
A-09 GGGTAACGCC	B-09 TGGGGGACTC	C-09 CTCACCGTCC	
A-10 GTGATCGCAG	B-10 CTGCTGGGAC	C-10 TGTCTGGGTG	
A-11 CAATCGCCGT	B-11 GTAGACCCGT	C-11 AAAGCTGCGG	
A-12 TCGGCGATAG	B-12 CCTTGACGCA	C-12 TGTCATCCCC	
A-13 CAGCACCCAC	B-13 TTCCCCCGCT	C-13 AAGCCTCGTC	
A-14 TCTGTGCTGG	B-14 TCCGCTCTGG	C-14 TGC GTGCTTG	
A-15 TTCCGAACCC	B-15 GGAGGGTGTT	C-15 GACGGATCAG	
A-16 AGOCAGCAA	B-16 TTTGCCCGGA	C-16 CACTCTCCAG	
A-17 GACCGCTTCT	B-17 AGGGAACGAG	C-17 TTCCCCCAG	
A-18 AGGTGACCGT	B-18 CCACAGCAGT	C-18 TGAGTGGGTG	
A-19 CAAACGTCGG	B-19 ACCCCCGAAG	C-19 GTTGCCAGCC	
A-20 GTTGCGATCC	B-20 GGACCCTTAC	C-20 ACTTCGCCAC	

GLOSARIO

- **Absorbancia:** Es la cantidad de intensidad de luz que absorbe una muestra.
- **ADN (ácido desoxirribonucleico):** Polímero nucleótido que lleva la información genética en virus, bacterias y organismos superiores. El ADN puede ser de cadena sencilla (ADNcs) o de doble cadena (ADNcd). El ADNcd está compuesto de dos cadenas de desoxirribosa-fosfato, y de bases nitrogenadas complementarias ($A = T$, $G \equiv C$) unidas por puentes de hidrógeno; el par de cadenas están enrolladas una alrededor de la otra en orientación opuesta antiparalela $5'-3'$ con respecto a $3'-5'$. La secuencia de bases en cada cadena codifica la información genética. Es capaz de autorreplicarse, así como de determinar la síntesis de ARN (transcripción).
- **ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*, polimerasa Taq (*Thermus aquaticus* DNA polymerase, taq polymerase):** Enzima que proviene de la eubacteria *Thermus aquaticus* cepa YT 1 o BM; polimeriza desoxirribonucleótidos con una reducida o nula actividad exonucleasa $3'-5'$ o $5'-3'$, es termoestable (temperatura óptima de 70- 75 °C), y permite la amplificación selectiva en la PCR de cualquier ADN clonado. La secuenciación de ADN con la polimerasa Taq produce bandas con intensidad uniforme y pierde 'background' o 'fondo' en los geles de secuenciación.
- **Agar.** Sustancia gelatinosa derivada de ciertas rodofíceas, utilizada como agente solidificante en la preparación de medios nutritivos para el cultivo de microorganismos.
- **Agarosa (Agarose, agaran):** Polisacárido de galactán sulfatado lineal y neutral con β -D-galactopiranososa y 3,6-anhídrido- β -L-galactopiranososa ligado por enlaces glicosídicos (1-3, 1-4) en forma alterna. Es el componente principal de las algas marinas, y se usa para preparar geles empleados en la técnica de electroforesis, por su propiedad de ser soluble en solución acuosa caliente y gelificar al enfriar.
- **Alelo:** Es una forma del mismo gen, puede ser dominante o recesivo, y ser homocigoto o heterocigoto.
- **Alineación (PCR del ADN):** Etapa de la reacción de PCR posterior a la digestión, en la que la temperatura se reduce para permitir el reconocimiento de los iniciadores a las cadenas molde de ADN (la temperatura variará entre 25-65 °C dependiendo del contenido de C-G y longitud del iniciador).

- **Amortiguado de carga (loading buffer):** Mezcla de colorantes (ej. azul de bromofenol o xileno) en una solución viscosa de glicerol, sacarosa o ficoll, usada para incrementar la densidad de las muestra de ADN, ARN o proteínas antes de colocarlas en los pozos del gel. Sirve para ubicar el desplazamiento de los fragmentos de ADN de cierto peso molecular durante la electroforesis.
- **Amortiguador o buffer de electroforesis:** Amortiguador usado en solución electrolítica para la electroforesis del ADN o ARN. Los amortiguadores usados generalmente son TAE o TBE.
- **Amplificación:** Incremento del número de copias de un fragmento particular de ADN, resultante de la duplicación de un vector en donde dicho fragmento fue clonado.
- **Anátropo:** Óvulo con nucela recta y funículo cercano al micrópilo. Es la posición más común de óvulos y semillas de angiospermas.
- **Angiosperma:** Literalmente semilla nacida en una vasija (carpelo); consecuentemente, se aplica al grupo de plantas cuyas semillas se encuentran encerradas en un ovario maduro (fruto). Grupo monofilético de espermatofitas (plantas que producen semillas) cuya característica distintiva es la producción de flores periantadas. Coloquialmente se conocen como "plantas con flores".
- **Antioxidantes:** Compuestos capaces de reaccionar con las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, convirtiéndolas en formas no tóxicas, o bien controlando su concentración para evitar el daño oxidativo en las células.
- **Apomixis:** Proceso de reproducción asexual de las plantas, donde la semilla es producida sin fecundación previa. Sin meiosis o singamia, reproducción vegetativa sin unión de gametos.
- **Banda:** Son fragmentos de ácidos nucleicos o moléculas de proteínas que tienen propiedades electroforéticas, por lo que se separan en un gel durante la electroforesis y migran formando líneas detectables.
- **Base nitrogenada:** Molécula que contiene nitrógeno heterocíclico constituyente del ADN o ARN. Las cinco bases más comunes son: adenina y guanina (bases púricas), y citocina, timina y uracilo (bases pirimídicas). La timina es específica de ADN y el uracilo del ARN.
- **Bromuro de etidio (EBr, EtBr; bromuro de 3,8- diamino-6-etil-5-fenilfenantridium):** Colorante cancerígeno fluorescente que se intercala entre los pares de bases de doble

cadena del ADN y ARN. Fluoresce cuando se expone a la luz ultravioleta (UV) de longitudes de onda de 300 nm o menores. En condiciones de tinción apropiada, la intensidad de la fluorescencia es proporcional a la masa de los fragmentos de ADN o ARN con los que se combinó.

- **Calaza o chalaza:** Porción donde confluye la nucela y los tegumentos. La calaza coincide aproximadamente con el funículo en semillas ortótropas y algunas campilótropas.
- **Cámara de electroforesis:** Estructura que genera campos eléctricos diferenciales (polo positivo en un extremo y polo negativo en el otro), tiene un soporte charola donde se preparará el gel para colocar las muestras de ADN, ARN o proteínas, además se le agrega el electrolito que permitirá que la energía circule. Controla el voltaje y la intensidad de electricidad a la que se efectuará el proceso de electroforesis.
- **Carpelo:** Una de las partes del gineceo o verticilo más interno de la flor; cada carpelo encierra uno o más óvulos. El pistilo está formado por uno o varios carpelos.
- **Centrifugación con gradiente de densidad:** Técnica para separar macromoléculas u organelos celulares que se sedimentan por la diferencia de concentración (peso) debido a la fuerza gravitacional.
- **Cigoto:** Célula diploide (2n) resultante de la unión de dos gametos haploides (n), óvulo fecundado como resultado de la fertilización.
- **Citoplasma:** Parte del protoplasma que, en una célula eucariota, se encuentra entre el núcleo celular y la membrana plasmática. Consiste en una emulsión coloidal muy fina de aspecto granuloso, el citosol o hialoplasma, y en una diversidad de orgánulos celulares que desempeñan diferentes funciones.
- **Codominante:** Los marcadores son codominantes si cada individuo heterocigoto tiene otro alelo situado en otra posición del gel, correspondiente a un fragmento de ADN con un número de bases distinto. Los marcadores muestran características heterocigóticas u homocigóticas.
- **Cofactor:** Uno o varios componentes no proteicos requeridos por los enzimas para funcionar; muchos cofactores son iones metálicos, mientras que otros reciben el nombre de coenzimas.

- **Cotiledón:** La primera hoja (monocotiledóneas) o par de hojas (dicotiledónes) producidas por el embrión. Puede desempeñar funciones de almacenaje, absorción de nutrientes del endospermo o fotosíntesis en la plántula.
- **CTBA (bromuro de hezadeciltrimetilamonio):** Detergente catiónico que precipita el ADN y lo separa de proteínas y polisacáridos neutrales.
- **Cubierta seminal:** Conjunto de testa y tegmen, estructuras protectoras provenientes de los tegumentos externo e interno. Es un término útil cuando se desconoce el origen de las capas protectoras. Sirve como órgano protector, fuente de ciertos compuestos implicados en el metabolismo seminal y barrera que controla el paso de gases y agua según el estado germinativo en que se encuentre la semilla.
- **Cultivar:** Variedad de planta que sólo se encuentra en cultivo.
- **Cultivo *in vitro*:** Conjunto de técnicas y métodos de cultivo de tejidos u órganos utilizados para multiplicar plantas asexualmente en un recipiente con soluciones nutritivas artificiales y hormonas vegetales; la propagación se realiza en condiciones o en un medio estéril (libre de microorganismos). Cada porción de tejido u órgano generalmente origina una planta idéntica a la planta de donde se tomó el explante.
- **Delección:** Pérdida de un fragmento de ADN.
- **Dendrograma:** es un tipo de representación gráfica o diagrama de datos en forma de árbol (Dendro=árbol) que organiza los datos en subcategorías que se van dividiendo en otros hasta llegar al nivel de detalle deseado (asemejándose a las ramas de un árbol que se van dividiendo en otras).
- **Desnaturalización (PCR del ADN):** Primer paso de la reacción PCR, en el que la molécula de doble hélice de ADN se separa en cadenas sencillas por temperatura (90 o 95 °C), que servirán como molde para la síntesis de los fragmentos respectivos.
- **Diploide:** Organismo con dos juegos de cromosomas (2n).
- **dNTP:** Abreviatura de cualquiera de los 2-desoxinucleósido-5-trifosfato formado con las bases nitrogenadas: adenina, citosina, guanina, tiamina o uracilo.
- **Doble fecundación:** Fecundación del ovonúcleo y una célula espermática (cigoto, 2n) simultánea a la fusión del segundo gameto masculino con el núcleo polar (endosperma, 3n); característica única de todas las angiospermas.

- **Dominancia:** Cuando sólo un miembro del par de alelos se manifiesta al ser heterocigotos (ej. Aa). Si el par de alelos son homocigotos dominantes, se expresa el carácter dominante (ej. AA).
- **Dominante:** Los marcadores son dominantes si sólo hay dos genotipos, el que presenta una banda y el que no la tiene; la presencia de banda es dominante sobre su ausencia.
- **EDTA (ácido etilen-diamino-tetracético):** Remueve cationes que promueven la actividad de la ADNasa (enzima que desintegra al ADN).
- **Eje embrionario:** comprende al epicótilo, hipocótilo y radícula.
- **Electroforesis en gel:** Método para separar moléculas cargadas en un soporte o gel, dentro del campo eléctrico exponiendo diferencias en la carga eléctrica de moléculas con distinto tamaño y cantidad. El soporte generalmente se hace de agar, agarosa, poliacrilamida o almidón.
- **‘Embriocito’:** Grupo de células iniciales de los embriones adventicios (Sánchez *et al.*, 2006).
- **Embrión adventicio:** Embrión desarrollado de células del nucelo o integumento del óvulo.
- **Embrión somático:** Embrión formado a partir de tejidos somáticos. Desde el punto de vista ontogénico, el embrión somático sigue todas las fases del embrión cigótico, aunque sin fecundación.
- **Endocarpo:** Capa más interna de la pared del ovario maduro, o pericarpo (o pared del fruto).
- **Endospermo:** Tejido triploide (3n) que se desarrolla por medio de la mitosis a partir de la fusión de los núcleos polares y uno de los núcleos espermáticos. El endospermo puede deshacerse antes de la maduración de la semilla o durante la germinación.
- **Enzima.** Proteína capaz de acelerar reacciones químicas específicas disminuyendo la energía de activación requerida, pero que permanece inalterada durante el proceso; es un catalizador biológico.
- **Enzimas de restricción:** Enzimas que cortan el ADN en sitios bien definidos, llamadas también "tijeras nucleares".

- **Epicótilo o epicótilo:** Primer entrenudo arriba de los cotiledones. Parte de un embrión o plántula que se encuentra por encima de los cotiledones, y por debajo de la siguiente hoja u hojas.
- **Epistático (Epistásis):** Sucede cuando la acción de un gen se ve modificada por la acción de uno o varios genes. Al gen cuyo fenotipo se está expresando se le llama epistático, mientras que al fenotipo alterado o suprimido se le llama hipostático.
- **Epigenético:** Cambio en el fenotipo de un individuo sin alteraciones del genotipo. Factores no genéticos que intervienen en la determinación de la ontogenia.
- **Escalera (Ladder):** Cualquier molécula de ADN, ARN o proteína de tamaño o peso molecular conocido que sirve para monitorear o calibrar la separación muestras de ADN, ARN o proteínas mediante electroforesis o cromatografía.
- **Esclerénquima:** Tejido de sostén de algunas plantas formado por células muertas (sin protoplastos) a la madurez, cuyas paredes secundarias están engrosadas por lo que son muy gruesas y duras (lignificadas). Su nombre proviene del griego escleros, "duro" y enchyma, "sustancia".
- **Especificidad:** Exclusividad, como las proteínas de determinados organismos o las enzimas de reacciones particulares.
- **Espectrofotómetro:** Instrumento usado en la física óptica que sirve para medir, en función de la longitud de onda, la relación entre valores de una misma magnitud fotométrica relativos a dos haces de radiaciones.
- **Etanol (alcohol etílico):** Usando alcohol (ej. etanol, isopropanol, butanol, octanol) y altas concentraciones de sales (ej. 0.2-0.6 M de NaCl) se aglomeran y precipitan los ácidos nucleicos, separándolos de compuestos de bajo peso molecular que se mantienen solubles (impurezas).
- **Exocarpo:** Capa más externa del fruto; ej. la cáscara del fruto.
- **Exones:** Región del ADN que contiene información para codificar una proteína; son las regiones de un gen que no son separadas durante el proceso de 'splicing' y, por tanto, se mantienen en el ARN mensajero maduro.
- **Extensión (PCR del ADN):** Paso final de la reacción de la PCR, posterior a la alineación del iniciador a la cadena de ADN, en el que la ADN polimerasa reconoce el iniciador y

adiciona dNTPs para alargar la nueva cadena formada (la temperatura generalmente está entre 70 a 75 °C).

- **F1, F2...Fn:** Generaciones filiales. Es el híbrido (F2) resultante de cruza experimental entre progenitores (F1).
- **Fecundación:** Fusión de los núcleos de dos gametos para formar un cigoto diploide.
- **Fenoles:** Compuestos orgánicos en cuya estructura constan al menos de un grupo fenol, un anillo aromático unido por lo menos a un grupo funcional hidroxilo, sintetizados predominantemente a partir de productos de la vía del ácido shikímico. Juegan diversos papeles en las plantas, son metabolitos secundarios de defensa ante herbívoros y patógenos, pueden proveer soporte mecánico a la planta, atraer polinizadores, ser dispersores de frutos, absorber radiación ultravioleta, o actuar como agentes alelopáticos (ej. reducen el crecimiento de plantas competidoras que estén cerca).
- **Fenotipo:** Apariencia física de un organismo; el fenotipo es el resultado de la interacción entre la constitución genética (genotipo) del organismo y de su entorno.
- **Fotoperiodo:** Duración respectiva del día (horas luz) y la noche (horas oscuridad).
- **Fruto:** En las angiospermas, ovario (o grupo de ovarios) que ha alcanzado la madurez y que contiene las semillas, además de cualquier parte adyacente que puede fusionarse con él durante su desarrollo.
- **Funículo:** Filamento o cordón de tejido que conecta el óvulo con la placenta. Muchas semillas carecen de funículo.
- **Gameto:** Célula reproductiva haploide, los gametos se fusionan por parejas formando cigotos, los cuales son diploides.
- **Gel:** Mezcla de sustancias que presenta una constitución sólida o semisólida.
- **Gen:** Unidad de herencia; secuencia de nucleótidos del ADN que codifica una molécula de proteína, ARNt o ARNr, o bien regula la transcripción de dicha secuencia.
- **Genotipo:** Constitución genética, latente o expresada, de un organismo, a diferencia del fenotipo; suma total de todos los genes presentes en un individuo. Conjunto de los genes de un individuo incluida su composición alélica.
- **Germinación:** Es la emergencia de la raíz o brote de la semilla. Inicio o reactivación del crecimiento de una espora, semilla, yema u otra estructura similar.

- **Germoplasma:** Conjunto de genes que se transmite en la reproducción a la descendencia por medio de gametos o células reproductoras.
- **Haploide:** Organismo que contiene un juego de cromosoma (n), ej. los gametos.
- **Heterocigoto:** Organismo que tiene diferentes alelos correspondientes a un *loci* en los cromosomas homólogos (ej. Aa, un alelo dominante y uno recesivo). Resulta en la expresión del carácter dominante.
- **Hibridación:** Formación de descendencia a partir de progenitores diferentes.
- **Híbrido:** Descendencia de dos progenitores que difiere en una o varias características heredables; descendencia de dos variedades diferentes o de dos especies diferentes.
- **Hidrofóbico:** Sustancias que son repelidas por el agua o que no se pueden mezclar con ella.
- **Hipocótilo:** Tramo del eje embrionario o plántula que se encuentra entre el nudo cotiledonar y el cuello (límite superior de la radícula).
- **Hipocótilo:** Tramo del eje embrionario o plántula que se encuentra entre el nudo cotiledonal y el límite superior de la radícula.
- **Homocigoto:** Organismo que tiene los mismos alelos correspondientes a un *loci* en los cromosomas homólogos (ej. AA dos alelos dominantes; aa, dos alelos recesivos).
- **Homogeneizar:** Término que connota un proceso por el que se combinan dos sustancias, que resultan en una mezcla que presenta las mismas propiedades, sin que se distingan las fases o sustancias iniciales.
- **Hormona.** Sustancia química producida normalmente en pequeñas cantidades en una parte del organismo, desde donde es transportada a otra parte del organismo en la que produce un efecto específico.
- **In vitro:** Técnica para realizar un determinado experimento en un recipiente (vidrio u otro material), generalmente en un ambiente controlado fuera de un organismo vivo.
- **Iniciador, molécula iniciadora (Primer):** Oligonucleótido que complementa a regiones cortas o largas de la molécula de ADN o ARN (**alineación**); proveen el extremo 3'-OH como sustrato al que cualquier enzima ADN polimerasa puede adicionar nucleótidos en dirección 3'-5' (**extensión o alargamiento**).
- **Integumentos:** Capas que rodea el óvulo.
- **Intrones:** Regiones del ADN que no codifican para una determinada proteína.

- **ISTR:** Los ISTR (Inverse Sequence-Tagged Repeat) son marcadores basados en secuencias de retrotransposones y estos son elementos genéticos que se mueven dentro del genoma de un organismo vía ARN, existen en la mayoría de las plantas y son secuencias que se autoreplican y reinsertan en diferentes partes del genoma.
- **Liofilizar:** Proceso utilizado para la eliminación del agua mediante desecación al vacío y a muy bajas temperaturas.
- **Loci:** Plural de *locus*.
- **Lóculo:** Cavidad dentro del ovario que contiene óvulos.
- **Locus:** Posición de un gen o un biomarcador (marcador genético) en el cromosoma.
- **Longitud de onda:** Distancia que recorre la onda en el intervalo de tiempo transcurrido entre dos máximos consecutivos de una de sus propiedades (crestas).
- **Madurez fisiológica:** Parte del período de maduración de las frutas en el cual son susceptibles, en condiciones apropiadas, de tener cambios bioquímicos y alcanzar la madurez de consumo. En este período las frutas pueden ser cosechadas, pero si el corte es prematuro la maduración será irregular.
- **Mapa genético:** Es una representación de la situación de los genes en un cromosoma, cromosomas o de un fragmento cromosómico determinado.
- **Marcadores genéticos:** Alelo usado para identificar un gen o un cromosoma o un segmento del cromosoma.
- **Meiosis:** Proceso que ocurre para la formación de los gametos con constitución haploide (n). La primera división es reduccional, y la segunda para generar copias.
- **Membrana celular:** También conocida como Membrana plasmática. Está formada por una doble capa lipídica. Es una estructura que delimita las células. Ella establece el límite entre el medio intracelular componente (el citoplasma) y el medio extracelular (intersticio).
- **Meristemo:** Tejido vegetal indiferenciado a partir del cual se forman nuevas células. Tejido que produce células, de cuya diferenciación posterior se forman otros tejidos adultos.
- **Mesocarpo:** Capa media de la cubierta del fruto. En muchas frutas es la parte comestible.
- **Metabolismo:** Conjunto de reacciones bioquímicas y procesos físico-químicos que ocurren en una célula y en el organismo.

- **Micrópilo:** Orificio en la terminación de los tegumentos, por donde penetrará comúnmente el tubo polínico a la nucela. Es difícil o imposible de detectar en muchas semillas maduras.
- **Microsatélite:** Serie de secuencias cortas repetidas (2 a 10 pares de bases) del ADN altamente variables, dispersas a través de los genomas de eucariotes.
- **Mitosis:** Proceso durante el cual los cromosomas duplicados se dividen longitudinalmente y los cromosomas hijos se separan para formar dos núcleos hijos genéticamente idénticos; en general va acompañada de una citocinesis (División del citoplasma celular para formar dos células hijas. También denominado citoquinesis).
- **Morfología:** Estudio de la forma y de su desarrollo.
- **Mutación:** Cambio hereditario de un gen de una forma alélica a otra.
- **Necrosis:** Muerte del tejido; causada usualmente por enfermedad, ataque de insectos o deficiencia de nutrientes.
- **Nucela:** El megasporangio. Es el órgano que contiene al saco embrionario y está rodeado por lo tegumentos.
- **Oligonucleótido:** Molécula pequeña de ácido nucleico de más de 100 nucleótidos de longitud (oligómero), que consiste de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos.
- **Ovario:** Órgano formado por uno o varios carpelos con o sin asociación de tejido extracarpelar, contiene los óvulos.
- **Óvulo:** Estructura de las plantas con semillas que contiene el gametófito femenino con la ovocélula, toda ella está rodeada por una nucela y uno o dos tegumentos; cuando madura, el óvulo da lugar a la semilla.
- **Oxidación:** Pérdida de un electrón por un átomo o molécula. En las plantas, la oxidación causa daño o muerte del tejido, observándose cambio de color, incluso de sabor.
- **Parénquima:** Tejido compuesto por células parenquimáticas. Las células del parénquima pueden ser considerados como meristemas potenciales, aunque han perdido su capacidad de división, pueden en determinadas condiciones, desdiferenciarse y retomar su actividad meristemática, o bien rediferenciarse en otros tipos celulares.
- **Partenocarpia:** Desarrollo del fruto sin fecundación; los frutos partenocárpicos habitualmente carecen de semillas. Si precisa un estímulo exógeno, se denomina

partenocarpia estimulada; si el desarrollo del ovario tiene lugar sin ningún estímulo externo, recibe el nombre de partenocarpia autónoma.

- **Pastilla o ‘pellet’:** Material genético (ADN o ARN) concentrado en la base del tubo después de la precipitación por sustancias, ej, etanol, y de la centrifugación.
- **Patrón de fragmentos:** Huella característica de cada organismo, formado por la bandas de ADN o ARN en un gel después de la electroforesis.
- **pb (par de bases):** Pares de bases complementarias ($A = C$, $G \equiv T$) unidas por puentes hidrógeno en las cadenas complementarias del ADN.
- **PCR o reacción de polimerización en cadena (Polymerase Chain Reaction):** Procedimiento de síntesis y duplicación mediante el cual fragmentos de ADN mayores de 15 kb de longitud pueden amplificarse hasta 10^8 veces. Consta de tres pasos principales: desnaturalización, amplificación y extensión (ver definiciones).
- **Pedrigree:** Registro de los ancestros de un individuo o cultivar.
- **Pedúnculo.** Eje que sostiene la inflorescencia o una flor.
- **Peine:** Estructura de plástico que se usa para formar pozos u orificios en los geles para electroforesis. Las muestras de ADN, ARN o proteínas se colocan en estos pozos antes de la electroforesis.
- **Pelos radicales o radiculares:** Apéndices de células epidérmicas de la raíz; absorbe soluciones del suelo.
- **Pericarpo:** En sentido estricto es la pared del ovario maduro, incluye al tejido extracarpelar que interviene en la formación del fruto. Se forma de capas más o menos diferenciadas, si se llegan a distinguir se llaman: exocarpo (epicarpo), mesocarpo y endocarpo.
- **Placenta:** Región de incubación de los óvulos en el carpelo.
- **Plántula.** Joven esporófito que se desarrolla a partir de la semilla en germinación.
- **Plasmodesmo:** Son cada una de las unidades continuas de citoplasma que pueden atravesar las paredes celulares, manteniendo interconectadas las células continuas en organismos pluricelulares en los que existe pared celular, como las plantas o los hongos.
- **Pleiotrópico:** Gen que afecta varios rasgos a la vez, es responsable de efectos fenotípicos o caracteres distintos y no relacionados.

- **Plúmula.** Primera yema de un embrión; porción del vástago embrionario situada sobre los cotiledones. Yema apical del embrión.
- **Polaridad:** Control por estímulos internos o externos de la orientación de las células en el tejido u órganos en el individuo.
- **Poliembrionía:** Presencia de más de un embrión en la semilla en desarrollo.
- **Polimerasa *Taq*:** ver ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*.
- **Polimerasa:** Enzima que cataliza el ensamble de ribonucleótidos al ARN (ARN polimerasa) y desoxirribonucleótidos al ADN (ADN polimerasa).
- **Polimorfismo:** Cambio localizado en una secuencia específica de ADN dentro del genoma que ocurre generalmente por deleciones, inversiones, inserciones o rearrreglos. Se presenta en el ADN por mutaciones o hibridación (combinación de gametos), lo que permite la existencia de diferentes alelos para un *locus* específico.
- **Polinización abierta:** Polinización natural, sin manipulación humana.
- **Polinización cruzada.** Transferencia de polen de una antera de una planta al estigma de una flor de otra planta.
- **Polinización.** Transferencia de polen desde una antera a un estigma. Poner factores que la afectan
- **Polisacáridos:** Biomoléculas formadas por la unión de una gran cantidad de monosacáridos. Se encuadran entre los glúcidos, y cumplen funciones diversas, sobre todo de reservas energéticas (ej. Almidón y glucógeno) y estructurales (ej. Quitina y celulosa).
- ***Polygonium*:** Desarrollo del saco embrionario, en el que inicialmente hay cuatro megasporas en posición lineal, degenerando tres de ellas, y la megaspora calazal es la que origina el saco embrionario.
- **Portainjerto o patrón:** Es una planta, incluso a veces solo las raíces y parte del tronco, que tiene desarrollado un sistema radicular adecuado, y que se usa para injertar sobre él una yema de otra planta. La finalidad es que después de injertado se forme una planta completa que esté compuesta de dos individuos para obtener las ventajas de ambas plantas (generalmente son genéticamente diferentes).
- **Proteínas:** Biomoléculas formadas por cadenas lineales de aminoácidos. Realizan una enorme cantidad de funciones diferentes: estructural (colágeno y queratina), reguladora

(insulina y hormona del crecimiento), transportadora (hemoglobina), defensiva (anticuerpos), enzimática (sacarasa y pepsina), contráctil (actina y miosina).

- **Protoplasto:** Contenido de la célula vegetal, sin incluir la pared celular.
- **Radícula:** Raíz principal del embrión. Desarrolla en la raíz primaria de la plántula.
- **Rafe:** Región del óvulo o la semilla que se ubica en el plano mediano, en la periferia, del lado que no incluye al micrópilo, entre la calaza y el funículo. El óvulo ortótropo y algunos campilótropos carecen de rafe.
- **Raíz.** Habitualmente, el eje descendente de una planta, normalmente bajo tierra, que sirve para fijar a la planta y absorber y conducir el agua y minerales hacia su interior.
- **RAPD (Amplificación aleatoria del ADN polimórfico):** Cualquier fragmento de ADN que se amplifica con la técnica PCR, utilizando un oligodesoxirribonucleótido o iniciador de secuencia aleatoria, también llamado amplimero (ej. iniciadores de las series OPERON). Los fragmentos amplificados se separan en gel de agarosa y se visualizan por tinción con bromuro de etidio; si los RAPD de dos organismos se comparan, pueden exhibir polimorfismo en sus longitudes. Son marcadores genéticos.
- **Recesivo:** Carácter que se expresa cuando el par de alelos es homocigoto recesivo (ej. aa), y no hay un alelo dominante (ej. Aa).
- **Saco embrionario:** Según la etapa de desarrollo donde se ubique, puede ser: la megaspora, el megagametofito, o el endospermo con el embrión. El saco embrionario a menudo se limita de los tejidos circundantes (nucela) por una pared gruesa.
- **Semilla:** Se conforma de tegumentos, rafe, calaza, nucela y saco embrionario con su contenido. Puede incluir apéndices, como: pelos, alas, arilo, etc. El óvulo se convertirá en una semilla, si hubo fecundación u otro proceso, como partenocarpia.
- **Sobrenadante:** Fase superior o ‘flotante’ de una solución heterogénea.
- **Suspensor:** Estructura de la base del embrión de muchas plantas vasculares que empuja la parte terminal del embrión hacia el endosperma.
- **Tallo.** Parte del eje de las plantas vasculares situada sobre el suelo, con porciones anatómicamente similares bajo el suelo, como los rizomas y los cormos.
- **Tampón o amortiguador o buffer:** Son las disoluciones que al agregar cantidades moderadas de ácidos o bases fuertes, mantienen constante el pH
- **Tegmen:** Cubierta de la semilla, corresponde al tegumento interno que cubre al óvulo.

- **Tegumentos:** Hojas modificadas o vainas de dos o más estratos que envuelven la nucela. Sus terminaciones delimitan al micrópilo. Si el óvulo tiene dos tegumentos, interno y externo, se llama **bitegumentado**.
- **Tejido leñoso:** Nombre común que se utiliza para designar el leño de las dicotiledóneas. Xilema secundario.
- **Tejido vascular:** Presente en las plantas superiores. Está formado por el xilema y el floema. El **xilema** es una estructura que transporta a través de la planta agua y sales minerales disueltas. El **floema** transporta nutrientes ya elaborados por las células y por fotosíntesis. El xilema y el floema son parte de los tejidos de conducción; forma de tejidos adultos encargados de conducir agua, sales y nutrientes.
- **Termociclador:** Instrumento que permite de manera programada el rápido calentamiento y enfriamiento de la mezcla de reacción para PCR (ADN, iniciador, enzima, y otros reactivos).
- **Testa:** Cubierta de la semilla, corresponde al tegumento externo que cubre al óvulo.
- **Transluminador:** Fuente de luz ultravioleta (UV) que sirve para la emisión de luz fluorescentes a partir de colorante intercalado entre las dos cadenas de ADN o en las cadenas de ARN (ej. bromuro de etidio), permitiendo observar las bandas formadas en el gel.